

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 654**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/00** (2006.01)

**A61M 36/14** (2006.01)

**A61K 49/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2003 E 03726024 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1482987**

54 Título: **Constructos multivalentes para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico**

30 Prioridad:

**01.03.2002 US 360821 P**

**15.01.2003 US 440201 P**

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

**28.11.2014**

73 Titular/es:

**BRACCO SUISSE SA (50.0%)**

**Via Cantonale 2**

**6928 Manno , CH y**

**DYAX CORP. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ARBOGAST, CHRISTOPHE;**

**BUSSAT, PHILIPPE;**

**DRANSFIELD, DANIEL, T.;**

**FAN, HONG;**

**LINDER, KAREN, E.;**

**MARINELLI, EDMUND, R.;**

**NANJAPPAN, PALANIAPPA;**

**NUNN, ADRIAN D.;**

**PILLAI, RADHAKRISHNA K.;**

**POCHON, SIBYLLE;**

**RAMALINGAM, KONDAREDDIAR;**

**SATO, AARON;**

**SHRIVASTAVA, AJAY;**

**SONG, BO;**

**SWENSON, ROLF, E.;**

**VON WRONSKI, MATHEW, A.;**

**WALKER, SHARON, MICHELE y**

**YAN, FENG**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 523 654 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

Constructos multivalentes para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones y métodos para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Los investigadores han intentado desde hace mucho tiempo explotar la capacidad de ligandos o restos de  
 direccionamiento para unirse a células específicas (por medio de receptores o de otra forma) para dirigir  
 composiciones tales como marcadores detectables o agentes terapéuticos a tejidos particulares de un animal  
 (especialmente un ser humano). En tales situaciones, la capacidad del resto de direccionamiento para unirse a la  
 15 diana (por ejemplo, afinidad, avidéz y/o especificidad) tiene un impacto significativo sobre la capacidad para  
 seleccionar como diana satisfactoriamente los tejidos deseados.

Se han hecho numerosos intentos para usar anticuerpos naturales (por ejemplo policlonales) y monoclonales como  
 restos de direccionamiento *in vivo*. Sin embargo, el uso de tales anticuerpos presenta determinadas desventajas,  
 20 tales como niveles inaceptables de antigenicidad, incluso para anticuerpos humanizados. Además, los anticuerpos  
 naturales son difíciles de producir en forma recombinante, debido al número de cadenas, enlaces disulfuro y  
 glicosilación. Los anticuerpos naturales también presentan problemas farmacocinéticos. Los anticuerpos plantean  
 problemas significativos en aplicaciones de obtención de imágenes y radioterápicas porque, debido a su gran  
 tamaño, la acumulación en tejido diana extravascular y el aclaramiento del sistema vascular son ambos lentos. Este  
 25 problema es especialmente crítico cuando se trata con tumores sólidos, que presentan barreras adicionales al  
 ingreso de compuestos grandes transportados por la sangre. Se producen problemas similares con anticuerpos  
 usados para obtener imágenes usando otras modalidades, tales como obtención de imágenes por resonancia  
 magnética (MRI), ultrasonidos y luz visible. Si el anticuerpo está radiomarcado con un radionúclido terapéutico o de  
 diagnóstico, razones inferiores de diana con respecto a fondo dan como resultado las imágenes. Además, se  
 30 produce una distribución no deseable de la exposición a la radiación entre tejidos tumorales y normales.

En intentos por solucionar estos problemas, los esfuerzos se han dirigido hacia la construcción de entidades más  
 pequeñas con afinidades de unión similares usando las características esenciales de las regiones de unión de  
 anticuerpos naturales. Los bloques de construcción son normalmente fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) que  
 35 son monovalentes. La combinación de fragmentos de este tipo para que tengan las propiedades bivalentes o  
 multivalentes de los anticuerpos ha sido problemática. Con el fin de acoplarse a una superficie es una ventaja que  
 los dos sitios de unión en el anticuerpo estén conectados por medio de una bisagra flexible a la región constante.  
 Por tanto, con el fin de imitar la eficacia de unión de los anticuerpos, no sólo debe recrearse el sitio de unión, sino  
 que también la bivalencia (o valencia superior) y la flexibilidad. Esta flexibilidad es necesaria porque la estructura  
 40 principal de la proteína que constituye la región de no unión del scFv es todavía voluminosa en relación con el sitio  
 de unión. Una vez que se ha ideado un método apropiado para unir dos fragmentos scFv juntos, pueden unirse  
 diferentes fragmentos scFv juntos así como más de los dos restos de scFv habituales presentes en anticuerpos  
 naturales. Determinados fragmentos scFv, dependiendo tanto de la superficie de contacto VH/VL como de la  
 longitud del ligador, pueden dimerizarse o multimerizarse espontáneamente. Estos "diacuerpos" son más pequeños  
 45 que el anticuerpo natural y no tienen las propiedades inmunológicas de la parte Fc (que activa el complemento y/o  
 se une a receptores de Fc), de la que carecen. Los dos (o más) sitios de unión están rotados en relación uno con  
 respecto a otro, y por tanto el antígeno debe colocarse correctamente para adaptarse a esta presentación.

Los "minianticuerpos" tienen propiedades similares a las de diacuerpos, pero en vez de un ligador de 5-20  
 50 aminoácidos corto tienen un ligador relativamente más flexible que permite una orientación más libre de los sitios de  
 unión unos con respecto a otros, similar a un anticuerpo natural. Como los diacuerpos, los minianticuerpos no tienen  
 el fragmento de dímero de Fc inmunológicamente activo, de alto peso molecular. También pueden producirse  
 mediante sistemas bacterianos. Aunque tienen ventajas deseadas con respecto a anticuerpos naturales, los  
 minianticuerpos todavía tienen un tamaño relativamente grande, que afecta a su farmacocinética, y deben  
 55 producirse usando métodos biológicos. El minianticuerpo más pequeño tiene aproximadamente 120 kDa de tamaño.

Se han hecho intentos de usar anticuerpos biespecíficos (por ejemplo anticuerpos que se unen a dos dianas  
 separadas) para superar una de las principales deficiencias de los anticuerpos, concretamente, que el tamaño de los  
 anticuerpos ralentiza su acumulación en el tejido diana extravascular y su aclaramiento de la sangre. El enfoque  
 60 biespecífico adoptado se ha denominado "predireccionamiento". Este enfoque usa un protocolo de dos etapas. Un  
 anticuerpo biespecífico con al menos un brazo que reconoce un antígeno asociado a tumor y al menos otro brazo  
 que reconoce un epítipo en un agente de diagnóstico o terapia se administra como primera inyección. Tras haberse  
 aclarado sustancialmente el anticuerpo no unido de tejidos no diana y haber alcanzado un nivel máximo en el tumor,  
 se administra el agente terapéutico o de diagnóstico reconocible por el anticuerpo biespecífico, más pequeño. Se  
 65 espera que este último agente se distribuya más rápidamente por todo el cuerpo, y o bien se une al anticuerpo  
 biespecífico localizado en el tumor, o bien se aclara por medio de los riñones.

Una alternativa a este enfoque intenta usar un sistema de avidina/biotina de anticuerpo mixto en un procedimiento de dos etapas. Por ejemplo, se conjuga un anticuerpo de direccionamiento con o bien avidina o bien biotina y entonces se inyecta tras lo cual se localiza en el tumor de interés. Después de eso, se inyecta o bien biotina o bien avidina (dependiendo de lo que se acopló al anticuerpo de direccionamiento), que porta un radionúclido radioterápico o de obtención de imágenes, y se localiza en el sitio del anticuerpo primario mediante unión a avidina o biotina respectivamente.

Otro enfoque para el uso de anticuerpos como restos de direccionamiento para agentes radiofarmacéuticos u otros agentes de obtención de imágenes de diagnóstico ha intentado usar un hapteno bivalente para aumentar la avididad por el anticuerpo biespecífico unido a la célula con respecto a la del anticuerpo circulante. Este enfoque se basa en la unión bidentada que se produce con los anticuerpos unidos a células, porque la densidad de superficie en las células es lo suficientemente alta, pero no ocurre lo mismo con los anticuerpos circulantes, porque la concentración es demasiado baja. En efecto, el sistema hace uso del aumento en la avididad provocado por la presentación más estrecha de los anticuerpos/antígeno sobre las células.

También se han usado péptidos como restos de direccionamiento. En un intento por mejorar la unión, se han preparado constructos de péptidos biespecíficos con dos o más agentes de direccionamiento a base de péptidos selectivos para diferentes dianas. Por ejemplo, se preparó de manera notificada un péptido híbrido que tiene ligandos para dos dianas seleccionadas del receptor de somatostatina, GRP, CCK, sustancia P o VIP e integrina  $\alpha_v\beta_3$  y se sometió a prueba para determinar la capacidad para unirse a células tumorales. La evaluación inicial no mostró captación tumoral mejorada para los sistemas de múltiples ligandos investigados. Los investigadores supusieron que las alteraciones estéricas conducen a una reducción de las afinidades por el receptor de las estructuras dimericas. Otros han sometido a prueba un péptido híbrido de RGD-DTPA-octreotato dirigido hacia tanto la integrina  $\alpha_v\beta_3$  como el receptor de somatostatina-2 para determinar la capacidad para aumentar la captación tumoral con respecto a la de un péptido selectivo para una de las otras dianas. Las afinidades de unión diferentes de los dos restos de direccionamiento hacia sus dianas, vasos sanguíneos y células tumorales, respectivamente, dio como resultado que la avididad por los tumores estuviese dominada por la interacción más fuerte (mediada por somatostatina).

Una variación de estos enfoques usa un anticuerpo biespecífico dirigido a dos epítopos diferentes en el mismo antígeno. Este enfoque intenta aumentar la avididad del constructo por la diana, porque, aunque la unión es monovalente para cada epítipo, el constructo como un todo es bivalente para su diana, ya que cada uno de los epítopos de unión está ubicado dentro de la misma molécula diana. En el caso de la diana de molécula única, se ha encontrado que fragmentos scFv tienen una afinidad insuficiente y se requería un aumento en la avididad.

Dos fundamentos subyacen a los enfoques descritos anteriormente. El primer fundamento usa dos restos de direccionamiento diferentes para superar algunos de los problemas farmacocinéticos asociados con la administración de anticuerpos a tumores sólidos. El segundo fundamento usa dos restos de direccionamiento diferentes para aumentar la avididad del constructo por una diana dada, tal como una única molécula o un tumor completo. Sin embargo, todos los enfoques descritos padecen diversas desventajas. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de agentes terapéuticos y de diagnóstico con afinidad y/o avididad aumentada por una diana de interés. Sigue habiendo también una necesidad de agentes terapéuticos y de diagnóstico que, cuando se administran *in vivo* a un mamífero, tengan propiedades farmacocinéticas aceptables.

La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, se produce no sólo durante el desarrollo embrionario y el crecimiento y la reparación de tejido normal, sino que también está implicada en el ciclo reproductor femenino, el establecimiento y mantenimiento del embarazo y la reparación de heridas y fracturas. Además de la angiogénesis que se produce en el individuo normal, participan acontecimientos angiogénicos en varios procesos patológicos, notablemente crecimiento y metástasis tumorales, y otros estados en los que aumenta la proliferación de vasos sanguíneos, tales como retinopatía diabética, psoriasis y artropatías. La angiogénesis es tan importante en la transición de un tumor desde crecimiento hiperplásico hasta neoplásico que la inhibición de la angiogénesis se ha convertido en un campo de investigación de terapia contra el cáncer activo.

Se cree que la angiogénesis inducida por tumor depende de la producción de factores de crecimiento proangiogénicos por las células tumorales, que superan otras fuerzas que tienen a mantener los vasos existentes quiescentes y estables. El mejor caracterizado de estos agentes proangiogénicos es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Cohen *et al.*, FASEB J., 13: 9-22 (1999)). VEGF se produce de manera natural por una variedad de tipos de células en respuesta a hipoxia y algunos otros estímulos. Muchos tumores también producen grandes cantidades de VEGF, y/o inducen que células estromales vecinas produzcan VEGF (Fukumura *et al.*, Cell, 94: 715-725 (1998)). VEGF, también denominado VEGF-A, se sintetiza como cinco isoformas de corte y empalme diferentes de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos. VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub> son las principales formas producidas, particularmente en tumores (véase, Cohen *et al.* 1999, citado anteriormente). VEGF<sub>121</sub> carece de un dominio básico codificado por los exones 6 y 7 del gen de VEGF y no se une a heparina o la matriz extracelular, a diferencia de VEGF<sub>165</sub>.

Los miembros de la familia de VEGF actúan principalmente uniéndose a tirosina cinasas receptoras. En general, las tirosina cinasas receptoras son glicoproteínas que tienen un dominio extracelular que puede unirse a uno o más factores de crecimiento específicos, un dominio transmembrana (habitualmente una hélice alfa), un dominio adyacente a la membrana (en el que el receptor puede regularse, por ejemplo, mediante fosforilación), un dominio

5 tirosina cinasa (el componente catalítico del receptor) y una cola carboxilo-terminal, que en muchos receptores está implicada en el reconocimiento y la unión de los sustratos para la tirosina cinasa. Hay tres tirosina cinasas receptoras específicas de células endoteliales que se sabe que se unen a VEGF: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR o Flk-1) y VEGFR-3 (Flt4). Se han identificado Flt-1 y KDR como los receptores de VEGF de alta afinidad primarios. Mientras que Flt-1 tiene afinidad superior por VEGF, KDR presenta una expresión en células endoteliales más

10 abundante (Bikfalvi *et al.*, J. Cell. Physiol., 149: 50-59 (1991)). Además, se cree que KDR domina la respuesta angiogénica y es por tanto de mayor interés terapéutico y de diagnóstico (véase, Cohen *et al.* 1999, citado anteriormente). La expresión de KDR está altamente regulada por incremento en vasos angiogénicos, especialmente en tumores que inducen una fuerte respuesta angiogénica (Veikkola *et al.*, Cancer Res., 60: 203-212 (2000)). El papel crítico de KDR en la angiogénesis se pone de relieve por la falta completa de desarrollo vascular en embriones de ratón deficientes en KDR homocigotos (Folkman *et al.*, Cancer Medicine, 5ª edición (B.C. Decker Inc.; Ontario, Canadá, 2000) págs. 132-152).

KDR (región de dominio cinasa) está constituida por 1336 aminoácidos en su forma madura. La forma glicosilada de KDR migra sobre un gel de SDS-PAGE con un peso molecular aparente de aproximadamente 205 kDa. KDR

20 contiene siete dominios de tipo inmunoglobulina en su dominio extracelular, de los cuales los primeros tres son los más importantes en la unión a VEGF (Cohen *et al.* 1999, citado anteriormente). VEGF por sí mismo es un homodímero que puede unirse a dos moléculas de KDR simultáneamente. El resultado es que dos moléculas de KDR se dimerizan tras la unión y se autofosforilan, haciéndose mucho más activas. El aumento de la actividad cinasa inicia a su vez una ruta de señalización que media en los efectos biológicos de VEGF específicos de KDR.

25 Por tanto, no sólo es la actividad de unión a VEGF de KDR *in vivo* crítica para la angiogénesis, sino que la capacidad para detectar regulación por incremento de KDR en células endoteliales o para detectar complejos de unión VEGF/KDR sería extremadamente beneficiosa en la detección o monitorización de la angiogénesis. Aplicaciones de diagnóstico, tales como detectar el crecimiento de tumores malignos, y aplicaciones terapéuticas, tales como dirigir agentes tumorocidas o inhibidores de la angiogénesis al sitio tumoral, serían particularmente

30 beneficiosas.

El factor de crecimiento de hepatocitos (también conocido como factor de dispersión) es un factor de crecimiento multifactorial implicado en diversos procesos fisiológicos tales como embriogénesis, cicatrización de heridas y angiogénesis. Se ha hecho evidente que HGF, a través de interacciones con su receptor de alta afinidad (cMet), está

35 implicado en el crecimiento, la invasión y la metástasis tumorales. De hecho, se ha demostrado la expresión (por ejemplo, la sobreexpresión de cMet en el epitelio neoplásico de adenomas colorrectales y en otros carcinomas en comparación con mucosa normal) y/o actividad de cMet desregulada, así como la hiperactividad del receptor cMet a través de un bucle estimulador autocrino con HGF, en una variedad de tejidos tumorales e induce la transformación oncogénica de líneas celulares específicas.

40

En general, HGF se produce por las células estromales, que forman parte de muchos tumores epiteliales; sin embargo, se cree que la producción de HGF por las propias células tumorales comprende la ruta principal que conduce a la hiperproliferación de tumores específicos. Se han detectado bucles estimuladores autocrinos de

45 HGF/cMet en gliomas, osteosarcomas y carcinomas mamarios, de próstata, de mama, de pulmón y otros.

La interrupción de la interacción de HGF con el receptor cMet ralentiza la progresión tumoral en modelos animales. Además de estimular la proliferación de determinadas células cancerosas a través de la activación de cMet, HGF también protege frente a la citotoxicidad inducida por agentes que dañan el ADN en una variedad de líneas celulares

50 susceptibles a fenotipos hiperproliferativos (por ejemplo, cáncer de mama). Por tanto, la prevención de la unión de HGF a cMet podría predisponer a determinadas células cancerosas a la citotoxicidad de determinados fármacos.

Además de trastornos hiperproliferativos, también se ha vinculado a cMet con la angiogénesis. Por ejemplo, la estimulación de cMet conduce a la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que, a su vez, estimula la angiogénesis. Adicionalmente, la estimulación de cMet también se ha implicado en la promoción de la cicatrización de heridas.

55

Además de identificar el receptor cMet como diana terapéutica para trastornos hiperproliferativos, angiogénesis y cicatrización de heridas, la gran discrepancia entre los niveles de expresión de tejidos neoplásicos y tejidos normales correspondientes indica que cMet es una diana atractiva para aplicaciones de obtención de imágenes dirigidas a

60 trastornos hiperproliferativos.

El documento WO 01/528575 A da a conocer péptidos bicíclicos hetero y homodiméricos para seleccionar como diana KDR. La publicación WO 00/63380 A da a conocer variantes de VEGF que contienen dos sitios que se unen a una diana de región con alto contenido en dominios cinasa. Sin embargo, ninguno de estos documentos da a

65 conocer compuestos multivalentes tal como se reivindica a continuación en el presente documento.

**Sumario de la invención**

5 Según la invención, se proporciona un compuesto multivalente que comprende dos polipéptidos que tienen especificidad por epítomos diferentes en un receptor proteína-tirosina cinasa y un agente de contraste por ultrasonidos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas que permiten una localización mejorada en la diana, y que proporcionan un medio mejorado para detectar, obtener imágenes de y/o tratar el sitio diana.

10 Estos constructos de direccionamiento pueden unirse a o conjugarse con un marcador detectable y/o un agente terapéutico (tal como se define en el presente documento) y usarse para administrar el marcador detectable y/o agente terapéutico a la diana de interés. Por tanto, además de los propios constructos de direccionamiento, la invención incluye agentes de obtención de imágenes de diagnóstico y agentes terapéuticos útiles en la obtención de imágenes de diagnóstico y el tratamiento de diversos estados patológicos. Además, los constructos de direccionamiento de la invención son útiles por sí mismos para tratar la enfermedad.

15 La diana es un receptor implicado en angiogénesis, trastornos hiperproliferativos o cicatrización de heridas. La diana es KDR o el complejo KDR/VEGF, y los péptidos de unión se unen a diferentes epítomos en KDR o el complejo KDR/VEGF.

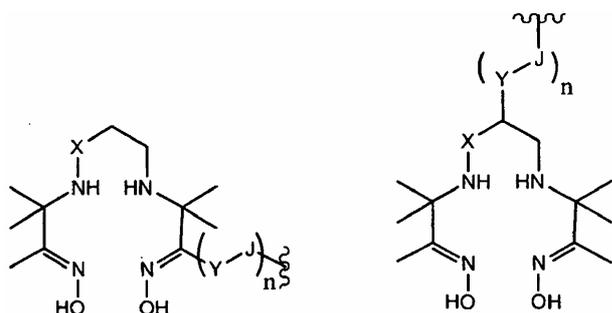
20 En otra realización preferida, la diana es el receptor (cMet) de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o el complejo HGF/cMet, y los polipéptidos de unión se unen a epítomos diferentes en cMet o el complejo HGF/cMet.

En realizaciones adicionales preferidas, la constante de afinidad de un compuesto según las reivindicaciones por su diana es mayor que la constante de afinidad de un polipéptido constituyente por la diana.

25 En otro aspecto, los compuestos según las reivindicaciones incluyen un grupo de marcaje o un agente terapéutico. En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención incluyen un ligador entre un resto de unión y el grupo de marcaje. Por ejemplo, el ligador puede incluir una cadena de alquilo sustituida, una cadena de alquilo no sustituida, un derivado de polietilenglicol, un espaciador de aminoácido, un azúcar, un espaciador alifático, un espaciador aromático, una molécula lipídica, o combinación de los mismos. Los grupos de marcaje preferidos incluyen un radionúclido, un ión de metal paramagnético, un agente de contraste por ultrasonidos y/o un fotomarcador. Por ejemplo, los iones de metales paramagnéticos preferidos usados en compuestos de la invención incluyen Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Gd<sup>3+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Dy<sup>3+</sup>, Pr<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Co<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ti<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, Nd<sup>3+</sup>, Sm<sup>3+</sup>, Ho<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup>, Pa<sup>4+</sup> y Eu<sup>2+</sup>.

30 Los radionúclidos son también marcadores detectables y agentes terapéuticos preferidos. La elección del radionúclido se determinará basándose en la aplicación terapéutica o de diagnóstico deseada. En una realización preferida, en la que el marcador detectable es un metal paramagnético o un radionúclido, los compuestos de la invención incluyen un quelante o grupo de quelación. Los quelantes preferidos incluyen DTPA, DOTA, DO3A, EDTA, TETA, EHPG, HBED, NOTA, DOTMA, TETMA, PDTA, TTHA, LICAM o MECAM. Para su uso como agente para PET, puede complejarse un péptido con uno de los diversos iones de metales emisores de positrones, tales como <sup>51</sup>Mn, <sup>52</sup>Fe, <sup>60</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga, <sup>72</sup>As, <sup>94m</sup>Tc o <sup>111</sup>In. El constructo heteromultimérico también puede marcarse mediante halogenación usando radionúclidos, tales como <sup>18</sup>F, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>77</sup>Br y <sup>76</sup>Br. Los radionúclidos de metales preferidos para escintigrafía o radioterapia incluyen <sup>99m</sup>Tc, <sup>51</sup>Cr, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>47</sup>Sc, <sup>51</sup>Cr, <sup>167</sup>Tm, <sup>141</sup>Ce, <sup>111</sup>In, <sup>168</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb, <sup>140</sup>La, <sup>90</sup>Y, <sup>88</sup>Y, <sup>153</sup>Sm, <sup>166</sup>Ho, <sup>165</sup>Dy, <sup>166</sup>Dy, <sup>62</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>97</sup>Ru, <sup>103</sup>Ru, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>203</sup>Pb, <sup>211</sup>Bi, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>214</sup>Bi, <sup>105</sup>Rh, <sup>109</sup>Pd, <sup>117m</sup>Sn, <sup>149</sup>Pm, <sup>161</sup>Tb, <sup>177</sup>Lu, <sup>198</sup>Au y <sup>199</sup>Au. La elección del metal o halógeno se determinará basándose en la aplicación terapéutica o de diagnóstico deseada. Por ejemplo, para fines de diagnóstico los radionúclidos preferidos incluyen <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>99m</sup>Tc y <sup>111</sup>In. Para fines terapéuticos, los radionúclidos preferidos incluyen <sup>64</sup>Cu, <sup>90</sup>Y, <sup>105</sup>Rh, <sup>111</sup>In, <sup>117m</sup>Sn, <sup>149</sup>Pm, <sup>153</sup>Sm, <sup>161</sup>Tb, <sup>166</sup>Dy, <sup>166</sup>Ho, <sup>175</sup>Yb, <sup>177</sup>Lu, <sup>186/188</sup>Re y <sup>199</sup>Au. El quelante más preferido usado en compuestos de la invención es ácido 4,7,10-tricarboximetil-1,4,7,10-tetraazaciclododecanotriacético 1-sustituido (DO3A). Preferiblemente, se usa un lantánido radiactivo, tal como, por ejemplo, <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>153</sup>Sm, <sup>111</sup>In o <sup>166</sup>Ho con DOTA o DO3A en compuestos de la invención.

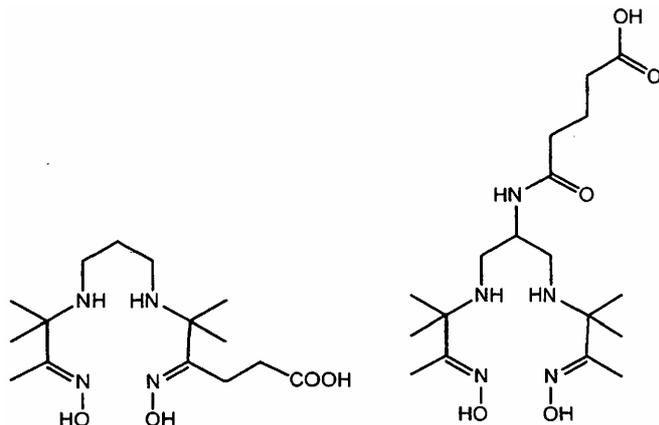
55 Los compuestos de la invención incluyen quelantes que tienen la siguiente estructura:



en la que X es CH<sub>2</sub> u O;

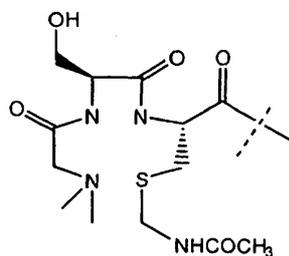
Y es alquilo ramificado o no ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilo, ariloxilo, arilamino, arilaminoacilo o aralquilo que comprende grupos alquilo ramificados o no ramificados C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, grupos hidroxilo o polihidroxialquilo o grupos polialcoxialquilo o polihidroxipolialcoxialquilo ramificados o no ramificados C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>; J es C(=O)-, OC(=O)-, SO<sub>2</sub>-, NC(=O)-, NC(=S)-, N(Y), NC(=NCH<sub>3</sub>)-, NC(=NH)-, N=N-, una homopoliamida o una heteropoliamina derivada de aminoácidos sintéticos o que se producen de manera natural; y n es 1-100. Lo más preferiblemente, los compuestos incluyen además <sup>99m</sup>Tc, <sup>186</sup>Re o <sup>188</sup>Re.

En una realización, los compuestos de la invención incluyen un quelante que tiene la siguiente estructura:



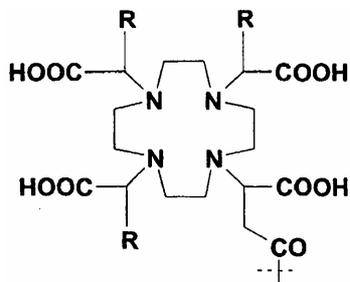
Lo más preferiblemente, el compuesto incluye además <sup>99m</sup>Tc, <sup>186</sup>Re o <sup>188</sup>Re.

En otra realización, el quelante comprende un compuesto que tiene la siguiente estructura:



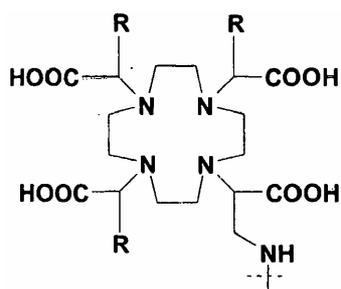
Lo más preferiblemente, el compuesto incluye además <sup>99m</sup>Tc.

En otras realizaciones, los compuestos de la invención incluyen un quelante que tiene la siguiente estructura:



en la que R es un grupo alquilo, tal como CH<sub>3</sub>. Lo más preferiblemente, el compuesto incluye además <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>153</sup>Sm, <sup>111</sup>In o <sup>166</sup>Ho.

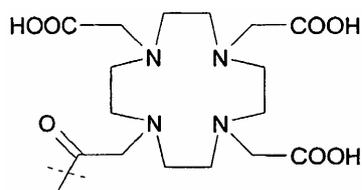
Aún en otra realización, los compuestos de la invención incluyen un quelante que tiene la siguiente estructura:



en la que R es un grupo alquilo, tal como CH<sub>3</sub>. Lo más preferiblemente, el compuesto incluye además <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>153</sup>Sm, <sup>111</sup>In o <sup>166</sup>Ho.

5

En otras realizaciones, el compuesto de la invención incluye un quelante que tiene la siguiente estructura:



10 Lo más preferiblemente, el compuesto incluye además <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>153</sup>Sm, <sup>111</sup>In o <sup>166</sup>Ho.

Los agentes de contraste por ultrasonidos preferidos para su uso en compuestos de la invención incluyen microburbujas o microbalones estabilizados con fosfolípidos que comprenden un gas fluorado.

15 Una realización preferida de la invención incluye compuestos que comprenden dos restos de unión con especificidad por sitios de unión diferentes en una diana tal como se especifica en las reivindicaciones. La diana es KDR o el complejo KDR/VEGF o cMet del complejo cMet/VEGF. Los restos de unión se unen a epítomos diferentes en el receptor o complejo receptor/ligando. El resto de unión es un polipéptido. En una realización más preferida tales compuestos incluyen además un grupo de marcaje o agente terapéutico tal como se describe en el presente documento.

20

En otro aspecto, la invención presenta métodos de obtención de imágenes de diagnóstico usando compuestos de la invención que incluyen un grupo de marcaje. Los métodos de la invención incluyen las etapas de administrar a un paciente una preparación farmacéutica que incluye un compuesto de la invención que tiene un grupo de marcaje, y obtener imágenes del compuesto tras su administración al paciente. En realizaciones preferidas, la etapa de obtención de imágenes incluye obtención de imágenes por resonancia magnética, obtención de imágenes por ultrasonidos, obtención de imágenes óptica, obtención de imágenes por sonoluminiscencia, obtención de imágenes por fotoacústica u obtención de imágenes nuclear. En estos métodos, la etapa de administración puede incluir inhalación, absorción transdérmica, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección intraarterial o administración parenteral.

25

30

En otro aspecto, los compuestos de la invención sirven como agentes terapéuticos por sí mismos y/o incluyen un agente terapéutico. En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención incluyen un ligador entre un resto de unión y el agente terapéutico. Por ejemplo, el ligador puede incluir una cadena de alquilo sustituida, una cadena de alquilo no sustituida, un derivado de polietilenglicol, un espaciador de aminoácido o péptido, un azúcar, un espaciador alifático, un espaciador aromático, una molécula lipídica o combinación de los mismos. Los agentes terapéuticos preferidos para su uso con compuestos de la invención incluyen un agente bioactivo, un agente citotóxico, un fármaco, un agente quimioterápico o un agente radioterápico.

35

40

En otro aspecto, la invención presenta los compuestos según las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad mediante la administración a un paciente de una preparación farmacéutica que incluye dicho compuesto. En una realización, cuando uno o más restos de unión del compuesto inhiben un proceso biológico que contribuye a un estado patológico, el compuesto puede administrarse para tratar ese estado patológico. Por ejemplo, los restos de unión pueden inhibir el proceso biológico previniendo o disminuyendo la actividad del receptor (por ejemplo mediante competición con el ligando natural para el receptor, inhibiendo directamente la actividad del receptor ya esté unido o no el ligando natural o mediante una combinación de los dos). Por tanto, un compuesto heteromultimérico de la invención puede inhibir la actividad de, por ejemplo KDR o cMet, y por tanto inhibir la angiogénesis y/o hiperproliferación y en consecuencia las enfermedades a las que contribuyen estos procesos. Por tanto, la invención presenta los compuestos según las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad administrando a un paciente una preparación farmacéutica que incluye un compuesto de la invención solo o unido o enlazado a un agente terapéutico separado. En realizaciones

50

preferidas, la invención presenta los compuestos según las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada con angiogénesis o hiperproliferación. En la realización más preferida, la enfermedad es crecimiento tumoral neoplásico.

5 En una realización preferida, la invención presenta constructos de direccionamiento diméricos que incluyen dos polipéptidos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR que se unen a sitios de unión diferentes de KDR o el complejo VEGF/KDR. Estos constructos se denominan en el presente documento "constructos de direccionamiento a KDR". Los constructos de direccionamiento a KDR presentan una unión mejorada a KDR (por ejemplo aumento de la especificidad y/o afinidad y/o avidéz) en comparación con polipéptidos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR monoméricos, y en comparación con constructos diméricos o multiméricos de un único polipéptido de unión a KDR. Estos compuestos preferidos pueden unirse a o conjugarse con un resto detectable y usarse para dirigir estas composiciones a células que expresan KDR, permitiendo la obtención de imágenes de tejido que expresa KDR.

15 En otra realización preferida, la invención presenta constructos de direccionamiento diméricos que incluyen dos polipéptidos de unión a cMet o complejo HGF/cMet que se unen a sitios de unión diferentes de cMet o el complejo HGF/cMet. Estos constructos se denominan en el presente documento "constructos de direccionamiento a cMet". Los constructos de direccionamiento a cMet presentan unión a cMet mejorada (por ejemplo aumento de la especificidad y/o afinidad y/o avidéz) en comparación con polipéptidos de unión a cMet o complejo HGF/cMet monoméricos, y en comparación con constructos diméricos o multiméricos de un único polipéptido de unión a cMet.

20 Los constructos de direccionamiento a KDR y cMet de la invención pueden unirse a o conjugarse con un agente terapéutico y usarse para localizar el agente terapéutico en tejido que expresa cMet o KDR. Alternativa o adicionalmente, los constructos de direccionamiento a KDR y cMet de la invención también pueden usarse como agentes terapéuticos por sí mismos, tal como se describe en el presente documento.

25 Los constructos que comprenden dos polipéptidos de unión a KDR o KDR/VEGF muestran una capacidad mejorada para unirse a la molécula diana en comparación con los correspondientes polipéptidos de unión monoméricos. Por ejemplo, tal como se muestra en el ejemplo 6 a continuación, los constructos tetraméricos de polipéptidos de unión a KDR proporcionados en el presente documento mostraron una capacidad mejorada para unirse a células 293H transfectadas con KDR. La combinación de dos o más polipéptidos de unión en un único constructo molecular parece mejorar la avidéz del constructo con respecto a los polipéptidos de unión monoméricos tal como se muestra por una disminución en  $K_D$ .

35 Además, tal como se demuestra en el presente documento, se prepararon constructos que comprenden dos o más polipéptidos de unión específicos para epítomos diferentes de KDR y/o KDR/VEGF (por ejemplo, constructos "heteroméricos"). Se espera que constructos que comprenden dos o más polipéptidos de unión proporcionados en el presente documento bloqueen múltiples sitios en KDR o VEGF/KDR. Los constructos heteroméricos muestran capacidad de unión superior con respecto a ambos de los correspondientes monómeros, así como constructos tetraméricos que comprenden múltiples copias del mismo polipéptido de unión. Además, constructos heteroméricos que comprenden dos o más péptidos de unión específicos para epítomos diferentes también podían unirse eficazmente a células 293H transfectadas con KDR. Por tanto, la inclusión de dos o más polipéptidos de unión que reconocen epítomos diferentes mejora adicionalmente la avidéz del constructo por la molécula diana, tal como se demuestra por una disminución en  $K_D$ .

45 Los constructos heteroméricos de los polipéptidos de unión proporcionados en el presente documento muestran una capacidad mejorada para inhibir la función de tirosina cinasas receptoras. Basándose en experimentos descritos en el presente documento, se espera que constructos diméricos y otros multiméricos que comprenden al menos dos polipéptidos de unión específicos para epítomos diferentes de KDR y/o KDR/VEGF inhiban la función de tirosina cinasas receptoras. En particular, se espera que tales constructos inhiban la función de VEGFR-2/KDR, VEGFR-1/Flt-1 y VEGFR-3/Flt-4. Adicionalmente, se espera que constructos heteromultiméricos de la invención que comprenden dos o más restos de unión específicos para epítomos diferentes de cMet y/o cMet/HGF inhiban la función de tirosina cinasas receptoras y, en particular, la función de cMet.

55 Para los fines de la presente invención, la función de tirosina cinasas receptoras puede incluir una cualquiera de: oligomerización del receptor, fosforilación del receptor, actividad cinasa del receptor, reclutamiento de moléculas de señalización posteriores, inducción de la inducción de genes de proliferación celular, inducción de migración celular, o combinación de los mismos. Por ejemplo, los constructos heteroméricos de polipéptidos de unión proporcionados en el presente documento inhiben la inactivación del receptor KDR inducida por VEGF en células endoteliales humanas, demostrado por la inhibición de la fosforilación inducida por VEGF del receptor KDR. Además, los constructos heteroméricos de péptidos de unión proporcionados en el presente documento inhiben la migración de células endoteliales estimulada por VEGF. Tal como se muestra en el presente documento, la selección como diana de dos o más epítomos distintos en KDR con un único constructo de unión mejora enormemente la capacidad del constructo para inhibir la función del receptor. Incluso pueden usarse péptidos de unión con una capacidad débil para bloquear la actividad del receptor para generar constructos heteroméricos que tienen una capacidad mejorada para bloquear la función del receptor inducida por VEGF.

Adicionalmente, tal como se demuestra adicionalmente en el presente documento, se prepararon constructos que comprenden dos o más polipéptidos de unión específicos para epítomos diferentes de cMet. Se espera que constructos que contienen dos o más polipéptidos de unión a cMet proporcionados en el presente documento bloqueen múltiples sitios en cMet. Estos constructos de direccionamiento a cMet heteroméricos muestran una capacidad de unión superior con respecto a los correspondientes monómeros.

Por tanto, la presente solicitud se refiere a constructos que comprenden dos polipéptidos de unión tal como se definen en las reivindicaciones. Los constructos multiméricos de la presente invención comprenden dos polipéptidos de unión, de manera que dos polipéptidos de unión en el constructo son específicos para epítomos diferentes de KDR y/o KDR/VEGF y cMet y/o cMet/HGF. Estos constructos también se denominan en el presente documento "constructos heteroméricos", "heteromultímeros" y/o "constructos heteromultiméricos".

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la unión de perlas fluorescentes a células transfectadas con KDR y transfectadas de manera simulada. Se sometieron a prueba perlas recubiertas con Neturavidin con los ligandos biotinilados indicados unidos para determinar la unión a células 293H que expresan y no expresan KDR. Se detectó unión específica a KDR para tanto P5 (con espaciador hidrófilo) como P6. Se proporcionan detalles adicionales en el ejemplo 2.

La figura 2 muestra la inhibición en porcentaje de la unión de VEGF marcado con <sup>125</sup>I mediante péptidos [P6, P4, P5-X-B y P12-X-B] a dos concentraciones diferentes (30 μM y 0,3 μM) a células 293H transfectadas con KDR, tal como se describe en el ejemplo 3. Los resultados para P6, P4 y P5-X-B son el promedio de tres experimentos ± DE, mientras que el resultado para P12-X-B se basa en un experimento.

La figura 3 representa inmunotransferencias de inmunoprecipitados de KDR a partir de HUVEC no estimuladas (-V) y estimuladas con VEGF (+V) que se resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron y se estudiaron con sonda secuencialmente con anticuerpos anti-fosfotirosina ("Fosfo KDR") y anti-KDR ("KDR total"). No se detectó KDR activado (fosforilado) en HUVEC no estimuladas (-V), pero era abundante en inmunoprecipitados de HUVEC estimuladas con VEGF (+V). El nuevo estudio con sonda de la transferencia con anticuerpo anti-KDR demostró que estaban presentes cantidades comparables de KDR total en ambos inmunoprecipitados. Esta figura es representativa de doce experimentos que siguieron el mismo protocolo.

La figura 4 representa inmunotransferencias que demuestran la inhibición de la fosforilación de KDR (activación) con un anticuerpo anti-KDR neutralizante, tal como se describe en el ejemplo 4. Se resolvieron inmunoprecipitados de HUVEC no estimuladas (-V), estimuladas con VEGF (+V) y tratadas simultáneamente con VEGF/anticuerpo anti-KDR (1 μg/ml) (+V+α-KDR) mediante SDS-PAGE, se transfirieron y se estudiaron con sonda secuencialmente con anticuerpos anti-fosfotirosina ("Fosfo KDR") y anti-KDR ("KDR total"). Tal como se describe en el ejemplo 4, el anticuerpo neutralizante pudo bloquear parcialmente la activación de KDR inducida por VEGF.

La figura 5 representa inmunotransferencias que demuestran la inhibición de la fosforilación de KDR (activación) con un péptido de unión a KDR (experimento de repetición). Se resolvieron inmunoprecipitados de HUVEC no estimuladas (-V), estimuladas con VEGF (+V) y tratadas con un péptido de unión a KDR (10 μM) (+V+P10) mediante SDS-PAGE, se transfirieron y se estudiaron con sonda secuencialmente con anticuerpos anti-fosfotirosina ("Fosfo KDR") y anti-KDR ("KDR total"). Tal como se describe en el ejemplo 4, el péptido de unión a KDR P10 pudo bloquear claramente de manera parcial activación de KDR inducida por VEGF a 10 μM.

La figura 6 representa la unión de P12-C marcado con Tc a células 293H transfectadas con KDR y transfectadas de manera simulada, tal como se describe en el ejemplo 5.

La figura 7 representa la unión específica de P12-C marcado con Tc a células 293H transfectadas con KDR, tal como se describe en el ejemplo 5.

La figura 8 representa la unión de saturación de complejos péptido/Neturavidin HRP, tal como se describe en el ejemplo 6. La figura 8A muestra los resultados obtenidos usando P6-XB y P5-XB. La figura 8B muestra los resultados obtenidos usando P12-XB y P13-XB. Los valores de Kd calculados fueron: 10,00 nM (P6-XB), 14,87 nM (P5-XB), 4,03 nM (P12-XB) y 1,81 nM (P13-XB).

La figura 9 representa la unión de complejos péptido/Neturavidin HRP (P1-X-B, P5-X-B, P6-XB, P12-XB y P13-XB) a células 293H transfectadas con KDR y transfectadas de manera simulada a una única concentración (5,5 nM), tal como se describe en el ejemplo 6.

La figura 10 representa la unión de complejos péptido/Neturavidin HRP (P1-XB, P1-B, P5-XB, P5-B, P6-XB y P6-B) a células 293H transfectadas con KDR y transfectadas de manera simulada a una única concentración (2,78 nM), tal como se describe en el experimento B del ejemplo 6.

La figura 11 representa la unión específica (unión a células transfectadas con KDR menos unión a células transfectadas de manera simulada) de complejos péptido/Neturavidin HRP (P6-XB, P5-XB, P12-XB y P13-XB) con y sin suero de rata al 40%, tal como se describe en el experimento C del ejemplo 6. La concentración de disolución de péptido/avidina HRP era de 6,66 nM para P6-XB y P5-XB, 3,33 nM para P12-XB y 2,22 nM para P13-XB.

5 La figura 12 muestra la unión de péptido/avidina HRP con células transfectadas con KDR y transfectadas de manera simulada, representada gráficamente como absorbancia a 450 nm. Las proporciones de péptidos de unión a KDR y control usadas para formar cada complejo tetramérico se indican en la leyenda, para cada multímero sometido a prueba.

10 La figura 13 representa la unión específica de un complejo P5-XB/avidina-HRP a células transfectadas con KDR (unión de fondo a células transfectadas de manera simulada restada), representada gráficamente como absorbancia a 450 nm. Se añadieron concentraciones crecientes (tal como se indica mediante el eje X) de péptidos no complejados al ensayo tal como se indica en la leyenda. Sólo P5-XB libre pudo disminuir la unión del complejo P5-XB/avidina a células transfectadas con KDR.

15 La figura 14 es un gráfico que muestra la inhibición en porcentaje de la unión de VEGF marcado con  $^{125}\text{I}$  por péptidos (P12-XB, D2, D1, D3, y P13-D) a tres concentraciones diferentes (10  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$  y 0,03  $\mu\text{M}$ ) a células 293H transfectadas con KDR. Los resultados son de un experimento llevado a cabo por triplicado  $\pm$  D.E.

20 La figura 15 es una fotografía que muestra la capacidad de D1 para bloquear completamente la fosforilación de KDR inducida por VEGF en HUVEC a 10 nM y la mayoría de la fosforilación a 1 nM. El nuevo estudio con sonda de la transferencia para KDR total (panel inferior) demostró que los efectos de los compuestos sometidos a prueba no se debían a una reducción de la carga de muestra. Homodímeros compuestos por las dos secuencias de unión contenidas en D1 no interfirieron con la fosforilación hasta 100 nM.

25 La figura 16 muestra que D1 bloquea de manera potente la migración/invasión de células endoteliales inducida por VEGF. Se cuantificaron las células que migraban mediante medición de la fluorescencia tras teñir las células migradas con un colorante fluorescente.

30 La figura 17 es un gráfico que muestra la unión de D5 marcado con  $^{125}\text{I}$  a células 293H transfectadas con KDR y transfectadas de manera simulada en ausencia y presencia de suero de ratón al 40%.

35 La figura 18 es un gráfico que muestra la unión específica (KDR-SIMULADO) de D5 marcado con  $^{125}\text{I}$  a células 293H transfectadas con KDR en ausencia y presencia de suero de ratón al 40%.

La figura 19 es un gráfico del aclaramiento plasmático como porcentaje de dosis inyectada por ml frente al tiempo.

40 La figura 20 muestra perfiles de SE-HPLC de plasma de la columna para péptidos Superdex. Panel superior, muestra inyectada; seguido por 0 min, 30 min y 90 min. El recuadro dentro de cada panel muestra el punto de tiempo, el número de animal y el volumen inyectado para el análisis de HPLC.

45 La figura 21 es un gráfico que muestra los resultados de pruebas de péptidos KDR en ensayo de proliferación de HUVEC. A, D6; B, P12-G; C, PNC-1 (control negativo); F, PNC-1 (control negativo).

La figura 22 muestra el análisis cinético de la unión de D1 (heterodímero de una forma truncada de P6-D y P12-G) a KDR-Fc murino. Todos los sensogramas se ajustan al modelo de analito bivalente.

50 La figura 23 muestra el análisis cinético de la unión de D7 (heterodímero de P5-D y P6-D) a KDR-Fc murino. Todos los sensogramas se ajustan al modelo de analito bivalente.

La figura 24 muestra el análisis cinético de la unión de P12-G marcado con fluoresceína a KDR-Fc murino. Todos los sensogramas se ajustan al modelo de Langmuir 1:1.

55 La figura 25 es un gráfico que muestra la unión específica (unión a células transfectadas con KDR menos unión a células transfectadas de manera simulada) de P12C marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en presencia y ausencia de suero de rata al 40%, tal como se describe en el experimento C del ejemplo 6. Los resultados se representan gráficamente como CPM específicas unidas  $\pm$  D.E.

60 La figura 26 es un gráfico que representa el % de inhibición  $\pm$  D.E. de la unión de  $^{125}\text{I}$ -VEGF específica a células transfectadas con KDR por PG-1 (cuadrados) D1 (rombos).

65 La figura 27 es un gráfico que representa el % de migración estimulada por VEGF máxima  $\pm$  D.E. de células HUVEC en presencia de las concentraciones indicadas de PG-1 (rombos) D1 (cuadrados).

La figura 28A es un gráfico que representa la unión de D10 marcado con Tc a células 293H transfectadas con KDR

tal como se describe en el ejemplo 18.

La figura 28B es un gráfico que representa la falta de unión de D18 marcado con Tc a células 293H transfectadas con KDR tal como se describe en el ejemplo 18. Simulado = transfectadas de manera simulada. Trans = transfectadas con KDR. MS = suero de ratón.

La figura 29 es un gráfico que representa la unión de D13 marcado con Lu a células 293H transfectadas con KDR tal como se describe en el ejemplo 19. Simulado = transfectadas de manera simulada. Trans = transfectadas con KDR. MS = suero de ratón.

La figura 30 es un gráfico que resume los resultados de un estudio de radioterapia con D13 realizado en ratones desnudos en los que se implantaron tumores PC3. Cada línea representada gráficamente representa el crecimiento a lo largo del tiempo para un tumor individual en un ratón tratado, excepto por la línea discontinua gruesa, que representa el crecimiento tumoral promedio en un conjunto de ratones no tratados, tal como se describe en el ejemplo 20.

La figura 31 es un gráfico que muestra la unión total de complejos de péptido control y los péptidos de prueba (P30-XB, P31-XB, P32-XB) con <sup>125</sup>I-estreptavidina (en presencia de VEGF) a células transfectadas con KDR y transfectadas de manera simulada. Sólo el complejo que contenía P30-XB mostró unión específica (KDR-SIMULADO).

La figura 32 es un gráfico que muestra que D26 (cuadrados) con su glicosilación y espaciador modificado puede bloquear la migración estimulada por VEGF incluso de manera más potente que D24 (rombos), que carece de esas modificaciones químicas.

La figura 33 es un gráfico que muestra que TK-1 mejora la potencia de D6 en el bloqueo de los efectos biológicos de VEGF en un ensayo de migración con HUVEC cultivadas. Rombo: D6 solo a las concentraciones indicadas. Cuadrados: D6 a las concentraciones indicadas más TK-1 100 nM (constante).

La figura 34 es un gráfico que muestra que D8 homodimérico (cuadrados) es menos capaz que D17 heterodimérico (rombos) de bloquear los efectos de VEGF en el ensayo de migración llevado a cabo en el ejemplo 25.

La figura 35 es un gráfico que muestra datos de proliferación celular para D6 tal como se describe en el ejemplo 31 más adelante.

La figura 36 muestra ejemplos de (A) un dímero unido del extremo C-terminal al extremo C-terminal, (B) un dímero unido del extremo N-terminal al extremo C-terminal y (C) un dímero unido del extremo N-terminal al extremo N-terminal.

La figura 37 es un gráfico que muestra la captación y retención de contraste de burbujas en el tumor hasta 30 minutos tras la inyección para suspensiones de microburbujas estabilizadas con fosfolípidos conjugadas con un constructo heteromultimérico.

#### Descripción detallada

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que compuestos que tienen dos o más restos de unión, en los que al menos dos de los restos de unión se unen a sitios de unión diferentes sobre la misma diana, tienen una capacidad inesperada y mejorada significativamente para unirse a la diana. Preferiblemente, la diana es un receptor o un complejo receptor/ligando. La capacidad mejorada de los compuestos de la invención (denominados de manera diversa "constructos de direccionamiento multivalentes", "heterodímeros", "heterotetrámeros", "heteromultímeros" y/o "constructos heteromultiméricos" en el presente documento) para unirse a una diana puede demostrarse mediante la comparación con la capacidad de un resto de unión individual, constituyente, para unirse a la diana. Por ejemplo, la fuerza de unión de un heteromultímero de la invención puede compararse con la fuerza de unión de uno de sus monómeros. Preferiblemente, un heteromultímero de la invención presenta un aumento en la afinidad (tal como se determina, por ejemplo, por sus constantes de disociación), en comparación con un monómero individual, constituyente.

#### Definiciones

"polipéptido de unión a cMet" es un polipéptido de unión que forma un complejo *in vitro* o *in vivo* con el receptor de HGF, cMet;

"Polipéptido de unión a complejo cMet/HGF" es un polipéptido de unión que forma un complejo *in vitro* o *in vivo* con un complejo de unión formado entre factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y cMet.

Un "grupo de marcaje" o "marcador detectable", tal como se usa en el presente documento, es un grupo o resto que

puede generar una señal para obtención de imágenes de diagnóstico, tal como obtención de imágenes por resonancia magnética, obtención de radioimágenes, obtención de imágenes por ultrasonidos, obtención de imágenes por rayos X, obtención de imágenes con luz visible o que porta un resto tal como un metal radiactivo u otra entidad que puede usarse en radioterapia u otras formas de terapia.

5 El término “especificidad” se refiere a un polipéptido de unión que tiene una afinidad de unión superior por una diana con respecto a otra. La especificidad de unión puede caracterizarse por una constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) o una constante de equilibrio de asociación ( $K_A$ ) para los dos materiales diana sometidos a prueba. En una  
10 realización preferida, los polipéptidos de unión de la invención tienen una constante de disociación para una diana deseada que es inferior a aproximadamente 10  $\mu$ M, más preferiblemente inferior a aproximadamente 1  $\mu$ M y lo más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,5  $\mu$ M o incluso inferior. El término “especificidad de KDR” se refiere a un resto de unión a KDR que tiene una afinidad superior por KDR que una diana irrelevante. El término “especificidad de VEGF/KDR” se refiere a un resto de unión a complejo VEGF/KDR que tiene una afinidad superior  
15 por un complejo VEGF/KDR que una diana irrelevante. En una realización preferida, heteromultímeros según la presente invención son específicos para KDR o el complejo VEGF/KDR, y tienen preferiblemente una constante de disociación que es inferior a aproximadamente 10  $\mu$ M, más preferiblemente inferior a aproximadamente 1  $\mu$ M, lo más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,5  $\mu$ M o incluso inferior. El término “especificidad de cMet” se refiere a un resto de unión a cMet que tiene una afinidad superior por cMet que una diana irrelevante. El término “especificidad de cMet/HGF” se refiere a un resto de unión a complejo cMet/HGF que tiene una afinidad superior por  
20 un complejo cMet/HGF que una diana irrelevante. En una realización preferida, heteromultímeros de unión según la presente invención son específicos para cMet o el complejo cMet/HGF, y tienen preferiblemente una constante de disociación que es inferior a aproximadamente 10  $\mu$ M, más preferiblemente inferior a aproximadamente 1  $\mu$ M, lo más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,5  $\mu$ M o incluso inferior.

25 El término portador o excipiente “farmacéuticamente aceptable” se refiere a un portador o excipiente no tóxico que puede administrarse a un paciente, junto con un compuesto de esta invención, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo.

30 Los términos “agente terapéutico” o “terapéutico” se refieren a un compuesto o un agente que tiene un efecto beneficioso, terapéutico o citotóxico *in vivo*. Los agentes terapéuticos incluyen las composiciones denominadas, por ejemplo, agentes bioactivos, agentes citotóxicos, fármacos, agentes quimioterápicos, agentes radioterápicos, material genético.

35 Las siguientes abreviaturas comunes se usan a lo largo de toda esta memoria descriptiva: 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (fmoc o Fmoc), 1-hidroxibenotriazol (HOBt), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), anhídrido acético ( $Ac_2O$ ), (4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo (ivDde), ácido trifluoroacético (TFA), reactivo B (TFA:H<sub>2</sub>O:fenol:triisopropilsilano, 88:5:5:2), N,N'-diisopropiletilamina (DIEA), hexafluorofosfato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), N-hidroxisuccinimida (NHS), síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), dimetilsulfóxido (DMSO),  
40 diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF) y N-metilpirrolidinona (NMP).

La preparación de constructos diméricos según las reivindicaciones que portan dos péptidos de unión diferentes y un grupo de marcaje puede lograrse tal como se describe en el presente documento, así como mediante otros métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden construirse péptidos de unión completamente protegidos sobre resina  
45 de atrapamiento de seguridad de tipo Ellman usando protocolos de síntesis de péptidos Fmoc manuales o automatizados. Véase Backes, B.J., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (1996), 118(12), 3055-6. Por separado, usando métodos convencionales conocidos en la técnica de síntesis de péptidos (véase, por ejemplo, Fields, G.B. *et al.*, “Principles and Practice of Solid Phase Synthesis” en Synthetic Peptides, A Users Guide, Grant, G.A. ed., W.H. Freeman Co. NY. 1992, cap. 3 págs. 77 - 183), puede construirse un derivado de di-lisina sobre resina de 2-clorotritilo. Véase Barlos, K. y Gatos, D. “Convergent Peptide Synthesis” en Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Chan, W.C. y White, P.D. eds, Oxford University Press, Nueva York, 2000, cap. 9: págs. 215-228. La liberación de este derivado de la resina de 2-clorotritilo sin eliminación de los grupos protectores de cadenas laterales, activación  
50 del grupo carboxilo y acoplamiento a cualquier grupo de marcaje funcionalizado con amina proporciona un derivado de di-lisina cuyos átomos de nitrógeno colgantes protegidos pueden desenmascararse para dar dos grupos amino libres. La resina de atrapamiento-seguridad mencionada anteriormente se activa y el derivado de di-lisina funcionalizado con grupos de marcaje N-desprotegidos deseados se añade a la resina de atrapamiento-seguridad activada. Los grupos amino colgantes se acilan en el extremo carboxilo-terminal del péptido unido a la resina de atrapamiento-seguridad que se desprende ahora de la resina y una parte integral de la estructura de di-lisina. Puede emplearse un exceso del péptido unido a la resina de atrapamiento-seguridad para garantizar una reacción completa  
60 de los grupos amino del constructo de di-lisina. La optimización de la razón de las parejas de reacción en este esquema optimiza el rendimiento. Los grupos de protección en los péptidos de unión se eliminan empleando protocolos de escisión basada en ácido trifluoroacético.

65 Por ejemplo, la síntesis de constructos multiméricos comparativos y diméricos en los que dos o más péptidos de unión están presentes en un constructo se logra fácilmente. Pueden emplearse esquemas de protección ortogonales

(tales como un grupo alloxycarbonilo sobre un nitrógeno y un grupo Fmoc sobre el otro, o empleando el grupo Fmoc conjuntamente con el grupo protector iV-Dde sobre el otro, por ejemplo) para distinguir los átomos de nitrógeno colgantes de los derivados de di-lisina descritos anteriormente. El desenmascaramiento de uno de los grupos amino, seguido por reacción del producto resultante con un péptido de unión unido a resina de atrapamiento-seguridad  
 5 activada tal como se describió anteriormente, proporciona un constructo de di-lisina que tiene un único péptido de unión unido. La eliminación del segundo grupo protector desenmascara el nitrógeno restante. Véase, por ejemplo, Mellor, S.L. *et al.* "Synthesis of Modified Peptides" en *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Chan, W.C. y White, P.D. eds, Oxford University Press, Nueva York, 2000, cap. 6: págs. 169-176. El producto resultante puede hacerse  
 10 reaccionar con una segunda resina de atrapamiento-seguridad que porta un péptido de unión diferente para proporcionar un constructo heterodimérico completamente protegido, que tras la eliminación de los grupos protectores con ácido trifluoroacético, proporciona el material deseado.

Alternativamente, se ensambla en primer lugar un péptido de unión sobre una resina de amida de Rink mediante  
 15 métodos de acoplamiento de péptidos manuales o automatizados, habitualmente empleando protocolos de síntesis de péptidos Fmoc. El péptido puede presentar un extremo C-terminal o extremo N-terminal funcionalizado con un ligador o un constructo de ligador-grupo de marcaje que puede presentar un grupo nucleófilo adicional tal como el grupo N $\epsilon$ -amino de un resto de lisina, por ejemplo. La escisión de los grupos protectores se logra empleando ácido trifluoroacético con modificadores apropiados, dependiendo de la naturaleza del péptido. El péptido completamente  
 20 desprotegido se hace reaccionar entonces con un gran exceso de un electrófilo bifuncional tal como éster de bis-N-hidroxisuccinimida del ácido glutárico (disponible comercialmente de Tyger Scientific Inc., 324 Stokes Avenue, Ewing, NJ, 08638). El éster mono-N-hidroxisuccinimidílico, monoamidado del ácido glutárico se trata entonces con un equivalente adicional del mismo péptido, o un equivalente de un péptido de unión diferente. La purificación del material resultante mediante HPLC proporciona el constructo homo o heterodimérico deseado que porta un grupo de  
 25 marcaje adecuado.

Aún en otro enfoque, puede emplearse un esquema modular para preparar constructos multiméricos superiores comparativos o diméricos que portan grupos de marcaje adecuados tal como se definió anteriormente. En una  
 30 ilustración sencilla, se trata resina de amida de Rink fmoc-lisina(iV-Dde) con piperidina para eliminar el resto fmoc. Entonces se acopla una función de marcaje, tal como biotina, 5-carboxifluoresceína o N,N-dimetil-Gly-Ser(O-t-Bu)-Cys(Acm)-Gly-OH al átomo de nitrógeno. A continuación se trata la resina con hidrazina para eliminar el grupo iV-Dde. Tras lavar meticulosamente, se trata la resina con cloruro cianúrico y una base impedida tal como diisopropiletilamina en un disolvente adecuado tal como DMF, NMP o diclorometano para proporcionar una  
 35 diclorotriazina monofuncionalizada unida a la resina. El desplazamiento sucesivo posterior de los átomos de cloro restantes o bien mediante dos equivalentes de un péptido de unión o bien un equivalente de un péptido de unión, seguido por un segundo péptido de unión proporciona un constructo funcionalizado con grupo de marcaje, hetero u  
 40 homodimérico comparativo, unido a resina. Véanse, por ejemplo, Falorni, M., *et al.*, *Tetrahedron Lett.* (1998), 39(41), 7607-7610; Johnson, C.R., *et al.*, *Tetrahedron* (1998), 54(16), 4097-4106; Stankova, M. y Lebl, M., *Mol. Diversity* (1996), 2(1/2), 75-80.

Según sea apropiado, los péptidos entrantes pueden estar protegidos o no protegidos según justifique la situación. La escisión de grupos protectores se logra empleando reactivos de desprotección a base de ácido trifluoroacético tal como se describió anteriormente y los materiales deseados se purifican mediante cromatografía de líquidos de alta  
 45 resolución.

Puede lograrse la síntesis directa de los polipéptidos de unión usando técnicas convencionales, incluyendo síntesis de péptidos en fase sólida, síntesis en fase de disolución, etc. Se prefiere la síntesis en fase sólida. Véase Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis* (1989), W. H. Freeman Co., San Francisco; Merrifield, J. *Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963); Bodanszky y Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, Nueva York 1984). También pueden prepararse polipéptidos de la invención comercialmente por compañías que proporcionan  
 50 síntesis de péptidos como servicio (por ejemplo, BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, PA; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA). También están disponibles máquinas de síntesis de péptidos automatizadas, tales como las fabricadas por Perkin-Elmer, Applied Biosystems.

El compuesto de polipéptido se purifica preferiblemente una vez que se ha aislado o sintetizado mediante cualquier  
 55 técnica química o recombinante. Para fines de purificación, hay muchos métodos convencionales que pueden emplearse, incluyendo cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) usando una columna de sílice alquilada tal como sílice C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> o C<sub>18</sub>. Se usa generalmente una fase móvil en gradiente de contenido orgánico creciente para lograr la purificación, por ejemplo, acetonitrilo en un tampón acuoso, que contiene habitualmente una pequeña cantidad de ácido trifluoroacético. También puede usarse cromatografía de intercambio  
 60 iónico para separar péptidos basándose en su carga. El grado de pureza del polipéptido puede determinarse mediante diversos métodos, incluyendo la identificación de un pico grande principal en HPLC. Se prefiere un polipéptido que produce un único pico que es al menos el 95% del material de entrada en una columna de HPLC. Incluso más preferible es un polipéptido que produce un único pico que es al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o incluso el 99,5% o más del material de entrada en una columna de HPLC.

65 Para garantizar que el péptido obtenido usando cualquiera de las técnicas descritas anteriormente es el péptido

deseado para su uso en composiciones de la presente invención, puede llevarse a cabo el análisis de la composición de péptidos. Tal análisis de la composición puede realizarse usando espectrometría de masas de alta resolución para determinar el peso molecular del péptido. Alternativamente, el contenido en aminoácidos del péptido puede confirmarse hidrolizando el péptido en ácido acuoso, y separando, identificando y cuantificando los componentes de la mezcla usando HPLC, o un analizador de aminoácidos. También pueden usarse secuenciadores de proteínas, que degradan secuencialmente el péptido e identifican los aminoácidos en orden, para determinar la secuencia del péptido.

Por ejemplo, también pueden producirse polipéptidos de unión usando técnicas de ADN recombinante, que utilizan ácidos nucleicos (polinucleótidos) que codifican para los polipéptidos de la invención, y expresándolos entonces de manera recombinante, es decir, manipulando células huésped mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico exógeno de modos conocidos para provocar que tales células huésped produzcan los polipéptidos de unión deseados. Tales procedimientos están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica (véase Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

En la práctica de una realización de la presente invención, una determinación de la afinidad del heteromultímero o un resto de unión constituyente para la diana en relación con otra proteína o diana es una medida útil, y se denomina afinidad por la diana. Los ensayos convencionales para cuantificar la unión y determinar la afinidad incluyen diálisis en equilibrio, unión en equilibrio, filtración en gel o la monitorización de numerosos cambios espectroscópicos (tales como un cambio en la polarización de fluorescencia) que puede resultar de la interacción del resto de unión y su diana. Estas técnicas o modificaciones de las mismas miden la concentración de ligando unido y libre como función de la concentración de ligando (o proteína). La concentración de heteromultímero o polipéptido unido ([unido]) está relacionada con la concentración de heteromultímero o polipéptido libre ([libre]) y la concentración de sitios de unión para el polipéptido, es decir, en KDR, complejo VEGF/KDR, cMet o el complejo cMet/HGF (N), tal como se describe en la siguiente ecuación:

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

Una solución de los datos a esta ecuación produce la constante de asociación,  $K_a$ , una medida cuantitativa de la afinidad de unión. La constante de asociación,  $K_a$  es la recíproca de la constante de disociación,  $K_D$ . La  $K_D$  se notifica más frecuentemente en mediciones de afinidad. En una realización preferida heteromultímeros de la invención y polipéptidos de unión constituyentes se unen a la diana, por ejemplo KDR, complejo VEGF/KDR, cMet o cMet/HGF y tienen una  $K_D$  por la diana en el intervalo de 1 nanomolar (nM) a 100 micromolar ( $\mu\text{M}$ ) y preferiblemente tienen valores de  $K_D$  inferiores a 50  $\mu\text{M}$ , preferiblemente inferiores a 1  $\mu\text{M}$ , más preferiblemente inferiores a 50 nM y lo más preferiblemente inferiores a 10 nM.

Cuando se emplean heteromultímeros como agentes de obtención de imágenes, otros aspectos de la afinidad de unión pueden hacerse más importantes. Por ejemplo, tales agentes de obtención de imágenes funcionan en un sistema dinámico en el que la unión del agente de obtención de imágenes a la diana (tal como KDR o complejo VEGF/KDR, por ejemplo, sobre endotelio activado) no está en un estado de equilibrio estable durante todo el procedimiento de obtención de imágenes. Por ejemplo, cuando el agente de obtención de imágenes se inyecta inicialmente, la concentración de agente de obtención de imágenes y de complejo agente-diana aumenta rápidamente. Sin embargo, poco después de la inyección, el agente de obtención de imágenes circulante (libre) comienza a aclararse a través de los riñones o el hígado, y la concentración plasmática de agente de obtención de imágenes empieza a descender. Este descenso en la concentración de agente de obtención de imágenes libre en el plasma provoca finalmente que el complejo agente-diana se disocie. La utilidad de un agente de obtención de imágenes depende de la diferencia en la velocidad de disociación del agente-diana en relación con la velocidad de aclaramiento del agente. Idealmente, la velocidad de disociación será lenta en comparación con la velocidad de aclaramiento, dando como resultado un tiempo de obtención de imágenes largo durante el cual hay una alta concentración de complejo agente-diana y una baja concentración de agente de obtención de imágenes libre (señal de fondo) en el plasma.

Una ventaja de los compuestos de unión heteromultiméricos, tales como los de la presente invención, es que presentan generalmente velocidades de disociación muy lentas en relación con sus monómeros constituyentes (véase Tissot *et al.*, J. Immunol. Methods 236(1-2):147-165 (2000)). Además, compuestos heteromultiméricos que pueden unirse a dos epítomos distintos en una molécula diana simultáneamente pueden lograr una unión multimérica independientemente de la distancia entre las moléculas diana en la superficie de la célula. Por otro lado, compuestos de unión homomultiméricos dependen de la presencia de dos o más moléculas diana que están en proximidad suficiente de manera que el homomultímero pueda abarcar la distancia entre ellas. Por tanto, los compuestos de unión heteromultiméricos de la presente invención son particularmente bien adecuados para la unión a receptores y otras moléculas de superficie celular que son menos abundantes y por tanto están más distantes entre sí en la superficie celular.

La medición cuantitativa de las velocidades de disociación puede realizarse fácilmente usando varios métodos conocidos en la técnica, tales como fluorimetría de fibra óptica (véase, por ejemplo, Anderson y Miller, Clin. Chem., 34(7):1417-21 (1988)), resonancia de plasmón superficial (véase, Malmberg *et al.*, J. Immunol. Methods, 198(1):51-7

(1996) y Schuck, *Current Opinion in Biotechnology*, 8:498-502 (1997)), espejo resonante y guía de ondas plana acoplada a rejilla (véase, por ejemplo, Hutchinson, *Molec. Biotechnology*, 3:47-54 (1995)). Están disponibles comercialmente biosensores automatizados para medir la cinética de unión: sensor de resonancia de plasmón superficial BIAcore (Biacore AB, Uppsala SE), sensor de espejo resonante IAsys (Fisons Applied Sensor Technology, Cambridge GB), sensor de guía de ondas planas acoplado a rejilla BIOS-1 (Artificial Sensor Instruments, Zurich CH).

#### Ligadores

Adicionalmente, las modificaciones dentro de la invención incluyen la introducción de ligadores o espaciadores entre la secuencia de direccionamiento del resto de unión o polipéptido de unión y el marcador detectable o agente terapéutico. Por ejemplo, el uso de tales ligadores/espaciadores puede mejorar las propiedades relevantes de los péptidos de unión (por ejemplo aumentar la estabilidad en suero, etc.). Estos ligadores pueden incluir cadenas de alquilo sustituidas o no sustituidas, derivados de polietilenglicol, espaciadores de aminoácido, azúcares o espaciadores alifáticos o aromáticos comunes en la técnica.

Por ejemplo, los ligadores adecuados incluyen moléculas de reticulación homobifuncionales y heterobifuncionales. Las moléculas homobifuncionales tienen al menos dos grupos funcionales reactivos, que son iguales. Los grupos funcionales reactivos en una molécula homobifuncional incluyen, por ejemplo, grupos aldehído y grupos éster activos. Las moléculas homobifuncionales que tienen grupos aldehído incluyen, por ejemplo, glutaraldehído y subaraldehído.

Las moléculas de ligadores homobifuncionales que tienen al menos dos unidades de éster activas incluyen ésteres de ácidos dicarboxílicos y N-hidroxisuccinimida. Algunos ejemplos de tales ésteres N-succinimidílicos incluyen suberato de disuccinimidilo y ditiobis-(propionato de succinimidilo), y sus sales de bis-sulfonato y ácido bis-sulfónico solubles tales como sus sales de sodio y potasio.

Las moléculas de ligadores heterobifuncionales tienen al menos dos grupos reactivos diferentes. Algunos ejemplos de reactivos heterobifuncionales que contienen enlaces disulfuro reactivos incluyen 3-(2-piridil-ditio)propionato de N-succinimidilo (Carlsson *et al.*, 1978, *Biochem J.* 173:723-737), S-4-succinimidiloxicarbonil-alfa-metilbenciltiosulfato de sodio y 4-succinimidiloxicarbonil-alfa-metil-(2-piridilditio)tolueno. Se prefiere 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo. Algunos ejemplos de reactivos heterobifuncionales que comprenden grupos reactivos que tienen un doble enlace que reacciona con un grupo tiol incluyen 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo y m-maleimidobenzoato de succinimidilo. Otras moléculas heterobifuncionales incluyen 3-(maleimido)propionato de succinimidilo, 4-(p-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo, 4-(N-maleimidometil-ciclohexano)-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo, éster de maleimidobenzoil-5N-hidroxi-succinimida.

Además, también pueden emplearse ligadores que son combinaciones de las moléculas y/o los restos descritos anteriormente para conferir una ventaja especial a las propiedades del péptido. Pueden unirse moléculas lipídicas con ligadores para permitir la formulación de burbujas de ultrasonidos, liposomas u otros constructos basados en agregación. Tales constructos podrían emplearse como agentes para el direccionamiento y la administración de un indicador de diagnóstico, un agente terapéutico (por ejemplo una "cabeza de guerra" química para terapia), o una combinación de estos.

#### Usos de constructos heteromultiméricos

Pueden usarse constructos heteromultiméricos de la presente invención en una multitud de aplicaciones, incluyendo inmunoensayos (por ejemplo, ELISA), como agentes farmacéuticos útiles para tratamientos de diversas enfermedades, así como en usos terapéuticos y de diagnóstico *in vivo*. Por ejemplo, los constructos heteromultiméricos descritos en el presente documento serán extremadamente útiles para la detección y/u obtención de imágenes de tejido que contiene dianas *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, constructos heteromultiméricos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR serán extremadamente útiles para la detección y/u obtención de imágenes de tejido que contiene KDR o complejo VEGF/KDR, y particularmente para la detección y/u obtención de imágenes de sitios de angiogénesis, en los que están implicados íntimamente VEGF y KDR, tal como se explicó anteriormente. Puede emplearse cualquier método adecuado para someter a ensayo u obtener imágenes de KDR o complejo VEGF/KDR. De manera similar, constructos heteromultiméricos de unión a cMet o complejo HGF/cMet serán extremadamente útiles para la detección y/u obtención de imágenes de tejido que contiene cMet o complejo HGF/cMet, y particularmente para la detección y/u obtención de imágenes de tumores u otros sitios de hiperproliferación, en los que están implicados íntimamente HGF y cMet, tal como se explicó anteriormente. Puede emplearse cualquier método adecuado para someter a ensayo u obtener imágenes de cMet o complejo HGF/cMet.

Los compuestos de la invención también tienen utilidad en el tratamiento de una variedad de estados patológicos, ya se usen solos o en combinación con otro agente terapéutico. Por ejemplo, tal como se comenta, un compuesto de la invención que inhibe un proceso biológico que contribuye a un estado patológico puede usarse por sí mismo como composición farmacéutica o terapéutica. Alternativamente (o en combinación), un compuesto de la invención puede incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una realización, la invención incluye heteromultímeros que

incluyen restos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR que pueden usarse por sí mismos como productos terapéuticos o pueden usarse para localizar uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo una agente quimioterápico, un agente radioterápico, material genético, etc.) en células que expresan KDR, incluyendo sitios de angiogénesis, o los asociados con varios patógenos. En otra realización, la invención incluye heteromultímeros que

5 incluyen restos de unión a cMet o complejo HGF/cMet que pueden usarse por sí mismos como productos terapéuticos o pueden usarse para localizar uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo un agente quimioterápico, un agente radioterápico, material genético, etc.) en células que expresan cMet, incluyendo tumores, sitios de hiperproliferación o sitios de angiogénesis.

10 Los constructos heteromultiméricos de la presente invención son particularmente útiles como agentes terapéuticos para tratar estados que implican células endoteliales. Debido a que una importante función de las células endoteliales es la angiogénesis, o la formación de vasos sanguíneos, los heteromultímeros de la invención son particularmente útiles para tratar estados que implican angiogénesis incluyendo, por ejemplo, tumores sólidos, metástasis tumorales y tumores benignos. Tales tumores y trastornos relacionados se conocen bien en la técnica e

15 incluyen, por ejemplo, melanoma, tumores del sistema nervioso central, tumores neuroendocrinos, sarcoma, mieloma múltiple así como cáncer de mama, de pulmón, de próstata, de colon, de cabeza y cuello y de ovarios. Se enumeran tumores adicionales y trastornos relacionados en la tabla 1 de la patente estadounidense n.º 6.025.331, presentada el 15 de febrero de 2000 concedida a Moses, *et al.* Los tumores benignos incluyen, por ejemplo, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas y granulomas piogénicos. Otras enfermedades relevantes que implican angiogénesis incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad ocular, tal como retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasias retrolentales, rebeosis, síndrome de Osler-Webber, angiogénesis miocárdica, neovascularización de placas, telangiectasia, articulaciones hemofílicas, angiofibroma y granulación de heridas. Otras enfermedades o estados relevantes que implican el crecimiento de vasos sanguíneos incluyen adhesiones

20 intestinales, aterosclerosis, esclerodermia y cicatrices hipertróficas, y úlceras. Además, los heteromultímeros de la presente invención pueden usarse para reducir o prevenir la neovascularización uterina requerida para la implantación del embrión, por ejemplo, como agente de control de la natalidad.

30 Para la detección de la diana en disolución, un heteromultímero según la invención puede marcarse de manera detectable, por ejemplo, marcarse fluorescentemente, marcarse enzimáticamente o marcarse con un radionúclido o metal paramagnético o unirse a burbujas, luego ponerse en contacto con la disolución y después de eso puede detectarse la formación de un complejo entre el heteromultímero y la diana. Como ejemplo, puede usarse un constructo heteromultimérico de unión a KDR o complejo VEGF/KDR marcado fluorescentemente para ensayos de detección de KDR o complejo VEGF/KDR *in vitro*, en los que el constructo heteromultimérico se añade a una

35 disolución que va a someterse a una prueba para detectar KDR o complejo VEGF/KDR en condiciones que permiten que se produzca la unión. El complejo entre el heteromultímero de unión a KDR o complejo VEGF/KDR marcado fluorescentemente y la diana de KDR o complejo VEGF/KDR puede detectarse y cuantificarse midiendo el aumento de polarización de fluorescencia que surge del heteromultímero unido a KDR o complejo VEGF/KDR en relación con la del heteromultímero libre. Pueden usarse de manera similar heteromultímeros que comprenden restos de unión a

40 cMet.

Alternativamente, puede usarse un ensayo "ELISA" de tipo sándwich, en el que se inmoviliza un constructo heteromultimérico sobre un soporte sólido tal como un pocillo o tubo de plástico, entonces la disolución que se sospecha que contiene la diana se pone en contacto con el constructo heteromultimérico inmovilizado, se eliminan

45 por lavado los materiales de no unión y se detecta la diana complejada usando un reactivo de detección adecuado, tal como un anticuerpo monoclonal que reconoce la diana. El anticuerpo monoclonal puede detectarse por medios convencionales conocidos en la técnica, incluyendo que esté marcado de manera detectable, por ejemplo, radiomarcado, conjugado con una enzima tal como peroxidasa del rábano o marcado fluorescentemente.

50 Por ejemplo, para la detección o purificación de diana soluble en o a partir de una disolución, pueden inmovilizarse heteromultímeros de la invención sobre un sustrato sólido tal como un soporte cromatográfico u otro material de matriz, luego el heteromultímero inmovilizado puede cargarse o ponerse en contacto con la disolución en condiciones adecuadas para la formación de un complejo heteromultímero:diana. La parte de no unión de la disolución puede eliminarse y el complejo puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo contra la diana, tal

55 como un anticuerpo anti-polipéptido de unión (por ejemplo, anticuerpo anti-KDR, anti-complejo VEGF/KDR, anti-cMet, o anti-complejo cMet/HGF), o el complejo heteromultímero:diana puede liberarse del resto de unión en condiciones de elución apropiadas.

60 La biología de la angiogénesis y los papeles de VEGF y KDR en el inicio y el mantenimiento de la misma se han investigado por muchos investigadores y continúa siendo un campo activo para la investigación y el desarrollo. En apoyo de tal investigación y desarrollo, es deseable un método de purificación de cantidades a granel de KDR o complejo VEGF/KDR en forma pura, y los heteromultímeros de KDR y complejo VEGF/KDR descritos en el presente documento son especialmente útiles para ese fin, usando la metodología de purificación general descrita anteriormente. De manera similar, la biología de tumores y otros tejidos hiperproliferativos y los papeles de cMet y

65 HGF en el inicio y el mantenimiento de estos se han investigado por muchos investigadores y continúa siendo un campo activo para la investigación y el desarrollo. En apoyo de tal investigación y desarrollo, es deseable un método

de purificación de cantidades a granel de cMet o complejo HGF/cMet en forma pura, y los heteromultímeros de cMet o complejo HGF/cMet descritos en el presente documento son especialmente útiles para ese fin, usando la metodología de purificación general descrita anteriormente.

##### 5 Obtención de imágenes de diagnóstico

Pueden usarse constructos heteromultiméricos marcados apropiadamente de la presente invención en aplicaciones de diagnóstico *in vivo* para obtener imágenes de trastornos celulares o tejidos específicos. Un uso particularmente preferido para los constructos heteromultiméricos según la presente invención es para crear imágenes legibles visualmente de tejido que expresa o contiene una diana. Para esta realización, los heteromultímeros de la invención se conjugan con un marcador apropiado para la detección de diagnóstico, opcionalmente por medio de un ligador. Ligadores adecuados pueden ser cadenas de alquilo sustituidas o no sustituidas, cadenas de aminoácido (por ejemplo, poliglicina), polietilenglicoles, poliamidas y otros ligadores poliméricos sencillos conocidos en la técnica. Preferiblemente, se conjuga o se une un heteromultímero que presenta una especificidad mucho mayor por la diana que por otras proteínas séricas a un marcador apropiado para la metodología de detección que va a emplearse. Por ejemplo, pueden conjugarse heteromultímeros de la invención con o sin un ligador con un quelato paramagnético adecuado para obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), con un radiomarcador adecuado para obtención de imágenes por rayos X, PET o escintigráficas (incluyendo si es necesario un quelante, tal como los descritos en el presente documento, para un metal radiactivo) con un agente de contraste por ultrasonidos (por ejemplo a una microburbuja estabilizada, un microbalón, una microesfera o lo que se ha denominado "liposoma" relleno de gas) adecuado para la detección por ultrasonidos, o con un colorante de obtención de imágenes óptica.

Por ejemplo, pueden usarse constructos heteromultiméricos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR de la invención o constructos heteromultiméricos de unión a complejo de HGF o cMet de la invención para obtener imágenes de tumores neoplásicos, que requieren angiogénesis para la supervivencia y metástasis, u otros sitios de actividad angiogénica. En esta realización, se convierten constructos heteromultiméricos que incluyen polipéptidos de unión a KDR y complejo VEGF/KDR o polipéptidos de unión a cMet o complejo HGF/cMet en reactivos de obtención de imágenes mediante conjugación con un marcador apropiado para la detección de diagnóstico, opcionalmente por medio de un ligador, tal como se describe en el presente documento.

En general, la técnica de uso de un constructo heteromultimérico marcado de manera detectable se basa en la premisa de que el marcador genera una señal que puede detectarse fuera del cuerpo del paciente. Por ejemplo, en una realización, cuando se administra un heteromultímero marcado de manera detectable de la invención al paciente en el que está produciéndose angiogénesis, por ejemplo, debido a un tumor, la alta afinidad de los restos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR incluidos en los constructos heteromultiméricos para KDR o complejo VEGF/KDR provoca que el constructo heteromultimérico se una al sitio de angiogénesis y se acumule marcador en el sitio de angiogénesis. Se permite un tiempo suficiente para que el constructo heteromultimérico marcado se localice en el sitio de angiogénesis. La señal generada por el péptido marcado se detecta mediante un dispositivo de exploración que variará según el tipo de marcador usado, y la señal se convierte entonces en una imagen del sitio de angiogénesis.

En otra realización, en vez de marcar directamente un heteromultímero de la invención con un marcador detectable o constructo radioterápico, pueden conjugarse heteromultímeros de la invención con, por ejemplo, avidina, biotina o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se unirá al marcador detectable o agente radioterápico. Por ejemplo, en una realización, pueden conjugarse heteromultímeros con estreptavidina o avidina para la unión *in vivo* a células que expresan o contienen la diana. Tras haberse aclarado el heteromultímero no unido del cuerpo, puede infundirse un marcador detectable biotinilado o constructo radioterápico (por ejemplo una molécula de quelato complejada con un metal radiactivo) que se concentrará rápidamente en el sitio en el que se une el constructo de direccionamiento. Este enfoque en algunas situaciones puede reducir el tiempo requerido tras administrar el marcador detectable hasta que puede tener lugar la obtención de imágenes. También puede aumentar la razón de señal con respecto a ruido en el sitio diana, y disminuir la dosis del marcador detectable o constructo radioterápico requerida. Esto es particularmente útil cuando se disminuye un marcador radiactivo o agente radioterápico que se usa como dosis de radiación que se administra a sitios normales pero sensibles a la radiación en el cuerpo, tal como médula ósea, riñones e hígado. Este enfoque, denominado algunas veces enfoques de predireccionamiento o de dos etapas, o de tres etapas se revisó por S.F. Rosebrough (Q. J. Nucl. Med. 40:234-251; 1996). En una realización preferida, se usan constructos heteromultiméricos que incluyen restos de unión a KDR o VEGF/KDR. En otra realización preferida, se usan constructos heteromultiméricos que incluyen restos de unión a cMet o HGF/cMet.

##### A. *Obtención de imágenes por resonancia magnética*

Los heteromultímeros de la presente invención pueden conjugarse ventajosamente con uno o más quelatos de metales paramagnéticos con el fin de formar un agente de contraste para su uso en MRI. Los iones de metales paramagnéticos preferidos tienen números atómicos de 21-29, 42, 44 ó 57-83. Esto incluye iones de la serie de metales de transición o lantánidos que tienen uno, y más preferiblemente cinco o más, electrones desapareados y un momento magnético de al menos 1,7 magnetones de Bohr. Los metales paramagnéticos preferidos incluyen cromo (III), manganeso (II), manganeso (III), hierro (II), hierro (III), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), praseodimio (III),

neodimio (III), samario (III), gadolinio (III), terbio (III), disprosio (III), holmio (III), erbio (III), europio (III) e iterbio (III). Adicionalmente, también pueden conjugarse heteromultímeros de la presente invención con una o más partículas superparamagnéticas.

- 5 Se prefiere particularmente Gd (III) para MRI debido a su alta relaxividad y baja toxicidad, y la disponibilidad de sólo un estado de oxidación accesible biológicamente. Se han usado quelatos de Gd (III) para aplicaciones de MR clínicas y radiológicas desde 1988, y aproximadamente el 30% de los exámenes de MR emplean actualmente un agente de contraste a base de gadolinio.
- 10 Un experto en la técnica seleccionará un metal según la dosis requerida para detectar tejido que contiene la diana y considerando otros factores tales como la toxicidad del metal para el sujeto. Véase, Tweedle *et al.*, *Magnetic Resonance Imaging* (2ª ed.), vol. 1, Partain *et al.*, eds. (W.B. Saunders Co. 1988), págs. 796-7. Generalmente, la dosis deseada para un metal individual será proporcional a su relaxividad, modificada por la biodistribución, farmacocinética y metabolismo del metal. El catión trivalente,  $Gd^{3+}$  se prefiere particularmente para agentes de
- 15 contraste de MRI, debido a su alta relaxividad y baja toxicidad, con la ventaja adicional de que existe en sólo un estado de oxidación accesible biológicamente, lo que minimiza la metabolización no deseada del metal por un paciente. Otro metal útil es  $Cr^{3+}$ , que es relativamente económico.

El quelante de metal paramagnético es una molécula que tiene uno o más grupos polares que actúan como ligando para, y se complejan con, un metal paramagnético. Se conocen en la técnica quelantes adecuados e incluyen ácidos con grupos ácido metilfosfónico, grupos ácido de metilencarbohidroxamina, grupos carboximetilideno o grupos carboximetileno. Los ejemplos de quelantes incluyen ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclotetradecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-tricarboximetil-1,4,7,10-tetraazaciclododecanotriacético 1-sustituido (DO3A), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA). Ligandos de quelación adicionales son etilenbis-(2-hidroxi-fenilglicina) (EHPG), y derivados del mismo, incluyendo 5-Cl-EHPG, 5Br-EHPG, 5-Me-EHPG, 5t-Bu-EHPG y 5sec-Bu-EHPG; ácido benzodietilentriaminapentaacético (benzo-DTPA) y derivados del mismo, incluyendo dibenzo-DTPA, fenil-DTPA, difenil-DTPA, bencil-DTPA y dibencil-DTPA; ácido bis-2(hidroxibencil)-etilen-diaminadiacético (HBED) y derivados del mismo; la clase de compuestos macrocíclicos que contienen al menos 3 átomos de carbono,

20 más preferiblemente al menos 6 y al menos dos heteroátomos (O y/o N), compuestos macrocíclicos que consisten en un anillo, o dos o tres anillos unidos entre sí en los elementos de heteroanillo, por ejemplo, benzo-DOTA, dibenzo-DOTA y benzo-NOTA, en los que NOTA es ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N"-triacético, benzo-TETA, benzo-DOTMA, en el que DOTMA es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclotetradecano-1,4,7,10-tetra(metiltetraacético) y benzo-TETMA, en el que TETMA es ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-(metiltetraacético); derivados de ácido 1,3-propilendiaminatetraacético (PDTA) y ácido trielentetraaminahexaacético (TTHA); derivados de 1,5,10-N,N',N"-tris(2,3-dihidroxibenzoil)-tricatecolato (LICAM) y 1,3,5-N,N',N"-tris(2,3-dihidroxibenzoil)aminometilbenceno (MECAM). Un quelante preferido para su uso en la presente invención es DTPA. Se describen ejemplos de quelantes y grupos de quelación representativos contemplados por la presente invención en los documentos WO 98/18496, WO 86/06605, WO 91/03200, WO 95/28179, WO 96/23526, WO 97/36619, PCT/US98/01473,

25 PCT/US98/20182 y U.S. 4.899.755, U.S. 5.474.756, U.S. 5.846.519 y U.S. 6.143.274. Se prefiere particularmente el uso del quelato DO3A.

En una realización de la presente invención, el/los quelantes(s) del agente de contraste de MRI se acopla(n) con un heteromultímero, tal como, por ejemplo uno compuesto por polipéptidos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR o polipéptidos de unión a cMet o complejo HGF/cMet. El posicionamiento del/de los quelato(s) debe seleccionarse de modo que no interfiera con la afinidad o especificidad de unión del constructo heteromultimérico. Preferiblemente, el/los quelato(s) se añadirá(n) o bien al extremo N-terminal o bien al extremo C-terminal, sin embargo el/los quelato(s) también puede(n) unirse en cualquier lugar dentro de la secuencia. En realizaciones preferidas, un quelante que tiene un grupo ácido carboxílico central libre (por ejemplo, DTPA-Asp( $\beta$ -COOH)-OtBu) hace más fácil la unión al extremo N-terminal de un péptido de unión mediante la formación de un enlace amida. El/los quelato(s) podría(n) unirse también al extremo C-terminal con la ayuda de un ligador. Alternativamente, podría emplearse química de conjugación con isotiocianato como modo de unir el grupo isotiocianato apropiado que porta DTPA con un grupo amino libre en cualquier lugar dentro de la secuencia de péptido.

55 Por ejemplo, el heteromultímero puede unirse directa o covalentemente al/a los quelante(s) de metal (u otro marcador detectable), o puede acoplarse o conjugarse al/a los quelante(s) de metal usando un ligador, que puede ser uniones amida, urea, acetal, cetil, éster doble, carbonilo, carbamato, tiourea, sulfona, tioéster, éster, éter, disulfuro, lactona, imina, fosforilo o fosfodiéster; cadenas de alquilo saturadas o insaturadas sustituidas o no sustituidas; cadenas de aminoácido lineales, ramificadas o cíclicas de un único aminoácido o diferentes aminoácidos (por ejemplo, extensiones de los extremos N- o C-terminales de los restos de unión); cadenas de polietilenglicol, polioxitileno o polivinilpiridina derivatizadas o no derivatizadas; cadenas de poliamida sustituidas o no sustituidas; cadenas de poliamina, poliéster, polietilenimina, poliacrilato, poli(alcohol vinílico), poliglicerol u oligosacárido (por ejemplo, dextrano) derivatizadas o no derivatizadas; copolímeros de bloques alternos; ácidos malónico, succínico, glutárico, adípico y pimélico; ácido caproico; diaminas y dialcoholes sencillos; cualquiera de los otros ligadores dados a conocer en el presente documento; o cualquier otro ligador polimérico sencillo conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/18497, WO 98/18496). Preferiblemente el peso molecular del ligador

puede controlarse estrechamente. Los pesos moleculares pueden oscilar en tamaño entre menos de 100 y más de 1000. Preferiblemente el peso molecular del ligador es inferior a 100. Además, puede ser deseable utilizar un ligador que puede biodegradarse *in vivo* para proporcionar rutas de excreción eficaces para los reactivos de obtención de imágenes de la presente invención. Dependiendo de su locación dentro del ligador, tales funcionalidades biodegradables pueden incluir funcionalidades éster, doble éster, amida, fosfoéster, éter, acetal y cetal.

En general, pueden usarse métodos conocidos para acoplar el quelato de metal y un heteromultímero de la invención usando tales ligadores. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 95/28967, WO 98/18496, WO 98/18497 y la discusión en los mismos. Por ejemplo, puede unirse un heteromultímero a través del extremo N- o C-terminal de un resto de unión componente por medio de un enlace amida, por ejemplo, con un nitrógeno de estructura principal de coordinación de metal de un quelato de metal o con un brazo de acetato del propio quelato de metal. La presente invención contempla la unión del/de los quelato(s) en cualquier posición, siempre que el quelato de metal conserve la capacidad para unirse al metal estrechamente con el fin de minimizar la toxicidad. De manera similar, un resto de unión componente de un heteromultímero puede modificarse o alargarse con el fin de generar un locus para la unión a un quelato de metal, siempre que tal modificación o elongación no elimine su capacidad para unirse a la diana.

Pueden usarse reactivos de contraste de MRI preparados según las descripciones en el presente documento de la misma manera que reactivos de contraste de MRI convencionales. Cuando se obtienen imágenes de un tejido que contiene la diana tal como, por ejemplo, un sitio de angiogénesis, pueden preferirse determinadas técnicas de MR y secuencias de pulso para potenciar el contraste del sitio con respecto a los tejidos y la sangre de fondo. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, secuencias de angiografía de sangre negra que buscan hacer que la sangre sea oscura, tales como secuencias de eco de espín rápido (véase, por ejemplo, Alexander *et al.*, *Magnetic Resonance in Medicine*, 40(2): 298-310 (1998)) y secuencias de eco de gradiente de flujo dañado (véase, por ejemplo, Edelman *et al.*, *Radiology*, 177(1): 45-50 (1990)). Estos métodos también incluyen técnicas independientes del flujo que potencian la diferencia en el contraste, tales como secuencias preparadas de inversión-recuperación o secuencias preparadas de saturación-recuperación que aumentarán el contraste entre el tejido que contiene la diana, tal como un tumor angiogénico, y los tejidos de fondo. Finalmente, preparaciones de transferencia de magnetización también pueden mejorar el contraste con estos agentes (véase, por ejemplo, Goodrich *et al.*, *Investigative Radiology*, 31(6): 323-32 (1996)).

El reactivo marcado se administra al paciente en forma de una composición inyectable. El método de administración del agente de contraste de MRI es preferiblemente por vía parenteral, lo que significa por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía intratecal, por vía intersticial o por vía intracavitaria. Para obtener imágenes de angiogénesis activa, se prefiere administración intravenosa o intraarterial.

Para MRI, se contempla que el sujeto reciba una dosificación de agente de contraste suficiente para potenciar la señal de MR en la diana (por ejemplo un sitio de angiogénesis) al menos el 10%. Tras la inyección del constructo heteromultimérico que incluye el reactivo de MRI, se explora el paciente en la máquina de MRI para determinar la ubicación de cualquier sitio que contenga la diana. En entornos terapéuticos, tras la localización de la diana, puede administrarse inmediatamente un agente terapéutico o citotóxico, si es necesario, y el paciente puede explorarse posteriormente para visualizar el efecto terapéutico.

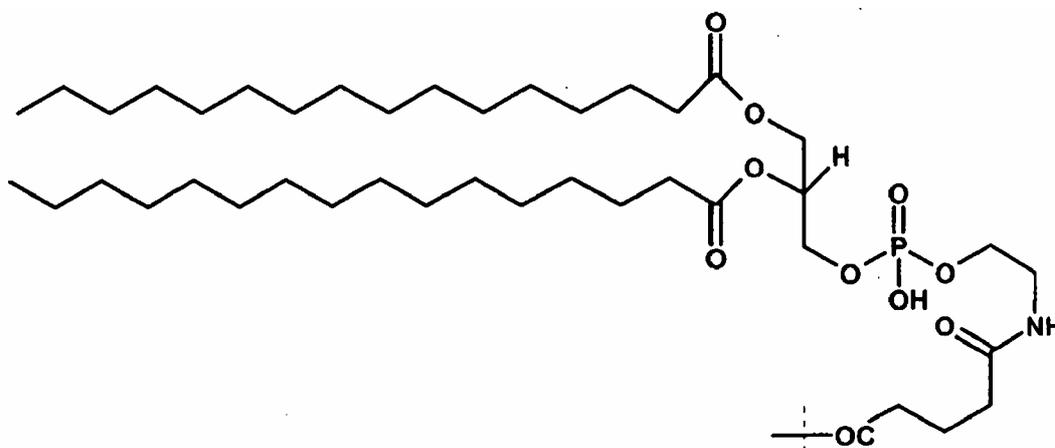
En una realización preferida, se conjugan heteromultímeros que incluyen restos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR con uno o más quelatos de metales paramagnéticos o una o más partículas superparamagnéticas, opcionalmente por medio de un ligador. En otra realización preferida, se usan constructos heteromultiméricos que incluyen restos de unión a cMet o complejo HGF/cMet. Tales constructos heteromultiméricos se complejan con uno o más metales paramagnéticos y se administran en una dosis suficiente para potenciar la señal de MR en el sitio de angiogénesis al menos el 10%. Tras la inyección, se explora el paciente para determinar la ubicación de cualquier sitio de angiogénesis (por ejemplo tumores angiogénicos, etc.) o tejido hiperproliferativo. Si es necesario, tras la ubicación de un sitio angiogénico o hiperproliferativo, puede administrarse un agente antiangiogénico o tumoricida, tal como, por ejemplo, un inhibidor de VEGF (o activación por VEGF de KDR). Si es necesario, el paciente puede explorarse de nuevo para visualizar/seguir la regresión tumoral, la detención de la angiogénesis, etc.

#### B. Obtención de imágenes por ultrasonidos

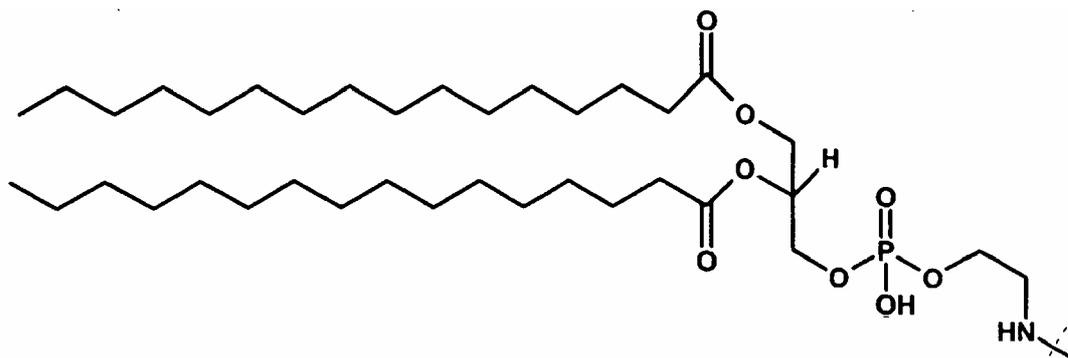
Cuando se transmiten ultrasonidos a través de una sustancia, las propiedades acústicas de la sustancia dependerán de la velocidad de las transmisiones y la densidad de la sustancia. Los cambios en las propiedades acústicas serán lo más prominentes en la superficie de contacto de diferentes sustancias (sólidos, líquidos, gases). Los agentes de contraste por ultrasonidos son intensos reflectores de las ondas de sonido debido a las diferencias acústicas entre el agente y el tejido circundante. Agentes de contraste por ultrasonidos que contienen gas o que generan gas son particularmente útiles debido a la diferencia acústica entre el líquido (por ejemplo, la sangre) y el agente de contraste por ultrasonidos que contiene gas o que genera gas. Debido a su tamaño, los agentes de contraste por ultrasonidos que comprenden microburbujas, microbalones, pueden permanecer durante un tiempo más prolongado en el torrente sanguíneo tras la inyección que otros restos detectables; por tanto un agente de ultrasonidos dirigido puede demostrar una obtención de imágenes superior del tejido que expresa o que contiene la diana.

En este aspecto de la invención, los constructos heteromultiméricos pueden incluir un material que es útil para la obtención de imágenes por ultrasonidos. Por ejemplo, pueden unirse heteromultímeros de la invención a materiales empleados para formar vesículas (por ejemplo, microburbujas, microbalones, microesferas, etc.), o emulsiones que contienen un líquido o gas que funciona como marcador detectable (por ejemplo, un gas ecogénico o material que puede generar un gas ecogénico). Los materiales para la preparación de tales vesículas incluyen tensioactivos, lípidos, esfingolípidos, oligolípidos, fosfolípidos, proteínas, polipéptidos, hidratos de carbono y materiales poliméricos sintéticos o naturales. Véanse por ejemplo los documentos WO 98/53857, WO 98/18498, WO 98/18495, WO 98/18497, WO 98/18496 y WO 98/18501.

Para agentes de contraste que comprenden suspensiones de microburbujas estabilizadas (una realización preferida), se prefieren fosfolípidos, y particularmente fosfolípidos saturados. Las microburbujas rellenas de gas preferidas pueden prepararse por medios conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante un método descrito en una cualquiera de las siguientes patentes: EP 554213, US 5.413.774, US 5.578.292, EP 744962, EP 682530, US 5.556.610, US 5.846.518, US 6.183.725, EP 474833, US 5.271.928, US 5.380.519, US 5.531.980, US 5.567.414, US 5.658.551, US 5.643.553, US 5.911.972, US 6.110.443, US 6.136.293, EP 619743, US 5.445.813, US 5.597.549, US 5.686.060, US 6.187.288 y US 5.908.610. En una realización preferida, al menos uno de los restos de fosfolípido tiene la estructura de fórmula 18 o fórmula 19 mostrada a continuación y descrita en la patente estadounidense n.º U.S. 5.686.060.



18



19

Los ejemplos de fosfolípidos adecuados incluyen ésteres de glicerol con una o dos moléculas de ácidos grasos (iguales o diferentes) y ácido fosfórico, en los que el residuo de ácido fosfórico está unido a su vez a un grupo hidrófilo, tal como colina, serina, inositol, glicerol, etanolamina. Los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos son en general ácidos alifáticos de cadena larga, que contienen normalmente desde 12 hasta 24 átomos de carbono, preferiblemente desde 14 hasta 22, que pueden estar saturados o pueden contener una o más 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 linoléico. Monoésteres de fosfolípido también se conocen en la técnica como formas "liso" de los fosfolípidos.

Ejemplos adicionales de fosfolípidos son ácidos fosfatídicos, es decir los diésteres de ácido glicerol-fosfórico con ácidos grasos, esfingomielinas, es decir los análogos de fosfatidilcolina en los que el residuo de diéster de glicerol con ácidos grasos se reemplaza por una cadena de ceramida, cardiolipinas, es decir los ésteres de 1,3-difosfatidilglicerol con un ácido graso, gangliósidos, cerebrosidos, etc.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término fosfolípidos incluye o bien productos que se producen de manera natural, semisintéticos o bien preparados de manera sintética que pueden emplearse o bien de manera individual o bien como mezclas.

10 Ejemplos de fosfolípidos que se producen de manera natural son lecitinas (derivados de fosfatidilcolina (PC)) tales como, normalmente, lecitina de soja o yema de huevo.

Ejemplos de fosfolípidos semisintéticos son los derivados parcial o completamente hidrogenados de las lecitinas que se producen de manera natural.

15 Ejemplos de fosfolípidos sintéticos son, por ejemplo, dilauriloil-fosfatidilcolina ("DLPC"), dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"), dipalmitoil-fosfatidilcolina ("DPPC"), diaraquidoilfosfatidilcolina ("DAPC"), distearoilfosfatidilcolina ("DSPC"), 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina ("MPPC"), 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina ("PMPC"), 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina ("PSPC"), 1-estearoil-2-palmitoil-fosfatidilcolina ("SPPC"), dioleoilfosfatidilcolina ("DOPC"), 20 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (Etil-DSPC), dilauriloil-fosfatidilglicerol ("DLPG") y sus sales de metales alcalinos, diaraquidoilfosfatidilglicerol ("DAPG") y sus sales de metales alcalinos, dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG") y sus sales de metales alcalinos, dipalmitoil-fosfatidilglicerol ("DPPG") y sus sales de metales alcalinos, distearoilfosfatidilglicerol ("DSPG") y sus sales de metales alcalinos, dioleoilfosfatidilglicerol ("DOPG") y sus sales de metales alcalinos, ácido dimiristoilfosfatídico ("DMPA") y sus sales de metales alcalinos, ácido dipalmitoilfosfatídico ("DPPA") y sus sales de metales alcalinos, ácido distearoilfosfatídico ("DSPA"), ácido diaraquidoilfosfatídico ("DAPA") y sus sales de metales alcalinos, dimiristoilfosfatidil-etanolamina ("DMPE"), dipalmitoilfosfatidiletanolamina ("DPPE"), diestearoilfosfatidil-etanolamina ("DSPE"), dimiristoilfosfatidilserina ("DMPS"), diaraquidoilfosfatidilserina ("DAPS"), dipalmitoilfosfatidilserina ("DPPS"), diestearoilfosfatidilserina ("DSPS"), dioleoilfosfatidilserina ("DOPS"), dipalmitoilesfingomielina ("DPSP") y diestearoilesfingomielina ("DSSP").

25 Otros fosfolípidos preferidos incluyen dipalmitoilfosfatidilcolina, ácido dipalmitoilfosfatídico y dipalmitoilfosfatidilserina. Las composiciones también pueden contener PEG-4000 y/o ácido palmítico. Puede emplearse cualquiera de los gases dados a conocer en el presente documento o conocidos por el experto en la técnica; sin embargo, se prefieren gases inertes, tales como SF<sub>6</sub>, o fluorocarbonos, tales como CF<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> y C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>.

35 Las suspensiones de microburbujas preferidas pueden prepararse a partir de fosfolípidos usando procedimientos conocidos tales como un secado por congelación o secado por pulverización de las disoluciones de los fosfolípidos en bruto en un disolvente adecuado o usando los procedimientos expuestos en los documentos EP 554213, US 5.413.774, US 5.578.292, EP 744962, EP 682530, US 5.556.610, US 5.846.518, US 6.183.725, EP 474833, US 5.271.928, US 5.380.519, US 5.531.980, US 5.567.414, US 5.658.551, US 5.643.553, US 5.911.972, US 6.110.443, US 6.136.293, EP 619743, US 5.445.813, US 5.597.549, US 5.686.060, US 6.187.288 y US 5.908.610. Lo más preferiblemente, los fosfolípidos se disuelven en un disolvente orgánico y la disolución se seca sin pasar a través de una fase de formación de liposomas. Esto puede realizarse disolviendo los fosfolípidos en un disolvente orgánico adecuado junto con una sustancia estabilizadora hidrófila o un compuesto soluble tanto en el disolvente orgánico 45 como en agua y secando por congelación o secando por pulverización la disolución. En esta realización los criterios usados para la selección del estabilizador hidrófilo son su solubilidad en el disolvente orgánico de elección. Ejemplos de compuestos estabilizadores hidrófilos solubles en agua y el disolvente orgánico son por ejemplo un polímero, como polivinilpirrolidona (PVP), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), etc., ácido málico, ácido glicólico, maltol y similares. Tales compuestos hidrófilos también ayudan en la homogeneización de la distribución de tamaño de las microburbujas y potencian la estabilidad en almacenamiento. Puede usarse cualquier disolvente orgánico adecuado siempre que su punto de ebullición sea suficientemente bajo y su punto de fusión sea suficientemente alto como para facilitar el secado posterior. Los disolventes orgánicos típicos incluyen, por ejemplo, dioxano, ciclohexanol, butanol terciario, tetraclorodifluoroetileno (C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>F<sub>2</sub>) o 2-metil-2-butanol; sin embargo, se prefieren 2-metil-2-butanol y C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>F<sub>2</sub>.

55 Antes de la formación de la suspensión de microburbujas mediante dispersión en un portador acuoso, los polvos de fosfolípidos secados por congelación o secados por pulverización se ponen en contacto con aire u otro gas. Cuando se ponen en contacto con el portador acuoso, los fosfolípidos en polvo cuya estructura se ha alterado formarán segmentos lamelarizados o laminarizados que estabilizarán las microburbujas del gas dispersadas en los mismos. Este método permite la producción de suspensiones de microburbujas que son estables incluso cuando se 60 almacenan durante periodos prolongados y se obtienen mediante la disolución simple de los fosfolípidos laminarizados secados (que se han almacenado bajo un gas deseado) sin remover o ninguna agitación violenta.

65 Alternativamente, pueden prepararse microburbujas suspendiendo un gas en una disolución acuosa a alta velocidad de agitación, tal como se da a conocer por ejemplo en el documento WO 97/29783. Un procedimiento adicional para preparar microburbujas se da a conocer en la solicitud de patente europea en tramitación junto con la presente n.<sup>9</sup>

03002373, que comprende preparar una emulsión de un disolvente orgánico en un medio acuoso en presencia de un fosfolípido y posteriormente liofilizar dicha emulsión, tras etapas de lavado y/o filtración opcionales.

5 Pueden incluirse aditivos conocidos por los expertos habituales en la técnica en las suspensiones de microburbujas estabilizadas. Por ejemplo, pueden añadirse tensioactivos que no forman película, incluyendo polioxipropilenglicol y polioxietilenglicol y compuestos similares, así como diversos copolímeros de los mismos; ácidos grasos tales como ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico o sus derivados, ergosterol, fitosterol, sitosterol, lanosterol, tocoferol, galato de propilo, palmitato de ascorbilo e hidroxitolueno butilado. La cantidad de estos  
10 tensioactivos que no forman película es habitualmente de hasta el 50% en peso de la cantidad total de tensioactivos pero preferiblemente de entre el 0 y el 30% en peso.

Otras suspensiones que contienen gas incluyen las dadas a conocer en, por ejemplo, los documentos US 5.798.091 y WO 97/29783. Estos agentes pueden prepararse tal como se describe en los documentos US 5.798.091 o  
15 WO97/29783.

Otro agente de contraste por ultrasonidos preferido comprende microbalones. El término "microbalón" se refiere a cuerpos rellenos de gas con una envuelta o límite material. Puede encontrarse más sobre formulaciones de microbalones y métodos de preparación en los documentos EP-A-0 324 938; US 4.844.882; US 5.711.933; US 5.840.275; US 5.863.520; US 6.123.922; US 6.200.548; US 4.900.540; US 5.123.414; US 5.230.882; 5.469.854; 5.585.112; US 4.718.433; US 4.774.958; WO 9501187; US 5.529.766; US 5.536.490 y US 5.990.263.  
20

Los microbalones preferidos tienen una envuelta que incluye un polímero compatible fisiológicamente biodegradable o un lípido sólido biodegradable. Los polímeros útiles para la preparación de los microbalones de la presente invención pueden seleccionarse de los polímeros compatibles fisiológicamente biodegradables, tales como cualquiera de los descritos en cualquiera de las siguientes patentes: EP 458745, US 5.711.933, US 5.840.275, EP 554213, US 5.413.774 y US 5.578.292. En particular, el polímero puede seleccionarse de polímeros compatibles fisiológicamente biodegradables, tales como polisacáridos de baja solubilidad en agua, polilactidas y poliglicolidas y sus copolímeros, copolímeros de lactidas y lactonas tales como  $\epsilon$ -caprolactona,  $\gamma$ -valerolactona y polipéptidos. Otros polímeros adecuados incluyen poli(orto)ésteres (véanse por ejemplo, los documentos US 4.093.709; US 4.131.648; US 4.138.344; US 4.180.646); poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico) y sus copolímeros, por ejemplo DEXON (véase J. Heller, Biomaterials 1 (1980), 51; poli(DL-lactida-co- $\epsilon$ -caprolactona), poli(DL-lactida-co- $\gamma$ -valerolactona), poli(DL-lactida-co- $\gamma$ -butirolactona), poli(cianoacrilatos de alquilo); poliamidas, polihidroxibutirato; polidioxanona; poli- $\beta$ -aminocetonas (A. S. Angeloni, P. Ferruti, M. Tramontini y M. Casolaro, The Mannich bases in polymer synthesis: 3. Reduction of poli(beta-aminoketone)s to poli(gamma-aminoalcohol)s and their N-alkylation to poli(gamma-hidroxi-  
30 hidroxi)quaternary ammonium salts, Polymer 23, págs. 1693-1697, 1982); polifosfazenos (Allcock, Harry R. Polyphosphazenes: new polymers with inorganic backbone atoms (Science 193(4259), 1214-19 (1976)) y polianhídridos. Los microbalones de la presente invención también pueden prepararse según los métodos del documento WO-A-96/15815, en el que los microbalones se producen a partir de una membrana biodegradable que comprende lípidos biodegradables, seleccionados preferiblemente de mono- di-, tri-glicéridos, ácidos grasos, esteroides, ceras y mezclas de los mismos. Lípidos preferidos son di o tri-glicéridos, por ejemplo di- o tri-miristina, -palmitina o -estearina, en particular tripalmitina o triestearina.  
40

Los microbalones pueden emplear cualquiera de los gases dados a conocer en el presente documento o conocidos por el experto en la técnica; sin embargo, se prefieren gases inertes tales como gases fluorados. Los microbalones pueden suspenderse en un portador líquido farmacéuticamente aceptable con aditivos opcionales conocidos por los expertos habituales en la técnica y estabilizadores.  
45

Otras formulaciones de agentes de contraste que contienen gas incluyen micropartículas (especialmente agregados de micropartículas) que tienen gas contenido en las mismas o asociado de otra forma con las mismas (por ejemplo adsorbido sobre la superficie de las mismas y/o contenido dentro de huecos, cavidades o poros en las mismas). Métodos para la preparación de estos agentes son tal como se describe en los documentos EP 0122624, EP 0123235, EP 0365467, US 5.558.857, US 5.607.661, US 5.637.289, US 5.558.856, US 5.137.928, WO 9521631 y WO 9313809.  
50

Cualquiera de estas composiciones de ultrasonidos también deben ser, tanto como sea posible, isotónicas con la sangre. Por tanto, antes de la inyección, pueden añadirse pequeñas cantidades de agentes isotónicos a cualquiera de las suspensiones de agentes de contraste por ultrasonidos anteriores. Los agentes isotónicos son disoluciones fisiológicas usadas comúnmente en medicina y comprenden solución salina acuosa (NaCl al 0,9%), disolución de glicerol al 2,6%, disolución de dextrosa al 5%, etc. Adicionalmente, las composiciones de ultrasonidos pueden incluir aditivos farmacéuticamente aceptables convencionales, incluyendo, por ejemplo, agentes emulsionantes, modificadores de la viscosidad, crioprotectores, lioprotectores, agentes de carga, etc.  
60

Puede usarse cualquier gas biocompatible en los agentes de contraste por ultrasonidos útiles en la invención. El término "gas" tal como se usa en el presente documento incluye cualquier sustancia (incluyendo mezclas) sustancialmente en forma gaseosa a la temperatura normal del cuerpo humano. El gas puede incluir por tanto, por ejemplo, aire; nitrógeno; oxígeno; CO<sub>2</sub>; argón; xenón o kriptón, gases fluorados (incluyendo por ejemplo,  
65

perfluorocarbonos, SF<sub>6</sub>, SeF<sub>6</sub>) un hidrocarburo de bajo peso molecular (por ejemplo que contiene desde 1 hasta 7 átomos de carbono), por ejemplo, un alcano tal como metano, etano, un propano, un butano o un pentano, un cicloalcano tal como ciclopropano, ciclobutano o ciclopenteno, un alqueno tal como etileno, propeno, propadieno o un buteno, o un alquino tal como acetileno o propino y/o mezclas de los mismos. Sin embargo, se prefieren gases fluorados. Los gases fluorados incluyen materiales que contienen al menos un átomo de flúor tal como SF<sub>6</sub>, freones (compuestos orgánicos que contienen uno o más átomos de carbono y flúor, es decir CF<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>, CBrF<sub>3</sub>, CClF<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>ClF<sub>5</sub> y CBrClF<sub>2</sub>) y perfluorocarbonos. El término perfluorocarbono se refiere a compuestos que contienen sólo átomos de carbono y flúor e incluye, en particular, perfluorocarbonos saturados, insaturados y cíclicos. Los perfluorocarbonos saturados, que se prefieren habitualmente, tienen la fórmula C<sub>n</sub>F<sub>n+2</sub>, en la que n es de desde 1 hasta 12, preferiblemente desde 2 hasta 10, lo más preferiblemente desde 3 hasta 8 e incluso más preferiblemente desde 3 hasta 6. Los perfluorocarbonos adecuados incluyen, por ejemplo, CF<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>, C<sub>5</sub>F<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>F<sub>12</sub>, C<sub>7</sub>F<sub>14</sub>, C<sub>8</sub>F<sub>18</sub> y C<sub>9</sub>F<sub>20</sub>. Lo más preferiblemente el gas o la mezcla de gases comprende SF<sub>6</sub> o un perfluorocarbono seleccionado del grupo que consiste en C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>, C<sub>5</sub>F<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>F<sub>12</sub>, C<sub>7</sub>F<sub>14</sub>, C<sub>8</sub>F<sub>18</sub>, siendo particularmente preferido C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>. 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 y WO 98/17324.

En determinadas circunstancias puede ser deseable incluir un precursor para una sustancia gaseosa (por ejemplo un material que puede convertirse en un gas *in vivo*, denominado a menudo "precursor de gas"). Preferiblemente el precursor de gas y el gas que produce son fisiológicamente aceptables. El precursor de gas puede estar activado por pH, activado por luz, activado por temperatura, etc. Por ejemplo, pueden usarse determinados perfluorocarbonos como precursores de gas activados por temperatura. Estos perfluorocarbonos, tales como perfluoropentano, tienen una temperatura de transición de fase líquida/gaseosa por encima de la temperatura ambiente (o la temperatura a la que se producen y/o almacenan los agentes) pero por debajo de la temperatura corporal; por tanto, experimentan un desplazamiento de fase y se convierten en un gas dentro del cuerpo humano.

Tal como se comenta, el gas puede incluir 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 el 0,5 - 41% en vol., tiene un peso molecular mayor de 80 daltons y es un gas fluorado y (A) se selecciona del grupo que consiste en aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono y mezclas de los mismos, siendo el resto de la mezcla gas A.

Puesto que las vesículas de ultrasonidos pueden ser más grandes que otros marcadores detectables descritos en el presente documento, pueden unirse a o conjugarse con una pluralidad de constructos heteromultiméricos con el fin de aumentar la eficacia de direccionamiento del agente. La unión a los agentes de contraste por ultrasonidos descritos anteriormente (o conocidos por los expertos en la técnica) puede ser por medio de enlace covalente directo entre un polipéptido de unión y el material usado para preparar la vesícula o por medio de un ligador, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, véase el documento WO 98/53857 en general para una descripción de la unión de un péptido a un ligador de PEG bifuncional, que entonces se hace reaccionar con una composición de liposomas. Véase también, Lanza *et al.*, *Ultrasound in Med. & Bio.*, 23(6): 863-870 (1997).

Pueden usarse varios métodos para preparar suspensiones de microburbujas conjugadas con heteromultímeros. Por ejemplo, pueden prepararse microburbujas derivatizadas con maleimida incorporando el 5 % (p/p) de N-MPB-PE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-4-(p-maleimido-fenilbutiramida), (Avanti Polar-Lipids, Inc) en la formulación de fosfolípidos. Entonces, se añaden disoluciones de heteromultímeros mercaptoacetilados (10 mg/ml en DMF), que se han incubado en disolución de desacetilación (fosfato de sodio 50 mM, EDTA 25 mM, hidroxilamina HCl 0,5 M, pH 7,5) a la suspensión de microburbujas activadas con maleimida. Tras la incubación en la oscuridad, bajo agitación suave, las microburbujas conjugadas con heteromultímeros pueden purificarse mediante centrifugación.

Los compuestos que pueden usarse para la derivatización de microburbujas incluyen normalmente los siguientes componentes: (a) una parte hidrófoba, compatible con el material que forma la envuelta de la microburbuja o del microbalón, con el fin de permitir una incorporación eficaz del compuesto en la envuelta de la vesícula; dicha parte está representada normalmente por un resto lipídico (dipalmitina, diestearoilo); y (b) un espaciador (normalmente PEG de diferentes pesos moleculares), que puede ser opcional en algunos casos (las microburbujas por ejemplo pueden presentar dificultades para secarse por congelación si el espaciador es demasiado largo por ejemplo) o preferirse en algunos otros (por ejemplo los péptidos pueden ser menos activos cuando se conjugan con un microbalón con espaciadores cortos); y (c) un grupo reactivo que puede reaccionar con un resto de reacción correspondiente en el péptido que va a conjugarse (por ejemplo maleimido con el grupo -SH de cisteína).

Alternativamente, pueden prepararse heteromultímeros conjugados con microburbujas usando biotina/avidina. Por ejemplo, pueden prepararse microburbujas conjugadas con avidina usando una suspensión de microburbujas de fosfolípidos activadas con maleimida, preparada tal como se describió anteriormente, que se añade a avidina mercaptoacetilada (que se ha incubado con disolución de desacetilación). Entonces se añaden heteromultímeros biotinilados (preparados tal como se describe en el presente documento) a la suspensión de microburbujas conjugadas con avidina, produciendo una suspensión de microburbujas conjugadas con los heteromultímeros.

A menos que contenga un gas hiperpolarizado, que se sabe que requiere condiciones de almacenamiento especiales, el residuo liofilizado puede almacenarse y transportarse sin necesidad de control de la temperatura de su entorno y en particular puede suministrarse a hospitales y médicos para una formulación en el sitio para dar una suspensión administrable lista para usar sin requerir que tales usuarios tengan instalaciones de almacenamiento especiales. Preferiblemente en un caso de este tipo, puede suministrarse en forma de un kit de dos componentes, que puede incluir dos recipientes separados o un recipiente de doble cámara. En el primer caso, preferiblemente el recipiente es un vial sellado con tapón de goma convencional, en el que el vial que contiene el residuo liofilizado de la etapa b) se sella con un tapón de goma a través del cual puede inyectarse el portador usando una jeringa precargada opcionalmente. En un caso de este tipo, la jeringa usada como recipiente del segundo componente también se usa entonces para inyectar el agente de contraste. En el último caso, preferiblemente el recipiente de doble cámara es una jeringa de doble cámara y una vez que el liofilizado se ha reconstituido y luego mezclado adecuadamente o agitado suavemente, el recipiente puede usarse directamente para inyectar el agente de contraste. En ambos casos, se proporcionan medios para dirigir o permitir la aplicación de energía de formación de burbujas suficiente al contenido del recipiente. Sin embargo, tal como se indicó anteriormente, en los agentes de contraste estabilizados según la invención, el tamaño de las microburbujas de gas es sustancialmente independiente de la cantidad de energía de agitación aplicada al producto secado reconstituido. Por consiguiente, no se requiere más que agitación manual suave generalmente para dar productos reproducibles con un tamaño de microburbuja constante.

Pueden usarse otros sistemas de reconstitución de dos cámaras que pueden combinar el polvo secado con la disolución acuosa de una manera estéril. En tales sistemas, es particularmente ventajoso si la fase acuosa puede interponerse entre el gas insoluble en agua y el entorno, para aumentar la semivida del producto. Cuando un material necesario para formar el agente de contraste no está ya presente en el recipiente (por ejemplo un ligando de direccionamiento que va a unirse al fosfolípido durante la reconstitución), puede envasarse con los otros componentes del kit, preferiblemente en una forma o un recipiente adaptado para facilitar una fácil combinación con los otros componentes del kit.

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 sello entre el tapón y el recipiente. La calidad del sello, por tanto, se convierte en un tema de preocupación principal; cualquier degradación de la integridad del sello podría permitir que entren sustancias no deseadas en el vial. Además de garantizar la esterilidad, es esencial la retención del vacío para productos tapados a presiones ambientales o reducidas para garantizar una reconstitución segura y apropiada. En cuanto al tapón, puede ser un compuesto o formulación de múltiples componentes basada en un elastómero, tal como poli(isobutileno) o caucho de butilo.

Las técnicas de obtención de imágenes por ultrasonidos que pueden usarse según la presente invención incluyen técnicas conocidas, tales como técnicas de obtención de imágenes doppler a color, doppler de potencia, amplitud doppler, acústica estimulada y obtención de imágenes bi o tridimensional. La obtención de imágenes puede realizarse en modos armónico (frecuencia resonante) o fundamental, prefiriéndose el segundo armónico.

En aplicaciones de ultrasonidos, los agentes de contraste formados por microburbujas de fosfolípidos estabilizadas pueden administrarse, por ejemplo, en dosis tales que la cantidad de fosfolípido inyectada está en el intervalo de 0,1 a 200 µg/kg de peso corporal, preferiblemente desde aproximadamente 0,1 hasta 30 µg/kg. Se administran normalmente agentes de contraste que contienen microbalones en dosis tales que la cantidad de polímero o lípido que forma la pared es de desde aproximadamente 10 µg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal.

En una realización preferida, los agentes de contraste por ultrasonidos descritos en el presente documento se conjugan con uno o más heteromultímeros compuestos por restos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR, y tejido diana que expresa KDR. Estos agentes de contraste por ultrasonidos dirigidos se localizarán en sitios de angiogénesis y otro tejido que expresa KDR y pueden demostrar una obtención de imágenes superior de tejido angiogénico. En otra realización preferida, los agentes de contraste por ultrasonidos descritos en el presente documento se conjugan con uno o más heteromultímeros compuestos por restos de unión a cMet o complejo HGF/cMet, y tejido diana que expresa cMet. Estos agentes de contraste por ultrasonidos dirigidos se localizarán en sitios de hiperproliferación o angiogénesis (incluyendo tumores) y otro tejido que expresa cMet y pueden demostrar una obtención de imágenes superior de tal tejido.

### *C. Obtención de imágenes óptica, sonoluminiscencia u obtención de imágenes por fotoacústica*

Según la presente invención, pueden emplearse varios parámetros ópticos para determinar la ubicación de una diana, tal como un KDR, complejo VEGF/KDR, cMet o complejo HGF/cMet, con obtención de imágenes por luz *in vivo* tras la inyección en el sujeto de un constructo heteromultimérico marcado ópticamente. Los parámetros ópticos que van a detectarse en la preparación de una imagen pueden incluir radiación transmitida, absorción, emisión fluorescente o fosforescente, reflexión de luz, cambios en los máximos o la amplitud de absorbancia y radiación dispersada elásticamente. Por ejemplo, el tejido biológico es relativamente translúcido a la luz en el intervalo de longitud de onda de infrarrojo cercano (NIR) de 650-1000 nm. La radiación NIR puede penetrar en el tejido hasta varios centímetros, lo que permite el uso de constructos heteromultiméricos de la invención para obtener imágenes

de tejido que contiene la diana *in vivo*. Por ejemplo, pueden usarse constructos heteromultiméricos compuestos por polipéptidos de unión a KDR, complejo VEGF/KDR, cMet o HGF/cMet para la obtención de imágenes óptica de KDR, complejo VEGF/KDR, cMet o complejo HGF/cMet *in vivo*.

- 5 En otra realización, los constructos heteromultiméricos de la invención pueden conjugarse con fotomarcadores, tales como colorantes ópticos, incluyendo cromóforos o fluoróforos orgánicos, que tienen sistemas de anillos deslocalizados de manera extensa y que tienen máximos de absorción o emisión en el intervalo de 400-1500 nm. Los compuestos de la invención pueden derivatizarse alternativamente con una molécula bioluminiscente. El intervalo preferido de máximos de absorción para fotomarcadores está entre 600 y 1000 nm para minimizar la  
10 interferencia con la señal de la hemoglobina. Preferiblemente, los marcadores de fotoabsorción tienen absorvidades molares grandes, por ejemplo  $> 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , mientras que los colorantes ópticos fluorescentes tendrán altos rendimientos cuánticos. Los ejemplos de colorantes ópticos incluyen los descritos en los documentos WO 98/18497, WO 98/18496, WO 98/18495, WO 98/18498, WO 98/53857, WO 96/17628, WO 97/18841, WO 96/23524, WO 98/47538, y referencias citadas en los mismos. Por ejemplo, los fotomarcadores pueden unirse  
15 covalentemente de manera directa a heteromultímeros de la invención, tal como, por ejemplo, heteromultímeros compuestos por péptidos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR o unirse a tales heteromultímeros por medio de un ligador, tal como se describió anteriormente.

- Tras la inyección del constructo heteromultimérico marcado ópticamente, el paciente se explora con una o más  
20 fuentes de luz (por ejemplo, un láser) en el intervalo de longitud de onda apropiado para el fotomarcador empleado en el agente. La luz usada puede ser monocromática o policromática y continua o pulsada. Se detecta la luz transmitida, dispersada o reflejada por medio de un fotodetector sintonizado a una o múltiples longitudes de onda para determinar la ubicación del tejido que contiene la diana (por ejemplo, tejido que contiene KDR, complejo VEGF/KDR, cMet o complejo HGF/cMet) en el sujeto. Pueden monitorizarse los cambios en el parámetro óptico a lo  
25 largo del tiempo para detectar la acumulación del reactivo marcado ópticamente en el sitio diana (por ejemplo el sitio de angiogénesis). Pueden usarse dispositivos de detección y procesamiento de imágenes convencionales conjuntamente con los reactivos de obtención de imágenes óptica de la presente invención.

- Los reactivos de obtención de imágenes óptica descritos anteriormente pueden usarse también para obtención de  
30 imágenes sonoluminiscente o acústico-óptica realizada con agentes de obtención de imágenes marcados ópticamente (véanse, los documentos U.S. 5.171.298, WO 98/57666, y referencias en los mismos). En obtención de imágenes acústico-óptica, se aplica radiación de ultrasonidos al sujeto y afecta a los parámetros ópticos de la luz transmitida, emitida o reflejada. En la obtención de imágenes sonoluminiscente, los ultrasonidos aplicados generan realmente la luz detectada. Se describen métodos de obtención de imágenes adecuados usando tales técnicas en el  
35 documento WO 98/57666.

#### D. Obtención imágenes nuclear (obtención de imágenes por radionúclidos) y radioterapia

- Pueden conjugarse heteromultímeros de la invención con un indicador de radionúclido apropiado para obtención de  
40 imágenes por escintigrafía, SPECT o PET o con un radionúclido apropiado para radioterapia. Constructos en los que los heteromultímeros de la invención están conjugados con tanto un quelante para un radionúclido útil para la obtención de imágenes de diagnóstico como un quelante para un radionúclido útil para radioterapia están dentro del alcance de la invención.

- 45 Para su uso como agente para PET, puede complejarse un heteromultímero con uno de los diversos iones de metales emisores de positrones, tales como  $^{51}\text{Mn}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$  o  $^{110}\text{In}$ . Los constructos heteromultiméricos también pueden marcarse mediante halogenación usando radionúclidos, tales como  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124\text{I}}$ ,  $^{125\text{I}}$ ,  $^{131\text{I}}$ ,  $^{123\text{I}}$ ,  $^{77}\text{Br}$ , y  $^{76}\text{Br}$ . Los radionúclidos de metales preferidos para escintigrafía o radioterapia incluyen  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{141}\text{Ce}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{168}\text{Yb}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  
50  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{103}\text{Ru}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{211}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{214}\text{Bi}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{198}\text{Au}$  y  $^{199}\text{Au}$ . La elección del metal o halógeno se determinará basándose en la aplicación terapéutica o de diagnóstico deseada. Por ejemplo, para fines de diagnóstico los radionúclidos preferidos incluyen  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y  $^{111}\text{In}$ . Para fines terapéuticos, los radionúclidos preferidos incluyen  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186/188}\text{Re}$  y  $^{199}\text{Au}$ .  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se prefiere particularmente para aplicaciones de diagnóstico debido a su bajo  
55 coste, disponibilidad, propiedades de obtención de imágenes y alta actividad específica. Las propiedades nucleares y radiactivas de Tc-99m hacen que este isótopo sea un agente de obtención de imágenes escintigráfica ideal. Este isótopo tiene una energía de fotón único de 140 keV y una semivida radiactiva de aproximadamente 6 horas, y está fácilmente disponible a partir de un generador de  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

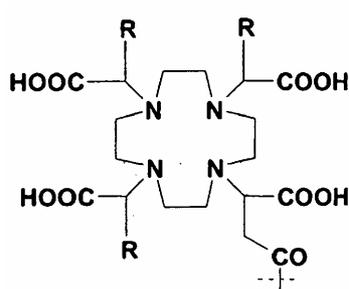
- 60 Los radionúclidos de metales pueden quelarse mediante, por ejemplo, quelantes lineales, macrocíclicos, de terpiridina y de  $\text{N}_3\text{S}$ ,  $\text{N}_2\text{S}_2$  o  $\text{N}_4$  (véanse también, los documentos U.S. 5.367.080, U.S. 5.364.613, U.S. 5.021.556, U.S. 5.075.099, U.S. 5.886.142), y otros quelantes conocidos en la técnica incluyendo quelantes de HYNIC, DTPA, EDTA, DOTA, TETA y bisaminobistiol (BAT) (véase también el documento U.S. 5.720.934). Por ejemplo, se describen quelantes de  $\text{N}_4$  en las patentes estadounidenses n.ºs 6.143.274; 6.093.382; 5.608.110; 5.665.329; 5.656.254; y 5.688.487. Se describen determinados quelantes de  $\text{N}_3\text{S}$  en los documentos PCT/CA94/00395, PCT/CA94/00479, PCT/CA95/00249 y en las patentes estadounidenses n.ºs 5.662.885; 5.976.495; y 5.780.006. El

quelante también puede incluir derivados del ligando de quelación mercapto-acetil-acetil-glicil-glicina (MAG3), que contiene un N<sub>3</sub>S, y sistemas de N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> tales como MAMA (monoamidamonoaminaditioles), DADS (N<sub>2</sub>S diaminaditioles), CODADS. Se describen estos sistemas de ligandos y una variedad de otros en Liu y Edwards, Chem Rev. 1999, 99, 2235-2268 y referencias en el mismo.

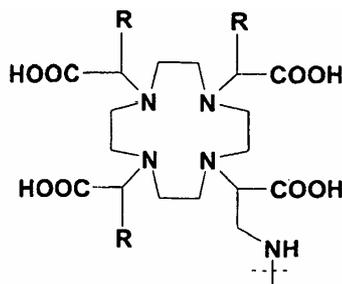
5 El quelante puede incluir también complejos que contienen átomos de ligando que no se donan al metal en una matriz tetradentada. Estos incluyen los aductos de ácido borónico de dioximas de tecnecio y renio, tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.183.653; 5.387.409; y 5.118.797.

10 En otra realización, se usan enlaces disulfuro de un polipéptido de unión de la invención como dos ligandos para la quelación de un radionúclido tal como <sup>99m</sup>Tc. De este modo, el bucle de péptido se expande mediante la introducción de Tc (péptido-S-S-péptido cambiado a péptido-S-Tc-S-péptido). Esto se ha usado también en otros péptidos que contienen disulfuro en la bibliografía (J. Q. Chen, A. Cheng, N. K. Owen, T. H. Hoffman, Y. Miao, S. S. Jurisson, T. P. Quinn. J. Nucl. Med. 2001, 42, 1847-1855) al mismo tiempo que se mantiene la actividad biológica. Los otros grupos de quelación para Tc pueden suministrarse mediante nitrógenos de amida de la estructura principal, otro aminoácido  
15 cistina u otras modificaciones de aminoácidos.

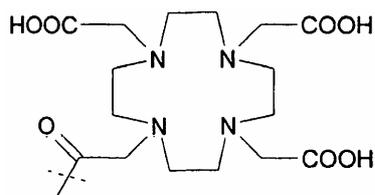
Los quelantes de metales particularmente preferidos incluyen los de fórmula 20, 21 y 22 (para <sup>111</sup>In y lantánidos tales como Gd<sup>3+</sup> paramagnético y lantánidos radiactivos, tales como, por ejemplo <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>153</sup>Sm y <sup>166</sup>Ho) y los de  
20 fórmula 23, 24 y 25 (para <sup>99m</sup>Tc, <sup>186</sup>Re y <sup>188</sup>Re radiactivos) expuestas a continuación. Estos y otros grupos de quelación de metales se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 6.093.382 y 5.608.110. Adicionalmente, el grupo de quelación de fórmula 22 se describe en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.143.274; el grupo de quelación de fórmula 24 se describe en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.627.286 y 6.093.382, y el grupo de quelación de fórmula 25 se describe en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.662.885;  
25 5.780.006; y 5.976.495.



(20)

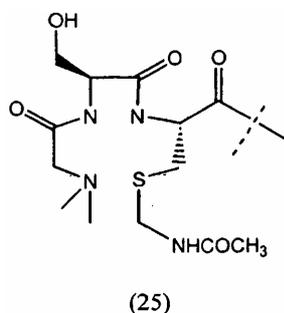
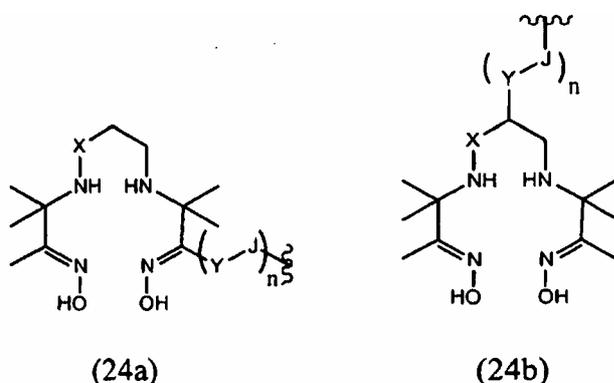
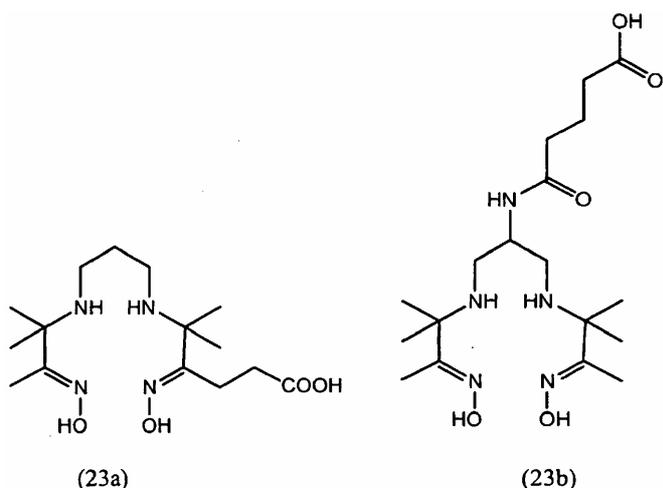


(21)



(22)

30



5

10

15

20

25

En las fórmulas 20 y 21 anteriores, R es alquilo, preferiblemente metilo. En la fórmula 24 anterior, X es o bien CH<sub>2</sub> o bien O, Y es alquilo o bien ramificado o bien no ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>; Y es arilo, ariloxilo, arilamino, arilaminoacilo; Y es arilalquilo, en el que el grupo o grupos alquilo unidos al grupo arilo son grupos alquilo ramificados o no ramificados C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, grupos hidroxilo o polihidroxialquilo o grupos polialcoxialquilo o polihidroxipolialoxialquilo ramificados o no ramificados C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, J es C(=O)-, OC(=O)-, SO<sub>2</sub>-, NC(=O)-, NC(=S)-, N(Y), NC(=NCH<sub>3</sub>)-, NC(=NH)-, N=N-, homopoliamidas o heteropoliaminas derivadas de aminoácidos sintéticos o que se producen de manera natural; todos en los que n es 1-100. Se describen otras variantes de estas estructuras, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.093.382.

Los quelantes pueden unirse covalentemente de manera directa a los heteromultímeros o unirse a los heteromultímeros por medio de un ligador, tal como se describió anteriormente, y entonces marcarse directamente con el metal radiactivo de elección (véanse, los documentos WO 98/52618, U.S. 5.879.658 y U.S. 5.849.261).

Complejos de tecnecio radiactivo son particularmente útiles para la obtención de imágenes de diagnóstico y complejos de renio radiactivo son particularmente útiles para radioterapia. En la formación de un complejo de tecnecio radiactivo con los reactivos de esta invención, el complejo de tecnecio, preferiblemente una sal de pertecnetato de Tc-99m, se hace reaccionar con el reactivo en presencia de un agente reductor. Agentes reductores preferidos son ditionita, iones ferroso y estannoso; el agente reductor más preferido es cloruro estannoso. Se proporcionan convenientemente medios para preparar tales complejos en una forma de kit que comprende un vial sellado que contiene una cantidad predeterminada de un reactivo de la invención que va a marcarse y una cantidad

suficiente de agente reductor para marcar el reactivo con Tc-99m. Alternativamente, el complejo puede formarse haciendo reaccionar un heteromultímero de esta invención conjugado con un quelante apropiado con un complejo lábil preformado de tecnecio y otro compuesto conocido como ligando de transferencia. Este procedimiento se conoce como intercambio de ligando y lo conocen bien los expertos en la técnica. El complejo lábil puede formarse usando ligandos de transferencia tales como tartrato, citrato, gluconato o manitol, por ejemplo. Entre las sales de pertecnetato de Tc-99m útiles con la presente invención se incluyen las sales de metales alcalinos tales como la sal de sodio, o sales de amonio o sales de alquilo inferior. La preparación de los complejos de la presente invención en los que el metal es renio radiactivo puede lograrse usando materiales de partida de renio en el estado de oxidación +5 o +7. Ejemplos de compuestos en los que el renio está en el estado de Re (VII) son  $\text{NH}_4\text{ReO}_4$  o  $\text{KReO}_4$ . Re (V) está disponible como, por ejemplo,  $[\text{ReOCl}_4](\text{NBu}_4)$ ,  $[\text{ReOCl}_4](\text{AsPh}_4)$ ,  $\text{ReOCl}_3(\text{PPH}_3)_2$  y como  $\text{ReO}_2(\text{piridina})_4^+$ . (Ph es fenilo; Bu es n-butilo). También pueden usarse otros reactivos de renio que pueden formar un complejo de renio.

Se proporcionan agentes de obtención de imágenes escintigráficos marcados radiactivamente proporcionados por la presente invención que tienen una cantidad adecuada de radiactividad. En la formación de complejos radiactivos de Tc-99m, se prefiere generalmente formar complejos radiactivos en disoluciones que contienen radiactividad a concentraciones de desde aproximadamente 0,01 milicurios (mCi) hasta 100 mCi por ml.

Generalmente, la dosis unitaria que va a administrarse tiene una radiactividad de aproximadamente 0,01 mCi a aproximadamente 100 mCi, preferiblemente de 1 mCi a 20 mCi. La disolución que va a inyectarse a dosificación unitaria es de desde aproximadamente 0,01 ml hasta aproximadamente 10 ml.

Las dosis típicas de un agente de obtención de imágenes por constructo heteromultimérico marcado con radionúclido de la invención proporcionan 10-50 mCi. Tras la inyección del agente de obtención de imágenes por radionúclido heteromultimérico en el paciente, se usa una cámara de PET o una cámara de rayos gamma calibrada para la energía de rayos gamma del núclido incorporado en el agente de obtención de imágenes para obtener imágenes de zonas de captación del agente y cuantificar la cantidad de radiactividad presente en el sitio. La obtención de imágenes del sitio *in vivo* puede tener lugar en cuestión de unos pocos minutos. Sin embargo, la obtención de imágenes puede tener lugar, si se desea, en horas o incluso períodos más prolongados, tras inyectarse el péptido radiomarcado en un paciente. En la mayoría de los casos, se acumulará una cantidad suficiente de la dosis administrada en la zona de la que van a obtenerse imágenes en el plazo de aproximadamente 0,1 de una hora para permitir la toma de escintigrafías.

Los expertos en la técnica conocen programas de dosis apropiados para los compuestos radioterápicos de la presente invención. Los compuestos pueden administrarse usando muchos métodos que incluyen, pero no se limitan a, una única o múltiples inyecciones i.v. o i.p., usando una cantidad de radiactividad que es suficiente para provocar daño o supresión del tejido seleccionado como diana, pero no tanto como para que se provoque daño sustantivo a tejido no diana (tejido normal). La cantidad y dosis requeridas es diferente para diferentes constructos, dependiendo de la energía y semivida del isótopo usado, el grado de captación y el aclaramiento del agente del cuerpo y la masa del tumor. En general, las dosis pueden oscilar entre una única dosis de aproximadamente 30-50 mCi y una dosis acumulativa de hasta aproximadamente 3 curios.

Las composiciones radioterápicas de la invención pueden incluir tampones fisiológicamente aceptables, y pueden requerir estabilizadores de la radiación para prevenir el daño radiolítico al compuesto antes de la inyección. Los expertos en la técnica conocen estabilizadores de la radiación, y pueden incluir, por ejemplo, ácido paraaminobenzoico, ácido ascórbico, ácido gálico y similares.

Un kit de un único vial, o de múltiples viales que contiene todos los componentes necesarios para preparar los agentes radiofarmacéuticos de esta invención, distintos del radionúclido, es una parte integral de esta invención.

Un kit de un único vial contiene preferiblemente un ligando de quelación (si se usa un radionúclido de metal), una fuente de sal estannosa (si se requiere reducción, por ejemplo, cuando se usa tecnecio) u otro agente reductor farmacéuticamente aceptable, y se tampona apropiadamente con ácido o base farmacéuticamente aceptable para ajustar el pH a un valor de aproximadamente 3 a aproximadamente 9. La cantidad y el tipo de agente reductor usado dependerán altamente de la naturaleza del complejo de intercambio que va a formarse. Las condiciones apropiadas las conocen bien los expertos en la técnica. Se prefiere que el contenido del kit esté en forma liofilizada. Un kit de un único vial de este tipo puede contener opcionalmente ligandos de intercambio o lábiles tales como glucoheptonato, gluconato, manitol, malato, ácido cítrico o tartárico y también puede contener modificadores de la reacción tales como ácido dietilentriamina-pentaacético (DPTA), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) o  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  ciclodextrina que sirven para mejorar la pureza y estabilidad radioquímicas del producto final. El kit también puede contener estabilizadores, agentes de carga tales como manitol, que están diseñados para ayudar en el procedimiento de secado por congelación, y otros aditivos conocidos por los expertos en la técnica.

Un kit de múltiples viales contiene preferiblemente los mismos componentes generales pero emplea más de un vial en la reconstitución del agente radiofarmacéutico. Por ejemplo, un vial puede contener todos los componentes que se requieren para formar un complejo de Tc (V) lábil con la adición de pertecnetato (por ejemplo la fuente estannosa

u otro agente reductor). Se añade pertecnetato a este vial, y tras esperar un periodo de tiempo apropiado, se añade el contenido de este vial a un segundo vial que contiene el ligando, así como tampones apropiados para ajustar el pH a su valor óptimo. Tras un tiempo de reacción de aproximadamente 5 a 60 minutos, se forman los complejos de la presente invención. Es ventajoso que el contenido de ambos viales de este kit de múltiples viales se liofilice.

5 Como anteriormente, pueden estar presentes modificadores de la reacción, ligandos de intercambio, estabilizadores, agentes de carga, etc. en cualquiera o ambos viales.

#### Otras aplicaciones terapéuticas

10 Los constructos heteromultiméricos de la presente invención pueden usarse para mejorar la actividad y/o eficacia de agentes terapéuticos, por ejemplo, mejorando su afinidad por o el tiempo de residencia en la diana. En esta realización se conjugan heteromultímeros con el agente terapéutico. Alternativamente, tal como se comentó anteriormente, puede conjugarse un liposoma o una burbuja que contiene un agente terapéutico con heteromultímeros de la invención. El agente terapéutico puede ser un agente radioterápico, comentado

15 anteriormente, un fármaco, agente quimioterápico o tumoricida, material genético o un vehículo de suministro génico, etc. La parte de heteromultímero del conjugado provoca que el agente terapéutico se “guíe” a los sitios de expresión/localización de la diana y mejore la afinidad del conjugado por estos sitios, de modo que la actividad terapéutica del conjugado esté más localizada y concentrada en los sitios diana. Por ejemplo, en una realización, pueden usarse heteromultímeros que incluyen polipéptidos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR para mejorar la

20 actividad de agentes terapéuticos (tales como agentes antiangiogénicos o tumoricidas) contra angiogénesis no deseada tal como la que se produce en tumores neoplásicos, proporcionando o mejorando su afinidad por KDR o el complejo VEGF/KDR y su tiempo de residencia en un KDR o complejo VEGF/KDR en endotelio que experimenta angiogénesis. En este aspecto de la invención, se proporcionan agentes híbridos conjugando heteromultímeros de unión a KDR o complejo VEGF/KDR con un agente terapéutico. Tales constructos heteromultiméricos serán útiles en

25 el tratamiento de enfermedades asociadas a angiogénesis, especialmente crecimiento tumoral neoplásico y metástasis, en mamíferos, incluyendo seres humanos. El método de tratamiento comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de un constructo heteromultimérico que comprende polipéptidos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR conjugado con un agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de tales conjugados en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas a

30 angiogénesis en mamíferos, incluyendo seres humanos. Pueden usarse constructos heteromultiméricos de la invención que comprenden restos de unión a cMet o complejo HGF/cMet de manera similar para tratar enfermedad asociada con hiperproliferación o angiogénesis.

Los agentes terapéuticos adecuados para su uso en este aspecto de la invención incluyen, pero no se limitan a:

35 agentes antineoplásicos, tales como compuestos de platino (por ejemplo, espiroplatino, cisplatino y carboplatino), metotrexato, adriamicina, mitomicina, ansamitocina, bleomicina, citosina, arabinósido, arabinosiladenina, mercaptopolilisina, vincristina, busulfano, clorambucilo, melfalán (por ejemplo, PAM,  $\alpha$ -L-PAM o mostaza de fenilalanina), mercaptopurina, mitotano, clorhidrato de procarbazona, dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina, clorhidrato, clorhidrato de doxorubicina, taxol, mitomicina, plicamicina (mitramicina), aminoglutetimida, fosfato sódico

40 de estramustina, flutamida, acetato, acetato de megestrol, citrato de tamoxifeno, testolactona, trilostano, amsacrina (m-AMSA), ASPARAGINASA (L-ASPARAGINASA) de *Erwina aparaginase*, etopósido (VP-16), interferón *cx-2a*, interferón *cx-2b*, tenipósido (VM-26), sulfato de vinblastina (VLB), sulfato de vincristina, sulfato de bleomicina, adriamicina y arabinosilo; agentes antiangiogénicos tales como; inhibidores de tirosina cinasa con actividad hacia moléculas de señalización importantes en angiogénesis y/o crecimiento tumoral tales como SU5416 y SU6668

45 (Sugen/Pharmacia & Upjohn), endostatina (EntreMed), angiostatina (EntreMed), combretastatina (Oxigene), ciclosporina, 5-fluorouracilo, vinblastina, doxorubicina, paclitaxel, daunorubicina, inmunotoxinas; factores de coagulación; antivirales tales como aciclovir, amantadina azidotimidina (AZT o zidovudina), ribavirina y vidarabina monohidratada (arabinósido de adenina, ara-A); antibióticos, antimaláricos, antiprotozoarios tales como cloroquina, hidroxiclороquina, metronidazol, quinina y antimonioato de meglumina; antiinflamatorios tales como diflunisal,

50 ibuprofeno, indometacina, meclofenamato, ácido mefenámico, naproxeno, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina, aspirina y salicilatos.

Cuando constructos heteromultiméricos seleccionan como diana otro tejido y son útiles en el tratamiento de otros estados patológicos el experto en la técnica puede sustituir un agente terapéutico apropiado.

55 Los constructos heteromultiméricos de la presente invención pueden usarse también para dirigir material genético a células específicas. Por ejemplo, los constructos heteromultiméricos de la presente invención pueden usarse para localizar material genético a células o tejido que contiene la diana deseada. Por tanto, tales constructos pueden ser útiles en terapia génica. El material genético puede incluir ácidos nucleicos, tales como ARN o ADN, de origen o bien natural o bien sintético, incluyendo ADN y ARN recombinante y ADN y ARN antisentido. Los tipos de material genético que pueden usarse incluyen, por ejemplo, genes portados en vectores de expresión tales como plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC) y virus defectuosos o “auxiliares”, ácidos nucleicos antígenos, ARN y ADN tanto mono como bicatenario y análogos de los mismos, tales como oligodesoxinucleótidos de fosforotioato y fosforoditioato. Adicionalmente, el material genético puede combinarse, por

60 ejemplo, con lípidos, proteínas u otros polímeros. Los vehículos de suministro para material genético pueden incluir, por ejemplo, una partícula de virus, un vector retroviral u otro vector de terapia génica, un liposoma, un complejo de

lípidos (especialmente lípidos catiónicos) y material genético, un complejo de derivados de dextrano y material genético, etc.

- 5 En una realización preferida los constructos heteromultiméricos de la invención se utilizan en terapia génica para el tratamiento de enfermedades asociadas con angiogénesis. En esta realización, puede conjugarse material genético, o uno o más vehículos de suministro que contienen material genético, por ejemplo, útil en el tratamiento de una enfermedad relacionada con angiogénesis, con uno o más heteromultímeros de unión a KDR o complejo VEGF/KDR o heteromultímeros de unión a cMet o complejo HGF/cMet de la invención y administrarse a un paciente.
- 10 Pueden usarse constructos que incluyen material genético y los heteromultímeros de unión a KDR de la invención, en particular, para introducir selectivamente genes en células endoteliales angiogénicas, lo que puede ser útil no sólo para tratar cáncer, sino también tras angioplastia, en la que la inhibición de la angiogénesis puede inhibir la reestenosis.
- 15 Pueden unirse o fusionarse de modos conocidos agentes terapéuticos y heteromultímeros de la invención, usando el mismo tipo de ligadores comentado en el presente documento. Ligadores preferidos serán cadenas de alquilo sustituidas o no sustituidas, cadenas de aminoácido, cadenas de polietilenglicol y otros ligadores poliméricos sencillos conocidos en la técnica. Más preferiblemente, si el agente terapéutico es por sí mismo una proteína, para la que se conoce la secuencia de ADN codificante, la proteína terapéutica y un polipéptido de unión de la invención
- 20 pueden expresarse conjuntamente a partir del mismo gen sintético, creado usando técnicas de ADN recombinante, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, la secuencia codificante para un polipéptido de unión puede fusionarse en marco con la de la proteína terapéutica, de manera que el péptido se expresa en el extremo amino- o carboxilo-terminal de la proteína terapéutica, o en un lugar entre los extremos terminales, si se determina que tal colocación no destruiría la función biológica requerida de o bien la proteína terapéutica o bien el polipéptido de
- 25 unión. Una ventaja particular de este enfoque general es que es posible la concatamerización de múltiples polipéptidos dispuestos en tándem, aumentando de ese modo el número y la concentración de sitios de unión asociados con cada proteína terapéutica. De esta manera se aumenta la avidéz del péptido de unión, lo que se espera que mejore la eficacia de la proteína de fusión terapéutica recombinante.
- 30 Proteínas recombinantes similares que contienen una o más secuencias codificantes para un polipéptido de unión pueden ser útiles en aplicaciones terapéuticas o de obtención de imágenes. Por ejemplo, en una variación de las aplicaciones de predireccionamiento comentadas a continuación, la secuencia codificante para un péptido de unión a KDR, complejo VEGF/KDR, cMet o HGF/cMet puede fusionarse en marco con una secuencia que codifica para un anticuerpo (o un fragmento de anticuerpo o constructo de ADN recombinante que incluye un anticuerpo, etc.) que,
- 35 por ejemplo, se une a un quelante para un radionúclido (u otro marcador detectable). El anticuerpo que expresa el polipéptido de unión a KDR, complejo VEGF/KDR, cMet o HGF/cMet se administra entonces a un paciente y se permite que localice y se una a tejido que expresa KDR o cMet. Tras haberse permitido que se aclaren los anticuerpos de no unión, se administra el complejo quelante-radionúclido (u otro marcador detectable), que reconoce el anticuerpo, permitiendo la obtención de imágenes de o la radioterapia en los tejidos que expresan KDR o cMet.
- 40 Adicionalmente, puede fusionarse en marco la secuencia codificante para un péptido de unión con una secuencia que codifica, por ejemplo, para proteínas séricas u otras proteínas que producen efectos biológicos (tales como apoptosis, coagulación, internalización, diferenciación, estasis celular, estimulación o supresión del sistema inmunitario, o combinaciones de las mismas). Las proteínas recombinantes resultantes son útiles en la obtención de imágenes, radioterapia y terapias dirigidas contra cáncer y otras enfermedades que implican angiogénesis o
- 45 enfermedades asociadas con los patógenos comentados en el presente documento.

Adicionalmente, pueden usarse heteromultímeros de la presente invención por sí mismos como agentes terapéuticos para tratar varias enfermedades. Por ejemplo, cuando es necesaria la unión de una proteína u otra molécula (por ejemplo un factor de crecimiento, hormona, etc.) para o contribuye a un proceso patológico y un resto

50 de unión inhibe tal unión, los heteromultímeros que incluyen tales restos de unión pueden ser útiles como agentes terapéuticos. De manera similar, cuando la unión de un resto de unión por sí misma inhibe un proceso patológico, los heteromultímeros que contienen tales restos de unión también pueden ser útiles como agentes terapéuticos.

Puesto que la unión de VEGF y la activación de KDR son necesarias para la actividad angiogénica, en una

55 realización pueden usarse heteromultímeros que incluyen polipéptidos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR que inhiben la unión o inhiben la unión de VEGF a KDR (o de otra forma inhiben la activación de KDR) como agentes antiangiogénicos. Determinados heteromultímeros de la invención que inhiben la activación de KDR se comentan en los ejemplos. Un heteromultímero particularmente preferido es el heterodímero que contiene el constructo D1 (estructura mostrada más adelante en el ejemplo 9). Otros constructos de heterodímero preferidos incluyen D4, D5 y

60 D6 (estructuras proporcionadas en los ejemplos 9 y 15 más adelante). Estos y otros heteromultímeros pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer u otras enfermedades asociadas con angiogénesis inapropiada o excesiva, tales como, por ejemplo artritis y placas ateroscleróticas, tracoma, neovascularización de injerto corneal, psoriasis, esclerodermia, hemangioma y cicatrización hipertrófica, adhesiones vasculares, angiofibroma y enfermedades oculares, tales como retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, degeneración macular, rechazo de injerto

65 de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rebeosis, síndrome de Osler-Webber, angiogénesis miocárdica, neovascularización de placas, telangiectasia, articulaciones hemofílicas, angiofibroma y granulación de

heridas. Otros estados que implican angiogénesis incluyen, por ejemplo, tumores sólidos, metástasis tumorales y tumores benignos. Se conocen bien en la técnica tales tumores y trastornos relacionados e incluyen, por ejemplo, melanoma, tumores del sistema nervioso central, tumores neuroendocrinos, sarcoma, mieloma múltiple así como cáncer de mama, de pulmón, de próstata, de colon, de cabeza y cuello y de ovarios. Se enumeran tumores adicionales y trastornos relacionados en la tabla I de la patente estadounidense n.º 6.025.331, presentada el 15 de febrero de 2000 concedida a Moses, *et al.* Los tumores benignos incluyen, por ejemplo, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas y granulomas piogénicos. Otras enfermedades o estados relevantes que implican crecimiento de vasos sanguíneos incluyen adhesiones intestinales, aterosclerosis, esclerodermia y cicatrices hipertróficas, y úlceras. Además, los heteromultímeros de la presente invención pueden usarse para reducir o prevenir la neovascularización uterina requerida para la implantación de embriones, por ejemplo, como agente de control de la natalidad.

Los heteromultímeros de esta invención también pueden ser útiles para tratar acontecimientos de permeabilidad vascular que pueden resultar cuando VEGF se une a KDR. En insuficiencia renal, se ha mostrado que anticuerpos anti-VEGF pueden revertir el daño y de un modo similar los compuestos de la invención pueden revertir la patogénesis de permeabilidad renal en, por ejemplo, diabetes.

Puesto que la interrupción de la interacción de HGF con el receptor cMet ralentiza la progresión tumoral, en otra realización, los heteromultímeros incluyen polipéptidos de unión a cMet o complejo HGF/cMet que inhiben la unión de cMet a HGF (o de otra forma inhiben la activación de cMet) y pueden usarse para tratar tumores y otros trastornos hiperproliferativos. Se comentan heteromultímeros particulares que inhiben cMet en los ejemplos. Un heteromultímero preferido es D28 (estructura mostrada más adelante en el ejemplo 9).

Además, los heteromultímeros de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas con determinados patógenos, incluyendo, por ejemplo, malaria, VIH, VIS, virus de la fiebre hemorrágica de simios, etc. Búsquedas de homología de secuencias de péptidos de unión a KDR identificadas mediante presentación en fagos usando el programa BLAST en NCBI han identificado varias proteínas homólogas que se sabe o se espera que estén presentes en la superficie de organismos patógenos. Se indicaron homologías entre polipéptidos de unión a KDR y complejo VEGF/KDR y proteínas de diversas cepas de malaria, VIH, VIS, virus de la fiebre hemorrágica de simios y una cepa de *E. coli* enterohemorrágica. Algunas de las proteínas homólogas, tales como PfEMP1 y EBL-1, son proteínas de adhesión hipermutables que se sabe que desempeñan papeles en virulencia. Estas proteínas presentan múltiples sitios de unión que pueden unirse a más de una molécula diana en la superficie del huésped. Sus altas tasas de mutación y recombinación les permiten desarrollar rápidamente nuevos sitios de unión para promover la supervivencia y/o invasión. De manera similar, proteínas tales como gp120 de VIH (que también tiene homología con algunos de los péptidos de unión a KDR dados a conocer en el presente documento) desempeñan papeles críticos en la adhesión de patógenos a sus huéspedes. Aunque no se notificó previamente, es posible que muchas de las proteínas patógenas con homología con los péptidos de unión a KDR dadas a conocer en el presente documento también se unan a KDR. La comparación de las secuencias de proteínas patógenas con las correspondientes secuencias de péptidos puede sugerir cambios en la secuencia de péptido u otras modificaciones que potenciarán sus propiedades de unión. Adicionalmente, los constructos heteromultiméricos que incluyen las secuencias del péptido de unión a KDR dados a conocer en el presente documento pueden tener utilidad en el bloqueo de la infección con la especie patógena que presenta la homología. De hecho, está empleándose una estrategia para bloquear la infección por VIH intentando prevenir que proteínas de la envuelta del virus se unan a sus dianas de superficie celular conocidas tales como CD4. Howie SE, *et al.*, FASEB J 1998 Aug; 12(11):991-8, "Synthetic peptides representing discontinuous CD4 binding epitopes of HIV-1 gp120 that induce T cell apoptosis and block cell death induced by gp120". Por tanto, KDR puede representar una diana previamente desconocida para varios patógenos y los constructos heteromultiméricos que incluyen péptidos de unión a KDR o complejo VEGF/KDR pueden ser útiles en el tratamiento de las enfermedades asociadas con estos patógenos.

En los métodos de tratamiento anteriores, los compuestos pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente habitual para agentes terapéuticos, por ejemplo por vía parenteral, por vía enteral o por vía intranasal, y preferiblemente mediante infusión o inyección en bolo, o mediante formulación de liberación lenta o depósito. En una realización preferida, la composición puede formularse según procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Otros portadores farmacéuticamente aceptables incluyen agua estéril, solución salina, solución salina tamponada (que incluye tampones como fosfato o acetato), alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina, etc. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales, lubricantes, etc. siempre que no reaccionen de manera perjudicial con los compuestos activos. De manera similar, la composición puede comprender excipientes convencionales, es decir sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para aplicación parenteral, enteral o intranasal que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos. Generalmente, los componentes se suministrarán o bien por separado o bien mezclados entre sí en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo en unidades

de actividad. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene solución salina o “agua para inyección” de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición va a administrarse mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de solución salina o agua para inyección estéril de modo que los componentes puedan mezclarse antes de su administración. La cantidad de material administrado dependerá de la gravedad del estado. Por ejemplo, para el tratamiento de un estado angiogénico, por ejemplo, en el caso de crecimiento tumoral neoplásico, la posición y el tamaño del tumor afectarán a la cantidad de material que va a administrarse. La dosis precisa que va a emplearse y el modo de administración deben decidirse por necesidad en vista de la naturaleza de la afección según las circunstancias por el médico que supervisa el tratamiento. En general, las dosificaciones del conjugado de heteromultímero/agente terapéutico seguirán las dosificaciones que son rutinarias para el agente terapéutico solo, aunque la afinidad mejorada de un heteromultímero de la invención por su diana puede permitir una disminución en la dosificación convencional.

Tales composiciones farmacéuticas de conjugados se formulan preferiblemente para administración parenteral, y lo más preferiblemente para administración intravenosa o intraarterial. Generalmente, y particularmente cuando la administración es intravenosa o intraarterial, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como un bolo, como dos o más dosis separadas en el tiempo o como una infusión de flujo no lineal o constante.

Los heteromultímeros pueden administrarse a un individuo a lo largo de un transcurso de tiempo adecuado dependiendo de la naturaleza del estado y el desenlace deseado. Los constructos heteromultiméricos pueden administrarse profilácticamente, por ejemplo, antes de que se diagnostique el estado o a un individuo predispuesto a un estado. Alternativamente, los heteromultímeros de la invención pueden administrarse mientras que el individuo presenta síntomas del estado o después de que se hayan pasado los síntomas o se hayan aliviado de otra forma (tal como tras la eliminación de un tumor). Además, los heteromultímeros de la presente invención pueden administrarse como parte de un régimen de mantenimiento, por ejemplo para prevenir o reducir la reaparición o los síntomas o el estado. Tal como se describe en el presente documento, los heteromultímeros de la presente invención pueden administrarse por vía sistémica o por vía local.

Tal como se usa en el presente documento, el término “terapéutico” incluye al menos el alivio parcial de los síntomas de un estado dado. Los constructos heteromultiméricos de la presente invención no tienen que producir un alivio completo de los síntomas para ser útiles. Por ejemplo, el tratamiento de un individuo puede dar como resultado una disminución en el tamaño de un tumor o zona de enfermedad, o la prevención de un aumento en el tamaño del tumor o zona de enfermedad o el alivio parcial de otros síntomas. El tratamiento puede dar como resultado la reducción del número de vasos sanguíneos en una zona de interés o puede prevenir un aumento en el número de vasos sanguíneos en una zona de interés. El tratamiento también puede prevenir o reducir el número o tamaño de excrecencias metastásicas del/de los tumor(es) principal(es).

En una realización, los síntomas que pueden aliviarse incluyen características fisiológicas tales como actividad de receptor de VEGF y capacidad de migración de células endoteliales. Los heteromultímeros de la presente invención pueden inhibir la actividad de receptores de VEGF, incluyendo VEGF-2/KDR, VEGF-1/Flt-1 y VEGF-3/Flt-4. Tal inhibición también puede detectarse, por ejemplo, midiendo el estado de fosforilación del receptor en presencia de o tras el tratamiento con los polipéptidos de unión o constructos de los mismos. Basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, un experto habitual en la técnica sabría cómo y podría administrar una dosis adecuada de polipéptido de unión o constructo del mismo tal como se proporciona en el presente documento y se mide antes y después del tratamiento. En otra realización, puede medirse el estado de fosforilación del receptor relevante, o la capacidad de migración de células endoteliales en una zona de interés en muestras tomadas del individuo. Los receptores de VEGF o las células endoteliales pueden aislarse de la muestra y usarse en ensayos descritos en el presente documento.

La dosificación de los heteromultímeros puede depender de la edad, el sexo, la salud y el peso del individuo, así como la naturaleza del estado y el régimen de tratamiento global. Los efectos biológicos de los multímeros se describen en el presente documento. Por tanto, basándose en los efectos biológicos de los heteromultímeros proporcionados en el presente documento, y el desenlace de tratamiento deseado, un experto en la técnica puede determinar la dosificación a la que se hace referencia a través de procedimientos de optimización de la vía. Normalmente, el régimen diario está en el intervalo de aproximadamente 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 1  $\text{mg}/\text{kg}$ .

Los heteromultímeros proporcionados en el presente documento pueden administrarse como el único principio activo junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, o pueden administrarse junto con otros polipéptidos de unión y constructos de los mismos, otros agentes terapéuticos, o combinación de los mismos. Además, los heteromultímeros pueden conjugarse con agentes terapéuticos, por ejemplo, para mejorar la especificidad, el tiempo de residencia en el cuerpo o el efecto terapéutico. Tales otros agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, otros compuestos antiangiogénicos y compuestos tumorocidas. El agente terapéutico también puede incluir anticuerpos.

Además, los heteromultímeros de la presente invención pueden usarse como dispositivo de guiado a células endoteliales. Por tanto, los constructos heteromultiméricos pueden conjugarse con ácidos nucleicos que codifican para, por ejemplo, un polipéptido terapéutico, con el fin de dirigir el ácido nucleico a células endoteliales. Una vez expuestos al ácido nucleico, administran de ese modo el péptido terapéutico a las células diana.

En otra realización de la invención, el agente terapéutico puede asociarse con una composición de agente de contraste por ultrasonidos, incluyendo dicho agente de contraste por ultrasonidos los péptidos de unión a KDR, complejo VEGF/KDR, cMet o HGF/cMet de la invención unidos al material empleado para formar las vesículas (particularmente microburbujas o microbalones) comprendido en el agente de contraste, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, dicha asociación de agente de contraste/agente terapéutico puede llevarse a cabo tal como se describe en el documento US 6.258.378. Por tanto, tras la administración del agente de contraste por ultrasonidos y la obtención de imágenes opcional del agente de contraste unido al sitio patógeno que expresa el KDR, complejo VEGF/KDR, cMet o complejo HGF/cMet, el sitio patógeno puede irradiarse con un haz de energía (preferiblemente ultrasónica, por ejemplo con una frecuencia de desde 0,3 hasta 3 MHz), para provocar el estallido de las microvesículas, tal como se da a conocer por ejemplo en la patente estadounidense n.º 6.258.378 mencionada anteriormente. El efecto terapéutico del agente terapéutico puede potenciarse por tanto ventajosamente mediante la energía liberada por el estallido de las microvesículas, en particular provocando un suministro eficaz del agente terapéutico al sitio patógeno seleccionado como diana.

Tal como se comentó anteriormente, los heteromultímeros pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada. Las vías de administración adecuadas incluyen aplicación tópica, transdérmica, parenteral, gastrointestinal, intravaginal y transalveolar. Pueden prepararse composiciones para la vía de administración deseada mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Se comentan adicionalmente detalles referentes a dosificaciones, formas farmacéuticas, modos de administración, composición y similares en un texto farmacéutico convencional, tal como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Alfonso R. Gennaro, ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA 1990).

Para aplicaciones tópicas, los heteromultímeros pueden suspenderse, por ejemplo, en una crema, un gel o enjuague que permite que los polipéptidos o constructos penetren en la piel y entren en el torrente sanguíneo, para administración sistémica, o entren en contacto con la zona de interés, para administración localizada. Las composiciones adecuadas para aplicación tópica incluyen cualquier base farmacéuticamente aceptable en la que los polipéptidos son al menos mínimamente solubles.

Para administración transdérmica, los heteromultímeros pueden aplicarse en suspensión farmacéuticamente aceptable junto con un dispositivo o "parche" transdérmico adecuado. Se describen ejemplos de dispositivos transdérmicos adecuados para la administración de los heteromultímeros de la presente invención, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.165.458, presentada el 26 de diciembre de 2000 concedida a Foldvari, *et al.*, y la patente estadounidense n.º 6.274.166B1, presentada el 4 de agosto de 2001 concedida a Sintov, *et al.*

Para administración parenteral, los heteromultímeros pueden suspenderse, por ejemplo, en una disolución isotónica estéril farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina y solución salina tamponada con fosfato. Los constructos de la invención pueden inyectarse entonces por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal o por vía subcutánea.

Para administración gastrointestinal e intravaginal, los heteromultímeros pueden incorporarse en polvos, pastillas o líquidos farmacéuticamente aceptables para ingestión, y supositorios para administración rectal o vaginal.

Para administración transalveolar, bucal o pulmonar, los heteromultímeros pueden suspenderse en un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para aerosolización e inhalación o como colutorio. También pueden usarse dispositivos adecuados para administración transalveolar tales como atomizadores y vaporizadores. Pueden encontrarse formulaciones adecuadas para la administración en aerosol de polipéptidos usando las vías bucal o pulmonar, por ejemplo en la patente estadounidense n.º 6.312.665B1, presentada el 6 de noviembre de 2001 concedida a Pankaj Modi.

Además, los heteromultímeros de la presente invención pueden administrarse por vía nasal o por vía ocular, cuando los heteromultímeros se suspenden en un agente farmacéuticamente aceptable líquido adecuado para dosificación gota a gota.

Los heteromultímeros de la presente invención pueden administrarse de manera que el polipéptido se libere en el individuo a lo largo de un periodo de tiempo prolongado (liberación sostenida o controlada). Por ejemplo, los heteromultímeros pueden formularse para dar una composición de manera que una única administración proporciona la administración de los constructos de la invención durante al menos una semana, o a lo largo de un periodo de un año o más. Los sistemas de liberación controlada incluyen microcápsulas monolíticas o de tipo reservorio, implantes de depósito, bombas osmóticas, vesículas, micelas, liposomas, parches transdérmicos y dispositivos iontoforéticos. En una realización, los heteromultímeros de la presente invención están encapsulados o mezclados en un polímero no tóxico, de degradación lenta. Se describen formulaciones adicionales adecuadas para la liberación controlada de constructos de la invención en la patente estadounidense n.º 4.391.797, presentada el 5 de julio de 1983, concedida a Folkman, *et al.*

Otro método adecuado para administrar los heteromultímeros de la presente invención a un individuo es por medio

de la producción *in vivo* de los polipéptidos. Pueden administrarse genes que codifican para los polipéptidos al individuo de manera que se expresen los polipéptidos codificados. Los genes pueden expresarse de manera transitoria. En una realización particular, los genes que codifican para el polipéptido se transfectan en células que se han obtenido del paciente, un método denominado terapia génica *ex vivo*. Entonces se devuelven las células que expresan los polipéptidos al cuerpo del paciente. Se conocen bien en la técnica métodos de terapia génica *ex vivo*, y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.391.797, presentada el 21 de marzo de 1998 concedida a Anderson, *et al.*

Se ilustrarán adicionalmente la preparación y las pruebas de constructos heteromultiméricos según esta invención en los siguientes ejemplos. Los parámetros específicos incluidos en los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la práctica de la invención.

### Ejemplo 1

#### Síntesis de péptidos y marcaje con fluoresceína

Se sintetizaron péptidos de unión a KDR o VEGF/KDR seleccionados, correspondientes a aislados de fagos positivos, en fase sólida usando protocolos de 9-fluorenilmetoxicarbonilo y se purificaron mediante cromatografía de fase inversa. Se confirmaron las masas de péptidos mediante espectrometría de masas por electropulverización, y se cuantificaron los péptidos mediante absorbancia a 280 nm. Para la síntesis, se conservaron dos aminoácidos N-terminales y dos C-terminales de la secuencia de vector de fago de la que se escindió el péptido y se añadió un ligador -Gly-Gly-Gly-Lys-NH<sub>2</sub> en el extremo C-terminal de cada péptido. Se protegieron péptidos con residuos de lisina seleccionados con 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo (ivDde), que permite el acoplamiento selectivo a la lisina C-terminal, no se elimina durante la escisión peptídica y puede eliminarse tras el acoplamiento con hidrazina al 2% en DMF o hidroxilamina 0,5 M, pH 8, en agua.

Se marcó cada péptido con fluoresceína en la lisina C-terminal usando fluoresceína (derivado de éster de N-hidroxisuccinimida) o isotiocianato de fluoresceína (FITC) en DMF, diisopropiletilamina al 2% (DIPEA). Si el péptido contenía una lisina protegida con ivDde, se extinguió la reacción mediante la adición de hidrazina al 2%, que reacciona con toda la NHS-fluoresceína libre y elimina el grupo protector interno. Para todos los demás péptidos, se extinguió la reacción mediante la adición de un volumen igual de hidroxilamina 0,5 M, pH 8. Entonces se diluyeron las reacciones extinguidas con agua hasta DMF a menos del 10% y después se purificaron usando cromatografía de fase inversa C18. Se caracterizaron los péptidos para determinar la pureza y la masa correcta en un sistema de CL-EM (HP1100 HPLC con espectrómetro de masas de un único cuadrupolo SCIEX AP150 en línea).

#### Mediciones de anisotropía de fluorescencia y ensayos BiaCore

Se realizaron mediciones de anisotropía de fluorescencia en microplacas de 384 pocillos en un volumen de 10 µl en tampón de unión (PBS, Tween-20 al 0,01%, pH 7,5) usando un lector de placas de polarización de fluorescencia Tecan Polarion. En algunos casos, se añadieron heparina (0,5 µg/ml) o suero humano al 10% al tampón de unión. Se mantuvo la concentración de péptido marcado con fluoresceína constante (20 nM) y se varió la concentración de KDR-Fc (o diana similar). Se equilibraron las mezclas de unión durante 10 minutos en la microplaca a 30°C antes de la medición. Se ajustó el cambio observado en la anisotropía a la ecuación (1) a continuación mediante regresión no lineal para obtener la K<sub>D</sub> aparente. La ecuación (1) supone que el péptido sintético y HSA forman un complejo reversible en disolución con estequiometría 1:1:

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

donde  $r_{\text{obs}}$  es la anisotropía observada,  $r_{\text{libre}}$  es la anisotropía del péptido libre,  $r_{\text{unido}}$  es la anisotropía del péptido unido,  $K_D$  es la constante de disociación aparente, KDR es la concentración total de KDR y P es la concentración total de péptido marcado con fluoresceína.

Se reticuló KDR-Fc (u otra diana de proteína) con la superficie de dextrano de un chip sensor CM5 mediante el procedimiento de acoplamiento de amina convencional (disoluciones 0,5 mg/ml diluidas 1:20 con acetato 50 mM, pH 6,0, R<sub>L</sub> KDR-Fc = 12859). Se realizaron experimentos en tampón de HBS-P (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, polisorbato 20 al 0,005% (v/v)). Se diluyeron disoluciones de péptido cuantificadas mediante coeficiente de extinción hasta 400 nM en HBS-P. Se realizaron diluciones en serie para producir disoluciones a 200, 100, 50 y 25 nM. Para la asociación, se inyectaron péptidos a 20 µl/min durante 1 minuto usando el programa Kinject. Tras una disociación de 1 minuto, se separó cualquier péptido restante de la superficie diana con una inyección rápida de NaCl 1 M durante 25 s a 50 µl/min. Se inyectaron todas las muestras por duplicado. Entre cada serie de péptidos, una inyección de tampón y una inyección de péptido que no se une a la diana sirvieron como controles adicionales. Se analizaron los sensogramas usando el programa de ajuste de ka/kd simultáneo en el software BIAevaluation 3.1.

Se usan las siguientes abreviaturas comunes a lo largo de toda esta memoria descriptiva: 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (fmoc o Fmoc), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), N-metilpirrolidinona (NMP), anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O), (4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo (ivdde), ácido trifluoroacético (TFA), reactivo B (TFA:H<sub>2</sub>O:fenol:triisopropilsilano, 88:5:5:2), diisopropiletilamina (DIEA), hexafluorofosfato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), N-hidroxisuccinimida (NHS), síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), dimetilsulfóxido (DMSO), diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), albúmina sérica humana (HSA) y pureza radioquímica (RCP).

#### Métodos experimentales

En los ejemplos se emplearon los siguientes métodos.

#### 15 Método 1 para sintetizadores ACT 357 MPS y ACT 496 MOS

Se sintetizaron los péptidos en resina NovaSyn TGR (amida de Rink) (0,2 mmol/g) usando los sintetizadores ACT 357 o ACT 496 de Advanced ChemTech empleando protocolos de síntesis de péptidos con Fmoc, específicamente usando HOBt/DIC como reactivos de acoplamiento y NMP como disolvente. Se eliminó el Fmoc tratando el péptido unido a resina Nova-Syn TGR (amida de Rink, disponible de NovaBiochem, San Diego, CA) con piperidina al 25% en DMF dos veces (4 min y 10 min). Se disolvieron todos los aminoácidos en NMP (se añadió DMF cuando el aminoácido no era soluble en NMP pura). La concentración del aminoácido era de 0,25 M, y la concentración tanto para HOBt como para DIC era de 0,5 M.

25 Para una síntesis a escala de 0,04 mmol:

Un ciclo de acoplamiento de aminoácidos típico (sin incluir etapas de lavado) fue dispensar disolución de piperidina (2,4 ml) a cada pocillo y mezclar durante 4 min, después vaciar todos los pocillos. Se dispensaron NMP (320 µl), disolución de HOBt (320 µl, 4 eq.), aminoácido (640 µl, 4 eq.) y disoluciones de DIC (320 µl, 4 eq.) en cada pocillo. El tiempo de acoplamiento fue de 3 h; después se lavó la resina. Se repitió el ciclo para cada aminoácido. Tras el acoplamiento del último aminoácido, se trató el péptido unido a resina con piperidina al 25% para eliminar el grupo protector Fmoc. Tras el lavado, se ocuparon los grupos reactivos del péptido unido a resina con Ac<sub>2</sub>O 1,0 M (1,2 ml por pocillo) y diisopropiletilamina en DMF, opcionalmente incluyendo cantidades variables de HOBt en la mezcla durante 30 min. Se lavó la resina en primer lugar con metanol y después con diclorometano y se secó. La escisión de los péptidos de la resina y la desprotección de la cadena lateral se logró usando reactivo B durante 4,5 h. Se recogieron las disoluciones de escisión y se lavaron las resinas con una alícuota adicional de reactivo B. Se concentraron las disoluciones combinadas hasta sequedad. Se añadió éter al residuo con formación de remolinos o agitación para precipitar los péptidos. Se decantó el éter y se recogió el sólido. Se repitió este procedimiento 2-3 veces para eliminar impurezas. Se disolvieron los péptidos en bruto en mezcla de DMSO y agua, y se purificaron mediante HPLC (columna: Xterra C18 de Waters Associates, 19 x 50 mm; disolventes: H<sub>2</sub>O con TFA al 0,1% y CH<sub>3</sub>CN con TFA al 0,1%; UV 220 nm; velocidad de flujo: 50-60 ml/min). Se liofilizaron las disoluciones que contenían el péptido para dar los péptidos deseados como liofilizados esponjosos blancos (pureza > 90%).

Se disolvieron los péptidos que contenían di-cisteína lineales purificados en agua, mezclas de agua-acetonitrilo o mezclas de agua-DMSO a concentraciones de entre 0,1 mg/ml y 2,0 mg/ml. La elección del disolvente fue en función de la solubilidad del péptido en bruto en el disolvente. Se ajustó el pH de la disolución a 7,5-8,5 con amoniaco acuoso, carbonato de amonio acuoso o bicarbonato de amonio acuoso. Se agitó la mezcla vigorosamente en aire durante 24-48 h. En el caso de sistemas de disolventes que no contenían DMSO, se ajustó el pH de la disolución a 2 con ácido trifluoroacético acuoso. Se liofilizó la mezcla para proporcionar el péptido que contenía disulfuro cíclico en bruto. Entonces se disolvió el péptido con disulfuro cíclico hasta un volumen de 1-2 ml en disolución acuosa (TFA al 0,1%) que contenía un mínimo de acetonitrilo (TFA al 0,1%). Se cargó la disolución resultante en una columna de fase inversa y se obtuvo el compuesto deseado mediante una elución en gradiente de acetonitrilo en agua, empleando una columna de HPLC preparativa o semipreparativa, de fase inversa, C18 o C8. En el caso de las disoluciones que contenían DMSO, se diluyó la disolución hasta que la concentración de DMSO fue mínima sin precipitación del péptido. Se acidificó rápidamente la mezcla resultante a pH 2 con ácido trifluoroacético diluido y se cargó en el sistema de HPLC de fase inversa y se purificó tal como se describe. Se combinaron fracciones que contenían los materiales deseados y se aislaron los péptidos mediante liofilización.

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

Se sintetizaron los péptidos como en el método 1, con los siguientes cambios. Se usaron HBTU/HOBt/DIEA como reactivo de acoplamiento y NMP como disolvente. Se empleó una carga baja (~0,2 mmol/g) de Fmoc-GGGK(Boc)-

resina NovSyn TGR preparada a partir de la resina Nova-Syn TGR descrita anteriormente para la síntesis de péptidos en síntesis a escala de 0,01 mmol.

Para una síntesis a escala de 0,01 mmol:

5 Tras eliminar el grupo Fmoc, un procedimiento de acoplamiento convencional usó una disolución de HOBt (720  $\mu$ l, 6 eq.), aminoácido (804  $\mu$ l, 6,6 eq.), HBTU (720  $\mu$ l, 6 eq.) y DIEA (798  $\mu$ l, 13,3 eq.). Se agitó la mezcla durante 15 min, se vació y se lavó la resina. Después de todos los acoplamientos y después de la escisión y purificación como anteriormente, se liofilizaron las disoluciones que contenían los péptidos lineales deseados para dar los péptidos como sólidos esponjosos blancos (pureza > 90%).

15 Se ciclaron los péptidos que contenían di-cisteína lineales, precipitados en éter, en bruto, mediante disolución en agua, mezclas de acetonitrilo acuoso (TFA al 0,1%), o DMSO acuoso y ajuste del pH de la disolución a 7,5 - 8,5 mediante adición de disolución de amoniaco acuoso, de carbonato de amonio acuoso o de bicarbonato de amonio acuoso. La concentración de péptido fue de entre 0,1 y 2,0 mg/ml. Se agitó la mezcla en aire durante 24-48 h, se acidificó a un pH de 2 con ácido trifluoroacético acuoso y después se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa empleando un gradiente de acetonitrilo en agua. Se combinaron las fracciones que contenían el material deseado y se aislaron los péptidos mediante liofilización.

#### 20 *Método 3 para el sintetizador ACT 496 MOS*

Se sintetizaron los péptidos usando un sintetizador ACT 496 MOS de Advanced ChemTech como en el método 1.

Se empleó la carga baja (~0,2 mmol/g) de GGGK(Boc)-resina NovaSyn TGR para la síntesis de péptidos. El

25 disolvente de acoplamiento fue NMP/DMSO 8:2. Se realizó la síntesis en una escala de 0,02 mmol usando un tiempo de acoplamiento de 3 h. Se procesaron adicionalmente los péptidos lineales en bruto tal como se describió anteriormente para el método 1.

#### *Método 4 para el sintetizador ACT 496 MOS*

30 Se sintetizaron los péptidos usando el método 3 en el instrumento ACT 496 con HBTU/DIEA como reactivos de acoplamiento, y NMP como disolvente. Se usó 2,4,6-colidina como disolución 1 M como base. Se usó la carga baja

de Fmoc-GGGK(ivDde)-resina Novsyn TGR (~0,2 mmol/g) para la síntesis de péptidos. El tiempo de acoplamiento

fue de 30 minutos. Se procesaron adicionalmente los péptidos lineales en bruto tal como se describió anteriormente para el método 1.

#### 35 *Método 5 para el sintetizador ABI 433A*

Se llevó a cabo la síntesis de péptidos en una escala de 0,25 mmol usando el protocolo FastMoc (Applied Biosystems Inc.). En cada ciclo de este protocolo, se disolvió 1,0 mmol de un aminoácido protegido seco, en un cartucho en una disolución de 0,9 mmol de HBTU, 2 mmol de DIEA y 0,9 mmol de HOBt en DMF con NMP adicional añadido. Se prepararon los péptidos usando 0,1 mmol de resina NovaSyn TGR (amida de Rink) (sustitución de resina 0,2 mmol/g). El tiempo de acoplamiento en este protocolo fue de 21 min. Se llevó a cabo la desprotección de Fmoc con piperidina al 20% en NMP. Al final del último ciclo, se acetiló el péptido sintetizado usando anhídrido acético/DIEA/HOBt/NMP. Se lavó el péptido-resina y se secó para manipulaciones adicionales o se escindió de la resina (usando reactivo B). Generalmente, se ciclaron los péptidos escindidos, como en el método 1 anterior.

#### *Método 6: Biotinilación de péptidos unidos a resina*

50 Se prepararon los péptidos mediante el método 5. Se eliminó selectivamente el grupo protector ivDde en la lisina C-terminal mediante tratamiento con hidrazina al 10% en DMF. Entonces se trató la resina con una disolución de éster N-hidroxisuccinimidílico de biotina en DMF en presencia de DIEA. Tras el lavado, se secó la resina y se realizó la escisión usando reactivo B. Se separó la resina mediante filtración y se concentró el filtrado hasta sequedad. Se disolvió el péptido biotinilado en DMSO puro y se trató con DIEA y se agitó durante 4-6 h para realizar la ciclación de disulfuro. Se purificó la mezcla en bruto mediante HPLC preparativa.

55 En un experimento típico, se trataron 200 mg del péptido unido a resina con hidrazina al 10% en DMF (2 x 20 ml) y se lavaron con DMF (2 x 20 ml) y después con diclorometano (1 x 20 ml). Se resuspendió la resina en DMF (10 ml) y se trató con una disolución de éster NHS de biotina (0,2 mmol, 5 equivalentes) y DIEA (0,2 mmol) y se mezcló la

resina con los reactivos durante 4 h. Se comprobó que se completó la reacción mediante la prueba de ninhidrina. Después se liberó el péptido de la resina mediante tratamiento con reactivo B (10 ml) durante 4 h. Se separó la resina mediante filtración, se eliminó el reactivo B a vacío y se precipitó el péptido mediante adición de éster anhidro. Se recogió el sólido formado, se lavó con éter y se secó. Se disolvió el sólido en DMSO anhidro y se ajustó la  
 5 mezcla a pH 7,5 con DIEA y se agitó durante 4-6 h para realizar la ciclación de disulfuro. Se monitorizó la reacción de ciclación de disulfuro mediante HPLC analítica. Tras completarse la ciclación, se diluyó la disolución de mezcla con acetonitrilo al 25% en agua y se purificó directamente mediante HPLC en columna C-18 de fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo en agua (conteniendo ambos TFA al 0,1%). Se analizaron las fracciones mediante HPLC analítica y se recogieron aquellas que contenían el producto puro y se liofilizaron para obtener el péptido biotinilado  
 10 requerido.

#### *Método 7: Biotinilación de péptidos purificados*

Se disolvió el péptido purificado (10 mg, preparado mediante los métodos 1-5) que contenía un grupo amino libre en DMF o DMSO anhidros (1 ml) y se añadieron éster NHS de biotina (5 equivalentes) y DIEA (5 equivalentes). Se monitorizó la reacción mediante HPLC y tras completarse la reacción (1-2 h), se purificó directamente la mezcla de reacción en bruto mediante HPLC preparativa. Se analizaron las fracciones mediante HPLC analítica y se recogieron aquellas que contenían el producto puro y se liofilizaron para obtener el péptido biotinilado requerido.

#### *Método 8: Biotinilación de péptidos unidos a resina que contienen ligadores*

En un experimento típico, se trataron 400 mg del péptido que contenía resina (preparado usando el sintetizador ABI-433 A y que portaba una lisina protegida con ivDde) con hidrazina al 10% en DMF (2 x 20 ml). Se lavó la resina con DMF (2 x 20 ml) y DCM (1 x 20 ml). Se resuspendió la resina en DMF (10 ml) y se trató con ácido Fmoc-aminodioxanoico (0,4 mmol), HOBt (0,4 mmol), DIC (0,4 mmol), DIEA (0,8 mmol) con mezclado durante 4 h. Tras la reacción, se lavó la resina con DMF (2 x 10 ml) y con DCM (1x 10 ml). Después se trató la resina con piperidina al 20% en DMF (2 x 15 ml) durante 10 min cada vez. Se lavó la resina y se repitieron una vez más el acoplamiento con ácido Fmoc-diaminodioxanoico y la eliminación del grupo protector Fmoc. Se trató la resina resultante, que contenía un péptido con un grupo amino libre, con una disolución de éster NHS de biotina (0,4 mmol,  
 25 5 equivalentes) y DIEA (0,4 mmol, 5 equivalentes) en DMF durante 2 h. Se lavó el péptido-resina y se secó tal como se describió anteriormente y después se trató con reactivo B (20 ml) durante 4 h. Se filtró la mezcla y se concentró el filtrado hasta sequedad. Se agitó el residuo con éter para producir un sólido que se recogió, se lavó con éter y se secó. Se disolvió el sólido en DMSO anhidro y se ajustó el pH a pH 7,5 con DIEA. Se agitó la mezcla durante 4-6 h para realizar la reacción de ciclación de disulfuro que se monitorizó mediante HPLC analítica. Tras completarse la ciclación, se diluyó la disolución de DMSO con acetonitrilo al 25% en agua y se aplicó directamente a una columna C-18 de fase inversa. Se realizó la purificación usando un gradiente de acetonitrilo en agua (conteniendo ambos TFA al 0,1%). Se analizaron las fracciones mediante HPLC analítica y se recogieron aquellas que contenían el producto puro y se liofilizaron para proporcionar el péptido biotinilado requerido.

#### *Método 9: Formación de péptidos marcados con 5-carboxifluoresceína*

Se mezcló péptido-resina obtenido mediante el método 5, que contenía un grupo protector ivDde en el nitrógeno épsilon de lisina, con una disolución de hidrazina en DMF (hidrazina al 10%/DMF, 2 x 10 ml, 10 min) para eliminar el grupo ivDde. Se marcó el nitrógeno épsilon de la lisina con 5-isotiocianato de fluoresceína (0,12 mmol) y diisopropiltilamina (0,12 mmol) en DMF. Se agitó la mezcla durante 12 h (los compuestos que contenían fluoresceína se protegieron de la luz). Después se lavó la resina con DMF (3 x 10 ml) y dos veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) y se secó bajo nitrógeno durante 1 h. Se escindió el péptido de la resina usando reactivo B durante 4 h y se recogió la disolución mediante filtración. Se eliminaron los compuestos volátiles a presión reducida y se secó el residuo a vacío. Se precipitó el péptido con éter, se recogió y se secó el precipitado bajo una corriente de nitrógeno.  
 45 Se añadió el precipitado a agua (1 mg/ml) y se ajustó el pH de la mezcla a 8 con meglumina acuosa al 10%. Se llevó a cabo la ciclación del péptido durante 48 h y se liofilizó la disolución. Se disolvió el péptido cíclico en bruto en agua y se purificó mediante RP-HPLC en una columna C<sub>18</sub> con un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (ambas fases contenían TFA al 0,1%). Se recogieron las fracciones que contenían el producto puro y se liofilizaron. Se caracterizaron los péptidos mediante ES-EM y se determinó la pureza mediante RP-HPLC (gradiente lineal de acetonitrilo en agua/TFA al 0,1%).  
 50 55

#### *Método 10: Preparación de quelato peptídico para la unión a Tc mediante acoplamiento de aminoácidos individuales*

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

Protocolo A para acoplamiento manual de aminoácido individual:

1. Tratar con 4 equivalentes de Fmoc-aminoácido correspondiente y 4,1 equivalentes de hidroxibenzotriazol y 4,1 equivalentes de HOB y 4,1 equivalentes de DIC durante 5 h.

2. Lavar con DMF (3 X 10 ml).

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

4. Lavar con DMF (3 X 10 ml).

Después se trató la resina cargada con péptido protegido con Fmoc con piperidina al 20% en DMF (2 X 10 ml, 10 min) y se lavó con DMF (3 X 10 ml). Después se añadió una disolución de N,N-dimetilglicina (0,11 mmol), HATU (1 mmol) y DIEA (0,11 mmol) en DMF (10 ml) a la resina cargada con péptido y se continuó el acoplamiento manual durante 5 h. Tras la reacción, se lavó la resina con DMF (3 x 10 ml) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 ml) y se secó a vacío.

*Método 11: Formación de péptidos mercapto-acetilados usando éster de N-hidroxisuccinimida del ácido S-acetiltioglicólico*

A una disolución de un péptido (0,005 mmol, obtenido a partir de los métodos 1-5 con una amina libre) en DMF (0,25 ml) se le añadió éster de N-hidroxisuccinimida del ácido S-acetiltioglicólico (SATA) (0,0055 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 6 h. Se eliminó la fracción volátil a vacío y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa usando acetonitrilo-agua que contenía TFA al 0,1%. Se recogieron las fracciones que contenían el producto puro y se liofilizaron para proporcionar el péptido mercaptoacetilado. Se caracterizó el péptido mercaptoacetilado mediante ESI-EM y se determinó la pureza mediante análisis por HPLC de fase inversa empleando un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (conteniendo ambos TFA al 0,1%).

*Método 12: Formación de péptido mercaptoacetilado usando ácido S-acetiltioglicólico*

Se acoplaron péptidos purificados del método 5, tras la ciclación de disulfuro, con ácido S-acetiltioglicólico (1,5-10 eq.)/HOBt (1,5-10 eq.)/DIC (1,5-10 eq.) en NMP durante 2-16 h a temperatura ambiente. Después se purificó la mezcla mediante HPLC preparativa y se combinaron las fracciones que contenían péptido puro y se liofilizaron. En el caso de compuestos con otra lisina protegida mediante un grupo ivDde, la reacción de desprotección empleó hidrazina al 2% en DMSO durante 3 h a temperatura ambiente. La purificación de la mezcla de reacción proporcionó péptido puro.

En el caso de preparar un compuesto con ácido S-acetiltioglicólico acoplado a dos grupos ácido aminodioxaoctanoico y al péptido, se acopló el péptido purificado del método 5 (que tenía un grupo amino libre) a AcSCH<sub>2</sub>-CO-(NHCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CO)<sub>2</sub>-OH (30 eq.)/HOBt (30 eq.)/DIC (30 eq.) en NMP durante 40 h a temperatura ambiente. Se purificó la mezcla y se eliminó el grupo ivDde. Una segunda purificación dio el producto final como un liofilizado blanco.

Alternativamente se acopló ácido Fmoc-aminodioxaoctanoico dos veces sucesivamente al péptido (producido mediante el método 5) seguido por eliminación de Fmoc y acoplamiento a ácido S-acetiltioglicólico.

*Método 13: Preparación de homodímeros y heterodímeros*

Se prepararon los péptidos purificados requeridos mediante SPPS usando el método 5. Para preparar homodímeros, se disolvió la mitad del péptido necesario para preparar el dímero en DMF y se trató con 10 equivalentes de éster bis-N-hidroxisuccinimidílico del ácido glutárico. Se monitorizó el avance de la reacción mediante análisis por HPLC y espectroscopía de masas. Al completarse la reacción, se eliminaron los compuestos volátiles a vacío y se lavó el residuo con acetato de etilo para eliminar el éster bis-NHS sin reaccionar. Se secó el residuo, se redisolvió en DMF anhidra y se trató con la otra media porción del péptido en presencia de 2 equivalentes de DIEA. Se dejó avanzar la reacción durante 24 h. Se aplicó esta mezcla directamente a una columna de RP-HPLC C-18 XTerra de Waters Associates y se purificó mediante elución con un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (conteniendo ambos TFA al 0,1%).

En el caso de heterodímeros, se hizo reaccionar uno de los monómeros con el éster bis-NHS del ácido glutárico y, tras eliminar por lavado el exceso de éster bis-NHS, se añadió la segunda amina en presencia de DIEA. Después de la reacción, se purificó la mezcla mediante HPLC preparativa.

Preparación de polipéptidos de unión a KDR y complejo VEGF/KDR

Usando los métodos descritos anteriormente, se prepararon los polipéptidos de unión a KDR y complejo VEGF/KDR de la tabla 1. Tal como se usa en la tabla 1, la letra "J" en las secuencias peptídicas se refiere al grupo espaciador o ligador, 8-amino-3,6-dioxaoctanoílo. También tal como se usa en la tabla 1, la designación "C\*" se refiere a un residuo de cisteína que contribuye a un enlace disulfuro. Se evaluó la capacidad de los polipéptidos biotinilados para unirse a KDR usando el conjunto de ensayo descrito a continuación.

Los siguientes péptidos biotinilados se unieron bien a las células que expresan KDR: P13-XB (Kd de 1,81 nM +/-

## ES 2 523 654 T3

0,27), P5-XB (Kd de 14,87 +/- 5,07 nM, promedio de cuatro experimentos), P6-XB (Kd de 10,00 +/- 2,36 nM, promedio de cuatro experimentos), P12-XB (Kd de 4,031 +/- 0,86 nM, promedio de tres experimentos), P6-F-XB (Kd de 6,94 +/- 1,94 nM, un experimento), y P12-F-XB (Kd de 3,02 +/- 0,75 nM, un experimento).

5 Tabla 1. Secuencia o estructura de péptidos y derivados peptídicos

Número de ref.	Estructura o secuencia	SEQ ID NO
P1	Péptido control	
P1-B	Péptido control biotinilado	
P1-XB	Péptido control biotinilado con espaciador	
P2	AGWIECYHPDGICYHFGT	1
P2-D	Ac-AGWIEC*YHPDGIC*YHFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	
P3	AGWLECYAEFGHCYNFGT	2
P3-D	Ac-AGWLEC*YAEFGHC*YNFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	
P4	AGDSWCSTEITYCEMIGT	3
P4-D	Ac-AGDSWC*STEITYC*EMIGT-GGGK-NH <sub>2</sub>	
P5	AGPKWCEEDWYYCMITGT	4
P5-D	Ac-AGPKWC*EEDWYYC*MITGT-GGGK-NH <sub>2</sub>	
P5-E	Ac-AGPK(ivDde)WC*EEDWYYC*MITGTGGGK-NH <sub>2</sub>	
P5-B	Ac-AGPKWC*EEDWYYC*MITGT-GGGK-(biotina)-NH <sub>2</sub>	
P5-XB	Ac-AGPKWC*EEDWYYC*M1TGTGGGK-(biotina-JJ)-NH <sub>2</sub>	
P6	GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDP	5
P6-D	Ac-GDSRVC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	
P6-B	Ac-GDSRVC*WEDSWGGEVC*FRYDP-GGGK-(biotina)-NH <sub>2</sub>	
P6-XB	Ac-GDSRVC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK-(biotina-JJ)-NH <sub>2</sub>	
P6-F-XB	Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK-(biotina-JJ)-NH <sub>2</sub>	
P7	GDWWECKREEYRNTTWC AWADP	6
P7-D	Ac-GDWWEK*REEYRNTTWC*AWADPGGGK-NH <sub>2</sub>	
P7-E	Ac-GDWWEK(ivDde)REEYRNTTWC*AWADPGGGK-NH <sub>2</sub>	
P8	GDPDCTMWGDSGRWYCFPADP	7
P8-D	Ac-GDPDCT*TMWGDSGRWYC*FPADPGGGK-NH <sub>2</sub>	
P9	AQEPEGYAYWEVITLYHEEDGDGG	8
P9-D	Ac-AQEPEGYAYWEVITLYHEEDGDGGK-NH <sub>2</sub>	
P10	AQAFPRFGDDYWIQQYLRYTDGG	9
P10-D	Ac-AQAFPRFGDDYWIQQYLRYTDGGK-NH <sub>2</sub>	
P11	AQGDYVYWEIIELTGATDHTPPGG	10
P11-D	Ac-AQGDYVYWEIIELTGATDHTPPGGK-NH <sub>2</sub>	
P12	AGPTWCEDDWYYCWLFGT	11
P12-D	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGT-NH <sub>2</sub>	
P12-XB	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGT-GGGK-(biotina-JJ)-NH <sub>2</sub>	
P12-F-XB	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK-(biotina-JJ)-NH <sub>2</sub>	
P12-C	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGKJGC(Acm)-(N,N-dimetil-GSC(Acm)-NH <sub>2</sub>	
P13	AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGG	12
P13-D	Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGG-NH <sub>2</sub>	

P13-XB	Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFSLGG-GGGK-(biotina-JJ-)-NH <sub>2</sub>	
P14	GSDHHCYLHNGQWICYPFAPGGGK	13
P14-D	Ac-GSDHHC*YLHNGQWIC*YPFAPGGGK-NH <sub>2</sub>	
P15	GDYPWCHELSDSVTRFCVPWDPGGGK	14
P15-D	Ac-GDVPWC*HELSDSVTRFC*VPWDPGGGK-NH <sub>2</sub>	
P16	GDDHMC RSPDYQDHFVFCMYWDPGGGK	15
P16-D	Ac-GDDHMC*RSPDYQDHFVFC*MYWDPGGGK-NH <sub>2</sub>	
P17	GDPPLCYFVGTQEWHHHCNPFDPGGGK	16
P17-D	Ac-GDPPLC*YFVGTQEWHHC*NPFDPGGGK-NH <sub>2</sub>	
P18	GDGSWC EMRQDVGKWNCFSDDPGGGK	17
P18-E	Ac-GDGSWC*EMRQDVGK(-ivDde-)WNC*FSDDPGGGK-NH <sub>2</sub>	
P19	AQRGDYQEYWHQQLVEQLKLLGGGK	18
P19-E	Ac-AQRGDYQEYWHQQLVEQLK(-ivDde-)LLGGGK-NH <sub>2</sub>	
P20	GDNWECGWSNMFQKEFCARPDPPGGGK	19
P20-E	Ac-GDNWEC*GWSNMFQK(-ivDde-)EFC*ARPDPPGGGK-NH <sub>2</sub>	
P21	AGPGPCK(-ivDde-)GYMPHCWYMGTTGGGK	20
P21-E	Ac-AGPGPC*K(-ivDde-)GYMPHC*WYMGTTGGGK-NH <sub>2</sub>	
P22	AGYGPC AEMSPWLCWYPGTTGGGK	21
P22-D	Ac-AGYGPC*AEMSPWLC*WYPGTTGGGK-NH <sub>2</sub>	

## Ejemplo 2

### 5 Ensayo de unión a perlas para confirmar la capacidad de péptidos identificados mediante presentación en fagos para unirse a células que expresan KDR

Se realizaron los siguientes experimentos para evaluar la capacidad de péptidos de unión a KDR para unirse a células que expresan KDR. En este experimento, se conjugaron péptidos de unión a KDR, P5-B y P5-XB y P6-B y P6-XB, con perlas fluorescentes y se evaluó su capacidad para unirse a células 293H que expresan KDR. Los experimentos muestran que pueden usarse ambas secuencias peptídicas para unir partículas tales como perlas a sitios que expresan KDR. En general, los péptidos P6 mostraron mejor unión a las células que expresan KDR que P5. Sin embargo, la unión de ambos péptidos mejoró con la adición de un espaciador.

### 15 Biotinilación de un anticuerpo anti-KDR

Se biotiniló un anticuerpo anti-KDR de Sigma (V-9134), como líquido ascítico, usando un kit de Molecular Probes (F-6347) según las instrucciones del fabricante.

### 20 Preparación de perlas fluorescentes conjugadas con péptido

Se incubaron 0,1 ml de una disolución madre 0,2 mM de cada péptido biotinilado (preparado tal como se expuso anteriormente, en DMSO al 50%) con 0,1 ml de microesferas fluorescentes rojas recubiertas con Neutravidin (2 micrómetros de diámetro, ordenadas a medida de Molecular Probes) y 0,2 ml de tampón MES 50 mM (Sigma M-8250), pH 6,0, durante 1 hora a temperatura ambiente en un dispositivo rotatorio. Como control positivo, se incubó anticuerpo anti-KDR biotinilado con las perlas recubiertas con Neutravidin como anteriormente, excepto porque se usaron 0,03 mg de la preparación de anticuerpo biotinilado en PBS (Gibco 14190-136) en lugar de disolución de péptido. Las perlas pueden almacenarse a 4°C hasta que se necesiten durante hasta 1 semana.

### 30 Transfección de células 293H

Se transfectaron células 293H usando el protocolo descrito en el ejemplo 6. Se realizó la transfección en placas de 96 pocillos negras/transparentes (Becton Dickinson, n.º de cat. 354640). Las células en una mitad de la placa (48 pocillos) se transfectaron de manera simulada (sin ADN) y las de la otra mitad de la placa se transfectaron con ADNc de KDR. Las células eran confluentes al 80-90% en el momento de la transfección y completamente confluentes al día siguiente, en el momento del ensayo; de lo contrario se abortó el ensayo.

Ensayo de unión

5 A partir de las preparaciones de perlas anteriores, se centrifugaron 0,12 ml durante 10 minutos a 2000 rpm en una microcentrífuga a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 0,06 ml de MES pH 6,0. Después se agitó con formación de vórtice cada disolución de perlas y se sonicó en un baño de agua durante 15 min. A 1,47 ml de DMEM con alto contenido en glucosa (GIBCO 11965-084) con 1x disolución de aminoácidos no esenciales en MEM (NEAA) (GIBCO 11140-050) y FBS al 40% (Hyclone SH30070.02) se le añadieron 0,03 ml de las preparaciones de perlas sonicadas. Se drenaron placas de 96 pocillos sembradas con células 293H que se  
10 habían transfectado de manera simulada en las columnas 1 a 6, y se habían transfectado con KDR en las columnas 7 a 12 (tal como se describió anteriormente), y se lavaron una vez con DMEM con alto contenido en glucosa con 1x NEAA y FBS al 40%. A cada pocillo se le añadieron 0,1 ml de disolución de perlas, seis pocillos por preparación de perlas. Tras incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se drenaron los pocillos invirtiendo las placas y se lavaron cuatro veces con 0,1 ml de PBS con  $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$  (GIBCO 14040-117) con agitación a temperatura ambiente  
15 durante 5 minutos cada lavado. Tras el drenaje, se añadieron 0,1 ml de PBS por pocillo. Después se leyeron las placas en un fluorómetro FluoroCount de Packard a 550 nm de excitación/620 nm de emisión. Se usaron perlas de Neutravidin sin conjugar como control negativo mientras que se usaron perlas conjugadas con un anticuerpo anti-KDR biotinilado como control positivo para el ensayo.

20 Para calcular el número de perlas unidas por pocillo, se incluyó una curva patrón con números crecientes de las mismas perlas fluorescentes en cada placa de ensayo. Se usó la curva patrón para calcular el número de perlas unidas por pocillo basándose en la intensidad de fluorescencia de cada pocillo.

25 Tal como se muestra en la figura 1, las perlas de control positivo con anticuerpo anti-KDR unido se unieron claramente de manera preferible a las células que expresan KDR mientras que las perlas de avidina sin nada unido no se unieron a ningún tipo de célula. Las perlas de P5 biotinilado no se unieron a las células transfectadas con KDR significativamente más que a células transfectadas de manera simulada, pero la adición de un espaciador hidrófilo entre el resto peptídico y el grupo biotina potenció la unión a células de KDR sin aumentar la unión a células transfectadas de manera simulada. Las perlas de P6 biotinilado mostraron una mayor unión a células transfectadas  
30 con KDR. Al igual que sucedió para P5, la adición de un espaciador hidrófilo entre la porción peptídica y la biotina de la molécula mejoró significativamente la unión específica a KDR en las células transfectadas. Por tanto pueden usarse las secuencias peptídicas tanto de P5 como de P6 para unir partículas tales como perlas a sitios que expresan KDR.

**Ejemplo 3**Competencia de péptidos de unión a KDR y VEGF marcado con  $^{125}\text{I}$  por unirse a células 293H transfectadas con KDR

40 El siguiente experimento evalúa la capacidad de péptidos de unión a KDR para competir con VEGF marcado con  $^{125}\text{I}$  por unirse a KDR expresado por células 293H transfectadas. Mientras que el polipéptido de unión a KDR, P4, no compitió significativamente con VEGF marcado con  $^{125}\text{I}$ , P5-XB, P6 y P12-XB compitieron muy bien con VEGF marcado con  $^{125}\text{I}$ , inhibiendo el 96,29±2,97% y el 104,48±2,07% de la unión de VEGF marcado con  $^{125}\text{I}$ .

Transfección de células 293H

50 Se transfectaron células 293H usando el protocolo descrito en el ejemplo 6. Se realizó la transfección en placas de 96 pocillos negras/transparentes (Becton Dickinson, n.º de cat. 354640). Las células en una mitad de la placa (48 pocillos) se transfectaron de manera simulada (sin ADN) y las de la otra mitad de la placa se transfectaron con ADNc de KDR. Las células eran confluentes al 80-90% en el momento de la transfección y completamente confluentes al día siguiente, en el momento del ensayo; de lo contrario se abortó el ensayo.

Preparación de medios M199

55 Para preparar medio M199 para el ensayo, se añadieron un paquete de medio M199 (GIBCO, n.º de cat. 31100-035), 20 ml de HEPES 1 mM (GIBCO, n.º de cat. 15630-080) y 2 g de gelatina DIFCO (DIFCO, n.º de cat. 0143-15-1) a 950 ml de H<sub>2</sub>O destilada doble (dd) y se ajustó el pH de la disolución a 7,4 añadiendo aproximadamente 4 ml de NaOH 1 N. Tras el ajuste del pH, se calentó el medio M199 hasta 37°C en un baño de agua durante 2 h para disolver la gelatina, después se esterilizó por filtración usando filtros de 0,2 µm (Coming, n.º de cat. 43109), y se almacenó a 4°C para usarse más tarde en el ensayo.  
60

Preparación de disoluciones de péptido

65 Se prepararon disoluciones madre 3 mM de péptidos P6, P4, P5-XB y P12-XB (preparados tal como se describió anteriormente) en DMSO al 50%.

Preparación de disolución de VEGF marcado con <sup>125</sup>I para el ensayo

Se reconstituyeron 25 µCi de VEGF marcado con <sup>125</sup>I liofilizado (Amersham, n.º de cat. IM274) con 250 µl de ddH<sub>2</sub>O para crear una disolución madre, que se almacenó a -80°C para su uso posterior. Para cada ensayo, se preparó una disolución 300 pM de VEGF marcado con <sup>125</sup>I de manera reciente diluyendo la disolución madre anterior en medio M199. Se calculó diariamente la concentración de VEGF marcado con <sup>125</sup>I basándose en la actividad específica del material en ese día.

Preparación de disolución de péptido 30 µM y 0,3 µM en VEGF marcado con <sup>125</sup>I 300 pM

Para cada placa de 96 pocillos, se prepararon 10 ml de VEGF marcado con <sup>125</sup>I 300 pM en medio M199 a 4°C. Se diluyó cada disolución de péptido (3 mM, preparada tal como se describió anteriormente) 1:100 y 1:10000 en 300 µl de medios M199 con VEGF marcado con <sup>125</sup>I 300 pM para preparar disoluciones de péptido 30 µM y 0,3 µM que contenían 300 pM de VEGF marcado con <sup>125</sup>I. Una vez preparadas, se mantuvieron las disoluciones en hielo hasta que estaban listas para usarse. Se preparó la dilución de péptidos en medios M199 que contenía VEGF marcado con <sup>125</sup>I 300 pM de manera reciente para cada experimento.

Ensayo para detectar la competencia con VEGF marcado con <sup>125</sup>I en células 293H

Se usaron células 24 h tras la transfección, y para preparar las células para el ensayo, se lavaron 3 veces con medio M199 a temperatura ambiente y se colocaron en la nevera. Tras 15 minutos, se eliminó el medio M199 de la placa y se sustituyó por 75 µl de VEGF marcado con <sup>125</sup>I 300 pM en medio M199 (preparado como anteriormente). Se añadió cada dilución a tres pocillos separados de células transfectadas de manera simulada y con KDR. Tras incubarse a 4°C durante 2 h, se lavaron las placas 5 veces con tampón de unión frío, se secaron con paño suavemente y se comprobaron con microscopio para determinar la pérdida de células. Se añadieron 100 µl de disolución de solubilización (Triton X-100 al 2%, glicerol al 10%, BSA al 0,1%) a cada pocillo y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se mezcló la disolución de solubilización en cada pocillo aspirando y devolviendo con pipeta, y se transfirió a tubos de 1,2 ml. Se lavó cada pocillo dos veces con 100 µl de disolución de solubilización y se añadieron los lavados al tubo de 1,2 ml correspondiente. Después se transfirió cada tubo de 1,2 ml a un tubo de 15,7 mm X 10 cm para contarse en un contador gamma de LKB (intervalo de <sup>125</sup>I durante 1 minuto).

Competencia de péptidos con VEGF marcado con <sup>125</sup>I en células 293H

Se evaluó la capacidad de péptidos de unión a KDR, P6, P4, P5-XB y P12-XB, para bloquear específicamente la unión de VEGF marcado con <sup>125</sup>I a KDR en células transfectadas de manera simulada y transfectadas con KDR. Se usó P4 en el ensayo como control negativo. Se seleccionó porque sólo muestra escasa unión a KDR en ensayos de FP, y por tanto no se espera que desplace o compita con VEGF. Para calcular la unión específica a KDR, se restó la unión de VEGF marcado con <sup>125</sup>I a células transfectadas de manera simulada de células transfectadas con KDR. Por tanto, no se incluye la unión de VEGF marcado con <sup>125</sup>I a sitios distintos de KDR (que pueden estar presentes o no en células 293H) cuando se calcula la inhibición de la unión de VEGF marcado con <sup>125</sup>I a células 293H mediante péptidos de unión a KDR.

La figura 2 muestra la inhibición en porcentaje de la unión de VEGF marcado con <sup>125</sup>I mediante péptidos (P6, P4, P5-XB y P12-XB) a dos concentraciones diferentes (30 µM y 0,3 µM) a células 293H transfectadas con KDR. Se calculó la inhibición en porcentaje usando la fórmula  $[(Y1-Y2) \times 100 / Y1]$ , donde Y1 es la unión específica a células 293H transfectadas con KDR en ausencia de péptidos, e Y2 es la unión específica a células 293H transfectadas con KDR en presencia de péptidos o DMSO (vehículo). Se calculó la unión específica a células 293H transfectadas con KDR restando la unión a células 293H transfectadas de manera simulada de la unión a células 293H transfectadas con KDR. Los resultados para P6, P4 y P5-XB son el promedio de tres experimentos  $\pm$  DE, mientras que el resultado para P12-XB es de un experimento.

Tal como se muestra en la figura 2, P4, que, debido a su Kd relativamente alta (>2 µM, medido mediante FP frente a KDR-Fc), se usó como control negativo, no compitió significativamente con VEGF marcado con <sup>125</sup>I, el 12,69 $\pm$ 7,18% a 30 µM y el 5,45 $\pm$ 9,37% a 0,3 µM (figura 2). Al mismo tiempo, P6 y P12-XB compitieron muy bien con VEGF marcado con <sup>125</sup>I, inhibiendo el 96,29 $\pm$ 2,97% y el 104,48 $\pm$ 2,07% de la unión de VEGF marcado con <sup>125</sup>I a 30 µM y el 52,27 $\pm$ 3,78% y el 80,96 $\pm$ 3,8% a 0,3 µM, respectivamente. La inhibición en porcentaje con P5-XB fue del 47,95 $\pm$ 5,09% de la unión de VEGF marcado con <sup>125</sup>I a 30 µM y el 24,41 $\pm$ 8,43% a 0,3 µM (figura 2). Por tanto, tal como se esperaría, un péptido que sólo se une escasamente a KDR no bloqueó la unión de VEGF, mientras que otros tres péptidos de unión a KDR sí que compitieron con VEGF, y su potencia aumentó con su afinidad de unión. Este ensayo también debe ser útil para identificar péptidos que se unen estrechamente a KDR pero no compiten con VEGF, una característica que puede ser útil para obtener imágenes de KDR en tumores, en los que con frecuencia hay una alta concentración local de VEGF que de lo contrario bloquearía la unión de moléculas de direccionamiento a KDR.

**Ejemplo 4**

Inhibición de la activación de receptor KDR inducida por VEGF mediante péptidos identificados mediante presentación en fagos

5 Se evaluó la capacidad de péptidos de unión a KDR identificados mediante presentación en fagos para inhibir la activación inducida por VEGF (fosforilación) de KDR usando el siguiente ensayo. Se muestra que varios péptidos de la invención inhiben la activación de KDR en constructos monoméricos y/o tetraméricos, incluyendo P5-D, P6-D, P10-D y P11-D. Tal como se comentó anteriormente, los péptidos que inhiben la activación de KDR pueden ser  
10 útiles como agentes antiangiogénicos.

10 Se obtuvieron células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC) (Biowhittaker, n.º de cat. CC-2519) congeladas en nieve carbónica y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta que se descongelaron. Se descongelaron estas células, se sometieron a pases y se mantuvieron tal como se describe por el fabricante en medio EGM-MV (Biowhittaker, n.º de cat. CC-3125). Se dejó que células sembradas en placas de 100 mm se volvieran confluentes, después se cultivaron durante la noche en medio EBM basal que carecía de suero (Biowhittaker, n.º de cat. CC-3121). A la mañana siguiente, se sustituyó el medio en las placas por 10 ml de medio EBM recién preparado a 37°C que o bien no contenía ningún aditivo (control negativo), o bien contenía VEGF 5 ng/ml (Calbiochem, n.º de cat. 676472 o Peprotech, n.º de cat. 100-20) (control positivo) o VEGF 5 ng/ml más la concentración indicada del péptido de unión a KDR (preparado tal como se describió anteriormente). En algunos  
20 casos, se usó un anticuerpo anti-KDR neutralizante (n.º de cat. AF357, R&D Systems) como inhibidor de activación de control positivo. En tales casos, se incubó previamente el anticuerpo con las células de prueba durante 30 min a 37°C antes de la adición de medio recién preparado que contenía tanto VEGF como el anticuerpo. Tras incubar las placas durante 5 min en una incubadora de cultivo tisular a 37°C se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco helada (D-PBS) que contenía calcio y magnesio y se colocaron en hielo si  
25 retirar los últimos 10 ml de D-PBS. Se drenó la primera placa de un conjunto y se añadieron 0,5 ml de tampón de lisis de Triton (base Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 137 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1%, EDTA (ácido etilendiaminetetraacético) 2 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, NaF 100 mM, pirofosfato de sodio 50 mM, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml). Se rasparon rápidamente las células en el tampón de lisis usando un raspador celular (Falcon, n.º de cat. 353087), se dispersaron aspirando y devolviendo  
30 con pipeta brevemente, y se transfirió el lisado resultante a la segunda placa drenada del par. Se usaron otros 0,5 ml de tampón de lisis para aclarar la primera placa, después se transfirieron a la segunda placa, que entonces también se raspó y se dispersó. Se transfirió el lisado combinado de las dos placas a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se repitió el procedimiento anterior para cada uno de los controles y las muestras de prueba (péptidos de unión a KDR), uno cada vez. Se almacenaron los lisados en hielo hasta que se habían procesado todas las muestras. En este punto, o  
35 bien se almacenaron las muestras a -70°C o bien se procesaron hasta el final del ensayo sin interrupción.

Se aclararon previamente los lisados, o bien recién preparados o bien congelados y descongelados, mediante adición de 20 µl de perlas de proteína A-Sepharose (Sigma 3391, previamente hinchadas en D-PBS), se lavaron tres veces con un gran exceso de D-PBS, se reconstituyeron con 6 ml de D-PBS para generar una suspensión al 50% y  
40 se agitaron mediante oscilación 4°C durante 30 min. Se sedimentaron las perlas mediante centrifugación durante 2 min en un instrumento PicoFuge (Stratagene, n.º de cat. 400550) a 2000xg y se transfirieron los sobrenadantes a tubos de 1,5 ml nuevos. Se añadieron 20 µg de anticuerpo anti-Flk-1 (Santa Cruz Biotechnology, n.º de cat. sc-504) a cada tubo y se incubaron los tubos durante la noche (16-18 h) a 4°C en un dispositivo rotatorio para inmunoprecipitar KDR. Al día siguiente se añadieron 40 µl de perlas de proteína A-Sepharose a los tubos, que  
45 después se incubaron a 4°C durante 1 h en un dispositivo rotatorio. Posteriormente se lavaron las perlas en cada tubo tres veces mediante centrifugación durante 2 min en un instrumento PicoFuge, descartando el sobrenadante y dispersando las perlas en 1 ml de tampón TBST recién añadido (base Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 137 mM y Tween 20 al 0,1%). Tras centrifugar y eliminar el líquido del último lavado, se añadieron 40 µl de tampón de muestra Laemmli SDS-PAGE (Bio-Rad, n.º de cat. 161-0737) a cada tubo y se taparon los tubos y se sometieron a ebullición durante 5  
50 min. Tras enfriar, se sedimentaron las perlas en cada tubo mediante centrifugación y se transfirieron los sobrenadantes que contenían KDR inmunoprecipitado a tubos nuevos y se usaron inmediatamente o se congelaron y se almacenaron a -70°C para su análisis posterior.

Se llevó a cabo la detección de KDR fosforilado así como de KDR en los inmunoprecipitados mediante análisis de  
55 inmunotransferencia. Se resolvió la mitad (20 µl) de cada inmunoprecipitado en un gel Ready Gel prefabricado al 7,5% (Bio-Rad, n.º de cat. 161-1154) mediante SDS-PAGE según el método de Laemmli (U. K. Laemmli "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4". Nature (1970); 227, 680-685).

Usando un aparato mini-Protean 3 de Bio-Rad (n.º de cat. 165-3302), se sometieron las proteínas resueltas en cada  
60 gel a electrotransferencia a una membrana de PVDF (Bio-Rad, n.º de cat. 162-0174) en una célula mini Trans-Blot de Bio-Rad (n.º de cat. 170-3930) en tampón CAPS (CAPS 10 mM, Sigma, n.º de cat. C-6070, metanol de calidad ACS al 1%, pH 11,0) durante 2 h a 140 mA según el método de Matsudaira (P. Matsudaira. "Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes". J. Biol. Chem. (1987); 262, 10035-10038). Se bloquearon las transferencias a temperatura ambiente en Blotto-TBS al 5% (Pierce, n.º de cat. 37530) previamente calentado hasta 37°C durante 2 h. En primer lugar se estudiaron con sonda las transferencias  
65

con un anticuerpo anti-fosfotirosina (Transduction Labs, n.º de cat. P11120), diluido 1:200 en Blotto-TBS al 5% con Tween 20 al 0,1% añadido durante 2 h a temp. ambiente. Se eliminó el anticuerpo no unido lavando las transferencias cuatro veces con D-PBS que contenía Tween 20 al 0,1% (D-PBST), 5 min por lavado. Posteriormente, se estudiaron con sonda las transferencias con un anticuerpo de oveja conjugado con HRP anti-ratón (Amersham Biosciences, n.º de cat. NA931) diluido 1:25.000 en Blotto-TBS al 5% con Tween 20 al 0,1% añadido durante 1 h a temperatura ambiente, y se lavaron cuatro veces con D-PBST. Finalmente, se incubaron las transferencias con 2 ml de un sustrato quimioluminiscente (ECL Plus, Amersham, n.º de cat. RPN2132) propagado por encima durante 2 min, se drenaron bien gota a gota, se colocaron en un protector de lámina de plástico (C-Line Products, n.º de cat. 62038), y se expusieron a una película de rayos X (Kodak BioMax ML, n.º de cat. 1139435) durante periodos de tiempo variables para lograr un contraste óptimo.

Para confirmar que se compararon cantidades similares de KDR en el ensayo, se separaron las transferencias incubando durante 30 min a 37°C en TBST con su pH ajustado a 2,4 con HCl, se bloquearon durante 1 h a temp. ambiente con Blotto-TBS al 5% con Tween 20 al 0,1% (Blotto-TBST), y volvieron a estudiarse con sonda con un anticuerpo policlonal anti-Flk-1 (n.º de cat. sic-315 de Santa Cruz Biotech), 1:200 en Blotto-TBST al 5% con suero de cabra normal al 1% (Life Tech, n.º de cat. 16210064) durante 2 h a temp. ambiente. Se eliminó el anticuerpo no unido lavando las transferencias cuatro veces con D-PBST, 5 min por lavado. Posteriormente, se estudiaron con sonda las transferencias con un anticuerpo secundario de asno conjugado con HRP anti-conejo (Amersham Biosciences, n.º de cat. NA934) diluido 1:10.000 en Blotto-TBST al 5% durante 1 h a temperatura ambiente, y se lavaron cuatro veces con D-PBST. Finalmente, se incubaron las transferencias con 2 ml de sustrato quimioluminiscente y se expusieron a una película de rayos X tal como se describió anteriormente.

Las inmunotransferencias de inmunoprecipitados de KDR preparados a partir de HUVEC con y sin estimulación con VEGF previa, mostradas en la figura 3, demostraron que podía detectarse KDR activado (fosforilado) cuando se estimularon las HUVEC con VEGF. Un anticuerpo anti-fosfotirosina (PY-20) no detectó proteínas fosforiladas cerca de la posición de migración de KDR a partir de HUVEC no estimuladas en las transferencias, pero tras cinco minutos de estimulación con VEGF, se observó sistemáticamente una banda intensa en la ubicación esperada (figura 3, panel superior). Cuando se separaron las transferencias de anticuerpos unidos mediante incubación en disolución ácida y después volvieron a estudiarse con sonda con un anticuerpo anti-KDR (sc-315), se confirmó que la identidad de la banda de proteína fosforilada era KDR. Además, se observó que los inmunoprecipitados de HUVEC no estimuladas contenían aproximadamente tanto KDR total como inmunoprecipitados de HUVEC con estimulación con VEGF (figura 3, panel inferior).

Resulta razonable concluir que el KDR fosforilado detectado se formó a partir de KDR preexistente a través de autofosforilación de dímeros de KDR resultantes de la unión de VEGF ya que cinco minutos no es tiempo suficiente para sintetizar y procesar un receptor de superficie celular glicosilado grande tal como KDR.

Se evaluó la capacidad del ensayo para detectar agentes que pueden bloquear la activación mediante VEGF de KDR añadiendo una serie de compuestos a HUVEC en combinación con VEGF y midiendo la fosforilación de KDR con el ensayo de inmunotransferencia descrito anteriormente. Como controles negativo y positivo, también se sometieron a prueba en cada ensayo inmunoprecipitados de HUVEC no estimuladas y de HUVEC estimuladas con VEGF en ausencia de cualquier compuesto de prueba. Cuando se combinó un anticuerpo anti-KDR neutralizante (n.º de cat. AF-357 de R&D Systems) con el VEGF, el grado de fosforilación de KDR se redujo enormemente (figura 4, panel superior), lo que indica que el anticuerpo podía interferir con la capacidad de VEGF para unirse a, y activar, KDR. Este resultado se esperaba porque la capacidad del anticuerpo para bloquear la síntesis de ADN inducida por VEGF es parte de las pruebas del control de calidad del fabricante del anticuerpo. El nuevo estudio con sonda de la transferencia con un anticuerpo anti-KDR (figura 4, panel inferior) indicó que estaba presente ligeramente menos KDR total en el carril tratado con VEGF+anticuerpo (+V+ $\alpha$ -KDR) con respecto al carril tratado sólo con VEGF (+V), pero la diferencia no era lo bastante grande como para explicar la abundancia mucho menor de KDR fosforilado en el carril tratado con anticuerpo.

Para evaluar la potencia de un péptido de unión a KDR (P10-D) identificado mediante presentación en fagos, se repitió el experimento con P10-D en presencia de VEGF. P10-D podía inhibir en gran medida la fosforilación de KDR inducida por VEGF. El nuevo estudio con sonda de la transferencia para determinar el KDR total mostró que había incluso más KDR total en las células tratadas con VEGF+P10-D (+V+P10-D) que en las células tratadas sólo con VEGF (+V) (figura 5, panel inferior). Por tanto, queda claro que la disminución de la fosforilación de KDR en presencia de P10-D no se debe a una carga de muestra diferencial, sino más bien a la capacidad del compuesto para inhibir la activación mediante VEGF de KDR.

Usando los métodos de este ejemplo, los siguientes péptidos demostraron una inhibición de al menos el 50% de la fosforilación de KDR inducida por VEGF a 10  $\mu$ M:

P2-D, P3-D, P6-D, P7-E, P8-D, P9-D, P10-D, P1-D.

P2 y P6 fueron los compuestos más potentes en el ensayo, produciendo una inhibición de al menos el 50% de la fosforilación de KDR inducida por VEGF a 1  $\mu$ M.

Se sometieron a prueba los siguientes péptidos en el ensayo y no produjeron inhibición significativa de la activación de KDR a 10  $\mu\text{M}$ :

5 P5-E, P14-D, P15-D, P16-D, P17-D, P18-E, P19-E, P20-E, P21-E, P23-D

Además, complejos tetraméricos de derivados biotinilados P6-XB o P12-XB (preparados tal como se describió anteriormente y se comenta en el ejemplo 6, a continuación) produjeron una inhibición de al menos el 50% de la fosforilación de KDR inducida por VEGF a 10 nM.

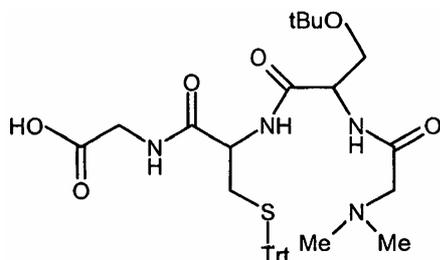
10

### Ejemplo 5

#### Unión de polipéptido marcado con Tc a células 293H transfectadas con KDR

15 En este ejemplo, se evaluó la capacidad de P12-C marcado con Tc para unirse a KDR usando células 293H transfectadas con KDR. Los resultados muestran que P12-C marcado con Tc se unió de manera significativamente mejor a células 293H transfectadas con KDR que a células 293H transfectadas de manera simulada, y la unión aumentó con la concentración del polipéptido marcado con Tc de una manera lineal.

#### Preparación de quelato peptídico (P12-C) para la unión a Tc mediante SPPS



25 A un recipiente de reacción de SPPS de 250 ml se le añadieron 6,64 mmol de resina H-Gly-2-Cl-tritilo (0,84 mmol/g, Novabiochem). Se hinchó en 80 ml de DMF durante 1 h. Para cada ciclo de acoplamiento se le añadieron a la resina 26,6 mmol de DIEA, 26,6 mmol de un Fmoc-aminoácido en DMF (EM Science), 26,6 mmol de HOBT (Novabiochem) en DMF y 26,6 mmol de DIC. El volumen total de DMF fue de 80 ml. Se agitó la mezcla de reacción durante 4 h. Después se filtró la resina y se lavó con DMF (3 x 80 ml). Se añadió una disolución de piperidina al 20% en DMF (80 ml) a la resina y se agitó durante 10 min. Se filtró la resina y se repitió este tratamiento con piperidina. Finalmente se lavó la resina con DMF (3 x 80 ml) y estaba lista para el siguiente ciclo de acoplamiento. En el último ciclo de acoplamiento, se acopló N,N-dimetil-glicina (Aldrich) usando activación con HATU/DIEA. Por tanto, a una suspensión de N,N-dimetil-glicina (26,6 mmol) en DMF se le añadió una disolución de 26,6 mmol de HATU (Perseptive Biosystems) en DMF y 53,1 mmol de DIEA. Se añadió la disolución transparente a la resina y se agitó durante 16 h. Tras la síntesis, se filtró la resina y se lavó con DMF (3 x 80 ml),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 80 ml) y se secó. Se mezcló la resina con 80 ml de  $\text{AcOH}/\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}/\text{DCM}$  (1/1/8, v/v/v) y se agitó durante 45 min. Se filtró la resina y se evaporó el filtrado para obtener una pasta. La purificación del material en bruto mediante cromatografía en gel de sílice usando el 25% de  $\text{MeOH}/\text{DCM}$  proporcionó 2,0 g del producto final.

#### Acoplamiento del quelato peptídico (P12-C) al péptido (acoplamiento de fragmentos)

40

A una mezcla de  $\text{Me}_2\text{N-Gly-Cys(Trt)-Ser(tBu)-Gly-OH}$  purificado e hidroxibenzotriazol (0,0055 mmol) en DMF (0,25 ml), se le añadió diisopropilcarbodiimida (0,0055 mmol) y se agitó la mezcla a TA durante 6 h. Después se añadió el péptido (0,005 mmol) en DMF (0,25 ml) a la mezcla de reacción y se continuó la agitación durante 6 h adicionales. Se eliminó la DMF a vacío y se trató el residuo con reactivo B y se agitó durante 3 h. Se eliminó el TFA a presión reducida y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa usando acetonitrilo-agua que contenía TFA al 0,1%. Se recogieron las fracciones que contenían el producto puro y se liofilizaron para proporcionar el péptido. Se caracterizó el péptido mediante ES-EM y se determinó la pureza mediante gradiente de RP-HPLC (acetonitrilo-agua/TFA al 0,1%).

#### Síntesis de péptido marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$

50

Se preparó una disolución estannosa de gluconato añadiendo 2 ml de una disolución de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en  $\text{HCl}$  1 N purgado con nitrógeno a 1,0 ml de agua purgada con nitrógeno que contenía 13 mg de glucoheptonato de sodio. A un vial de inyector automático de 4 ml se le añadieron 20-40  $\mu\text{l}$  (20 - 40  $\mu\text{g}$ ) de ligando P12-C disuelto en etanol/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50, 6-12 mCi de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  en solución salina y 100  $\mu\text{l}$  de disolución estannosa de glucoheptonato. Se calentó la mezcla a 100°C durante 22 min. La pureza radioquímica resultante (RCP) fue del 10-47% cuando se analizó usando una columna para péptidos y proteínas C18 de Vydac que se eluyó a una velocidad de flujo de 1

55

ml/min con el 66% de H<sub>2</sub>O (TFA al 0,1%)/el 34% de ACN (TFA al 0,085%). Se purificó la mezcla de reacción mediante HPLC en una columna C18 de Vydac (4,6 mm x 250 mm) a una velocidad de flujo de 1 ml/min, usando TFA al 0,1% en agua como fase acuosa y TFA al 0,085% en acetonitrilo como fase orgánica. Se usó el siguiente gradiente; el 29,5% de fase orgánica durante 35 min, aumento hasta el 85% de fase orgánica a lo largo de 5 min, manteniendo durante 10 min. Se recogió la fracción que contenía <sup>99m</sup>Tc-P12-C (que ya no contenía el grupo protector ACM) en 500 µl de un tampón de estabilización que contenía ácido ascórbico 5 mg/ml e hidroxipropil-γ-ciclodextrina 16 mg/ml en tampón fosfato 50 mM. Se concentró la mezcla usando un aparato Speed Vacuum para eliminar el acetonitrilo, y se añadieron 200 µl de HSA al 0,1% en tampón citrato 50 mM, pH 5. El producto resultante tenía una RCP del 100%. Antes de la inyección en animales, se diluyó el compuesto hasta la radioconcentración deseada con solución salina normal.

#### Transfección de células 293H

Se transfectaron células 293H usando el protocolo descrito en el ejemplo de avidina-HRP. Se realizó la transfección en placas de 96 pocillos negras/transparentes (Becton Dickinson, n.º de cat. 354640). Las células en una mitad de las placas (48 pocillos) se transfectaron de manera simulada (sin ADN) y las células en la otra mitad de la placa se transfectaron con ADNc de KDR. Las células eran confluentes al 80-90% en el momento de la transfección y completamente confluentes al día siguiente, en el momento del ensayo; de lo contrario se abortó el ensayo.

#### Preparación de medios opti-MEMI con HSA al 0,1%

Se obtuvo Opti-MEMI de Invitrogen (n.º de cat. 11058-021) y se obtuvo albúmina sérica humana (HSA) de Sigma (n.º de cat. A-3782). Para preparar medios opti-MEMI con HSA al 0,1%, se añadió el 0,1% p/v de HSA a opti-MEMI, se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos, y después se esterilizó por filtración usando un filtro de 0,2 µm.

#### Preparación de diluciones de péptido marcado con Tc para el ensayo

Se diluyó disolución madre de P12-C marcado con Tc (117 pCi/ml) 1:100, 1:50, 1:25 y 1:10 en opti-MEMI con HSA al 0,1% para proporcionar disoluciones con una concentración final de 1,17, 2,34, 4,68 y 11,7 µCi/ml de P12-C marcado con Tc.

#### Ensayo para detectar la unión de péptido marcado con Tc

Se usaron células 24 h tras la transfección, y para preparar las células para el ensayo, se lavaron 1 vez con 100 µl de opti-MEMI con HSA al 0,1% a temperatura ambiente. Tras el lavado, se eliminó el opti-MEMI con HSA al 0,1% de la placa y se sustituyó por 70 µl de 1,17, 2,34, 4,68 y 11,7 µCi/ml de P12-C marcado con Tc (preparado como anteriormente). Se añadió cada dilución a tres pocillos separados de células transfectadas de manera simulada y con KDR. Tras incubar a temperatura ambiente durante 1 h, se transfirieron las placas a 4°C durante 15 minutos y se lavaron 5 veces con 100 µl de tampón de unión frío (opti-MEMI con HSA al 0,1%), se secaron con paño suavemente y se comprobaron con microscopio para determinar la pérdida de células. Se añadieron 100 µl de disolución de solubilización (Triton X-100 al 2%, glicerol al 10%, BSA al 0,1%) a cada pocillo y se incubaron las placas a 37°C durante 10 minutos. Se mezcló la disolución de solubilización en cada pocillo aspirando y devolviendo con pipeta, y se transfirió a tubos de 1,2 ml. Se lavó cada pocillo una vez con 100 µl de disolución de solubilización y se añadieron los lavados al tubo de 1,2 ml correspondiente. Después se transfirió cada tubo de 1,2 ml a un tubo de 15,7 mm X 100 cm para contarse en un contador gamma de LKB (intervalo de Tc durante 20 s).

#### Unión de péptidos marcados con Tc a células transfectadas con KDR

Se demostró la capacidad de P12-C marcado con Tc para unirse específicamente a KDR usando células 293H transfectadas de manera transitoria. Tal como se muestra en la figura 6, P12-C marcado con Tc se unió de manera significativamente mejor a células 293H transfectadas con KDR, en comparación con células 293H transfectadas de manera simulada. Para calcular la unión específica a KDR, se restó la unión de P12-C marcado con Tc a células transfectadas de manera simulada de la unión a células transfectadas con KDR. Tal como se muestra en la figura 7, se observó un aumento lineal de la unión específica de P12-C marcado con Tc a KDR al aumentar la concentración de P12-C marcado con Tc. Se esperaba la unión lineal porque la concentración de P12-C marcado con Tc sólo era

de ~100 pM (incluso a la mayor concentración, 11,7 µCi/ml, sometida a prueba en el ensayo), lo cual es muy inferior

al valor de K<sub>D</sub> de ~3-4 nM de P12 (calculado usando el ensayo de avidina-HRP), por tanto no se esperaba ninguna

saturación de la unión.

### Ejemplo 6

#### 5 Unión del complejo péptido de unión a KDR/avidina-HRP a células 293H transfectadas con KDR

Para determinar la unión de péptidos identificados mediante presentación en fagos a KDR expresado en células 293H transfectadas de manera transitoria, se desarrolló un ensayo novedoso que mide la unión de péptidos biotinilados complejados con Neutravidin-HRP a KDR sobre la superficie de las células transfectadas. Se usó este ensayo para examinar los péptidos biotinilados descritos anteriormente. Se usó Neutravidin-HRP en lugar de estreptavidina o avidina porque tiene una unión no específica menor a moléculas distintas de biotina, debido a la ausencia de restos de hidrato de carbono de unión a lectina y también debido a la ausencia del dominio RYD de unión al receptor de adhesión celular en Neutravidin.

15 En los experimentos descritos en el presente documento, se prepararon complejos tetraméricos de péptidos de unión a KDR, P6-XB, P5-XB, P12-XB y P13-XB, y un péptido control, P1-XB, y se sometieron a prueba para determinar su capacidad para unirse a células 293H que se transfectaron de manera transitoria con KDR. Los cuatro complejos tetraméricos de péptidos de unión a KDR se unieron a las células que expresan KDR; sin embargo, P13-XB mostró la mejor Kd (1,81 nM). Los complejos tetraméricos de péptidos de unión a KDR, P6-XB y P5-XB, mostraron unión mejorada con respecto a monómeros de los mismos péptidos. Además, se mostró que la inclusión de un espaciador (entre el péptido de unión a KDR y la biotina) en estos constructos mejoraba la unión en el experimento B.

25 El experimento C demuestra el uso de este ensayo para evaluar el efecto del suero sobre la unión de péptidos de la invención a KDR y complejo VEGF/KDR. La unión de P5-XB, P6-XB y P13-XB no se vio afectada significativamente por la presencia de suero, mientras que la unión de P12-XB se redujo en más del 50% en presencia de suero.

30 El experimento D demuestra que este ensayo es útil en la evaluación de distintas combinaciones de polipéptidos de unión a KDR y complejo VEGF/KDR para su uso en constructos de direccionamiento multiméricos que contienen más de un polipéptido de unión a KDR y complejo VEGF/KDR. Además, los experimentos D y E establecen que los constructos heteroméricos, que tienen dos o más péptidos de unión a KDR que se unen a sitios de unión diferentes, mostraron unión superior a constructos "homotetraméricos" de los péptidos de direccionamiento solos.

### 35 EXPERIMENTO A

#### Preparación de ARN-m y biblioteca de ADNc listo para 5' RACE

Se hicieron crecer células HUVEC hasta una confluencia de casi el 80% en matraces de cultivo tisular de 175 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson, Biocoat, n.º de cat. 6478) y después se añadieron 10 ng/ml de bFGF (Oncogene, n.º de cat. PF003) durante 24 h para inducir la expresión de KDR. Se aisló ARNm usando el kit Micro-fast track 2.0 de Invitrogen (n.º de cat. K1520-02). Se obtuvieron 12 µg de ARNm (medido mediante absorbancia a 260 nM) a partir de dos matraces (aproximadamente 30 millones de células) siguiendo las instrucciones del kit. Se realizó la transcripción inversa para generar ADNc con 2 µg de ARNm, cebador de oligo-dT (5'-(T)<sub>25</sub>GC-3') y/u oligómero Smart II (5'AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTA CGCGGG-3') usando transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). Se realizó la reacción en un volumen total de 20 µl y la mezcla de reacción contenía 2 µl de ARN, 1 µl de oligómero Smart II, 1 µl de cebador de oligo-dT, 4 µl de 5x tampón de primera cadena (Tris HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 30 mM), 1 µl de DTT (20 mM, también suministrado con transcriptasa inversa), 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP en ddH<sub>2</sub>O, Stratagene, n.º de cat. 200415), 9 µl de ddH<sub>2</sub>O y 1 µl de transcriptasa inversa de MMLV (Clonetech, n.º de cat. 8460-1). Se realizó la reacción de transcripción inversa durante 90 minutos a 42°C, y se detuvo la reacción mediante adición de 250 µl de tampón de tricina-EDTA (tricina 10 mM, EDTA 1,0 mM). El producto de la transcripción inversa, una biblioteca de ADNc listo para 5' RACE, puede almacenarse durante 3 meses a -20°C. Todo el agua usada para aplicaciones de ADN y ARN estaba libre de ADNasa y ARNasa y era de USB (n.º de cat. 70783).

#### 55 Clonación de s-KDR en el vector TOPO II

Para clonar s-KDR, se usó un oligómero en 5' (G ATG GAG AGC AAG GTG CTG CTG G) y un oligómero en 3' (C

CAA GTT CGT CTT TTC CTG GGC A). Se diseñaron para amplificar el dominio extracelular completo de KDR (~2,2

60 kpb) a partir de la biblioteca de ADNc listo para 5' RACE (preparada anteriormente) usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con polimerasa pfu (Stratagene, n.º de cat. 600135). Se realizó la reacción de PCR en un volumen total de 50 µl y la mezcla de reacción contenía 2 µl de biblioteca de ADNc listo para 5' RACE, 1 µl de

oligómero en 5' (10 µM), 1 µl de oligómero en 3' (10 µM), 5 µl de 10X tampón de PCR [tampón de PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8,8, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, KCl 100 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM) suministrado con la enzima pfu más DMSO al 1% y glicerol al 8%], 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM) y 40 µl de ddH<sub>2</sub>O. Se realizó la reacción de PCR usando un programa fijado para 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 68°C y 4 minutos a 72°C. Se purificó el producto de PCR mediante extracción con 1 volumen de fenol, seguido por extracción con 1 volumen de cloroformo y se precipitó usando 3 volúmenes de etanol y 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M. Se resuspendió el producto de PCR en 17 µl de ddH<sub>2</sub>O, se añadieron los 2 µl de 10X tampón de polimerasa Taq (Tris-HCl 100 mM, pH 8,8, KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, gelatina al 0,01%) y 1 µl de polimerasa Taq (Stratagene, n.º de cat. 600131) para generar una proyección de A en cada extremo del producto. Tras incubar durante 1 hora a 72°C se clonó el producto modificado directamente en un vector TOPO II de Invitrogen (n.º de cat. K4600-01) siguiendo el protocolo del fabricante para dar TOPO-sKDR. El vector TOPO permite una clonación fácil de productos de PCR debido a la proyección de A en productos de PCR tratados con Taq (enzima de PCR).

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

Para clonar los dominios transmembrana y citoplasmáticos de KDR, se usaron un oligómero en 5' (TCC CCC GGG ATC ATT ATT CTA GTA GGC ACG GCG GTG) y un oligómero en 3' (C AGG AGG AGA GCT CAG TGT GGT C). Se

diseñaron para amplificar los dominios transmembrana y citoplasmáticos completos de KDR (~1,8 kpb) a partir de la

biblioteca de ADNc listo para 5' RACE (descrita anteriormente) usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con polimerasa pfu. Las condiciones de la reacción de PCR y el programa fueron exactamente los mismos tal como se describió anteriormente para s-KDR. Al igual que con la secuencia de s-KDR, se purificó el producto de PCR usando extracción con fenol y cloroformo, se trató con polimerasa Taq y se clonó en el vector TOPO II de Invitrogen para dar TOPO-CYTO.

#### Clonación de KDR de longitud completa en el vector pcDNA6

Para crear el receptor de longitud completa, se amplificaron el dominio extracelular y el dominio citoplasmático (con dominio transmembrana) mediante PCR por separado de TOPO-sKDR y TOPO-CYTO, respectivamente, y se ligaron posteriormente para crear el receptor de longitud completa. Se usaron un oligómero con un sitio NotI en el extremo 5' del dominio extracelular (A TAA GAA TGC GGC CGC AGG ATG GAG AGC AAG GTG CTG CTG G) y un oligómero complementario al extremo 3' del dominio extracelular (TTC CAA GTT CGT CTT TTC CTG GGC ACC) para amplificar mediante PCR el dominio extracelular de TOPO-sKDR. De manera similar, se usaron el oligómero en 5' (ATC ATT ATT CTA GTA GGC ACG GCG GTG) y el oligómero en 3', con un sitio NotI (A TAA GAA TGC GGC CGC AAC AGG AGG AGA GCT CAG TGT GGT C), para amplificar mediante PCR el dominio citoplasmático de KDR (con dominio transmembrana) de TOPO-CYTO. Se digirieron ambos productos de PCR con NotI y se ligaron entre sí para crear el receptor de longitud completa. Se purificó el ADNc que codifica para el receptor de longitud completa sobre un gel de agarosa y se ligó en el sitio NotI del vector pcDNA6/V5-HisC. Se realizaron la purificación de ADN y la ligación tal como se describió anteriormente para psKDR. Se usó la reacción de ligación para transformar un cultivo de bacterias DH5α y se analizaron varios clones individuales para determinar la presencia y orientación de inserto mediante análisis de restricción de plásmido purificado a partir de cada clon con enzima EcoRI.

#### Cultivo celular

Se obtuvieron células 293H de Invitrogen (n.º de cat. 11631) y se hicieron crecer como cultivos en monocapa en sus medios recomendados más pen/estrep 1 ml/l (Invitrogen, n.º de cat. 15140-148). Se hicieron crecer todas las células en presencia de antibiótico para cultivo diario pero se dividieron en medios libres de antibiótico durante 16-20 horas antes de la transfección.

#### Preparación de ADN para transfección

Se cultivaron en línea bacterias *E. coli*. DH5α que contenían pf-KDR en placas de LB con ampicilina 50 µg/ml (agar LB de US biologicals, n.º de cat. 75851 y ampicilina de Sigma, n.º de cat. A2804) a partir de una disolución madre en glicerol y se dejaron las placas en una incubadora a 37°C para crecer durante la noche. A la mañana siguiente, se escogió una colonia individual de la placa y se hizo crecer en 3 ml de medios de LB/ampicilina (LB de US biologicals, n.º de cat. US75852) a 37°C. Tras 8 horas, se transfirieron 100 µl de cultivo bacteriano del tubo de 3 ml a 250 ml de medios de LB/ampicilina para la incubación durante la noche a 37°C. Se hicieron crecer bacterias con agitación circular en un frasco de 500 ml (Beckman, n.º de cat. 355605) a 220 rpm en una incubadora-agitadora Lab-Line. Al día siguiente, se procesó el cultivo bacteriano usando un kit Maxi-prep (QIAGEN, n.º de cat. 12163). Generalmente, se obtuvo aproximadamente 1 mg de ADN de plásmido (según se cuantifica mediante absorbancia a 260 nm) a partir de 250 ml de cultivo bacteriano.

Transfección de células 293H en placas de 96 pocillos

Se realizó la transfección tal como se recomienda en el protocolo de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, n.º de cat. 11668-019) usando una placa de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina. Se usaron 320 ng de ADN de KDR (pc-DNA6-fKDR)/por pocillo en 0,1 ml para transfecciones en placas de 96 pocillos. Se realizó la transfección en medios que contenían suero, se retiró la mezcla de reactivos de transfección de las células tras 6-8 horas y se sustituyó por medio que contenía suero regular. Se realizó la transfección en placas de 96 pocillos negras/transparentes (Becton Dickinson, n.º de cat. 354640). Las células en una mitad de la placa (48 pocillos) se transfectaron de manera simulada (sin ADN) y las células en la otra mitad de la placa se transfectaron con ADNc de KDR. Las células eran confluentes al 80-90% en el momento de la transfección y completamente confluentes al día siguiente, en el momento del ensayo, de lo contrario se abortó el ensayo.

Preparación de medios M199

15 Se prepararon medios M199 tal como se describió anteriormente.

Preparación de avidina-Sepharose de liberación suave SoftLink

20 Se preparó avidina-Sepharose de liberación suave SoftLink centrifugando la Sepharose obtenida de Promega (n.º de cat. V2011) a 12.000 rpm durante 2 minutos, lavando dos veces con agua helada (centrifugando entre lavados) y resuspendiendo el sedimento en agua helada para preparar una suspensión al 50% en ddH<sub>2</sub>O. Se preparó una suspensión al 50% de manera reciente de avidina-Sepharose para cada experimento.

Preparación de disolución de péptido/Neutravidin-HRP

25 Se usaron péptidos biotinilados P6-XB, P5-XB, P12-XB, P13-XB y el péptido control biotinilado, P1-XB (preparados tal como se describió anteriormente) para preparar disoluciones madre 250 µM en DMSO al 50% y se preparó una disolución madre 33 µM de Neutravidin-HRP disolviendo 2 mg de Neutravidin-HRP (Pierce, n.º de cat. 31001) en 1 ml de ddH<sub>2</sub>O. Se almacenaron las disoluciones madre de péptido a -20°C, mientras que se almacenó la disolución madre de Neutravidin-HRP a -80°C. En la tabla 1 se muestran las estructuras de los péptidos biotinilados. Para preparar complejos péptido/Neutravidin-HRP, se añadieron 10 µl de disolución madre de péptido biotinilado 250 µM y 10 µl de Neutravidin-HRP 33 µM a 1 ml de medio M199. Se incubó esta mezcla en un dispositivo rotatorio a 4°C durante 60 minutos, seguido por adición de 50 µl de avidina-Sepharose de liberación suave (suspensión al 50% en ddH<sub>2</sub>O) para eliminar los péptidos en exceso y otra incubación durante 30 minutos en un dispositivo rotatorio a 4°C. Finalmente, se sedimentó la avidina-Sepharose de liberación suave mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se usó el sobrenadante resultante para los ensayos. Se prepararon complejos péptido/Neutravidin-HRP de manera reciente para cada experimento.

Preparación de diluciones de péptido/Neutravidin-HRP para el ensayo

40 Para experimentos de unión de saturación, se añadieron 120 µl, 60 µl, 20 µl, 10 µl, 8 µl, 6 µl, 4 µl y 1 µl de complejo péptido/Neutravidin-HRP a alícuotas de 1,2 ml de medio M199 para crear diluciones con concentraciones finales de complejo 33,33 nM, 16,65 nM, 5,55 nM, 2,78 nM, 1,67 nM, 1,11 nM y 0,28 nM, respectivamente.

Preparación de disolución de bloqueo para células 293H transfectadas

45 Se preparó disolución de bloqueo añadiendo 20 ml de medio M199 a 10 mg de Neutravidin sin marcar liofilizada (Pierce, n.º de cat. 31000). Se usó una disolución de bloqueo recién preparada para cada experimento.

Ensayo para detectar la unión de péptido/Neutravidin-HRP

55 24 h tras la transfección, se lavó cada pocillo de las células 293H 1 vez con 100 µl de medio M199 y se incubó con 80 µl de disolución de bloqueo a 37°C. Tras una hora, se lavaron las células 2 veces con 100 µl de medios M199 y se incubaron con 70 µl de diluciones de péptido/Neutravidin-HRP de P1-XB, P6-XB, P5-XB, P12-XB y P13-XB durante dos horas y media a temperatura ambiente. Se añadió cada dilución a tres pocillos separados de células transfectadas de manera simulada así como células 293H transfectadas con KDR (se usaron dos placas para cada experimento de unión de saturación). Tras la incubación a temperatura ambiente, se transfirieron las placas a 4°C durante otra incubación de media hora. Posteriormente, se lavaron las células cinco veces con medios M199 helados y 1 vez con PBS helado (en ese orden). Tras el lavado final, se añadieron 100 µl de disolución de TMB helada (KPL, n.º de cat. 50-76-00) a cada pocillo y se incubó cada placa durante 30 minutos a 37°C en una incubadora de aire. Finalmente, se detuvo la reacción de la enzima HRP añadiendo 50 µl de ácido fosfórico 1 N a cada pocillo, y se cuantificó la unión midiendo la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas (BioRad, modelo 3550).

Unión de péptido/Neutravidin-HRP a células transfectadas con KDR

En este ensayo, se prepararon complejos de péptidos P6-XB, P5-XB, P12-XB, P13-XB, y el péptido control, P1-XB, con Neutravidin-HRP tal como se describió anteriormente y se sometieron a prueba para determinar su capacidad para unirse a células 293H que se transfectaron de manera transitoria con KDR. Durante la preparación del complejo péptido/Neutravidin, se usó un exceso de 7,5 veces de péptidos biotinilados con respecto a Neutravidin-HRP para garantizar que se ocupaban los cuatro sitios de unión a biotina en Neutravidin. Tras la formación del complejo, se eliminó el exceso de péptidos biotinilados libres usando avidina-Sepharose de liberación suave para evitar cualquier competencia entre péptidos biotinilados libres y péptidos biotinilados complejados con Neutravidin-HRP.

Se realizó el experimento a varias concentraciones diferentes de péptido/Neutravidin-HRP, desde 0,28 nM hasta 33,33 nM, para generar curvas de unión de saturación para P5-XB y P6-XB (figura 8A) y de 0,28 a 5,55 nM para generar una curva de unión de saturación para P12-XB y P13-XB (figura 8B). Para trazar la curva de unión de saturación, se restó la unión de fondo a células transfectadas de manera simulada de la unión a células transfectadas con KDR para cada complejo péptido/Neutravidin-HRP distinto a cada concentración sometida a prueba. Por tanto, la absorbancia en el eje Y de la figura 8 es la absorbancia diferencial (KDR menos simulado) y no la absorbancia absoluta. El análisis de los datos de unión de saturación en la figura 8 usando el software Graph Pad Prism (versión 3.0) proporcionó una Kd de 10,00 nM (+/- 2,36) para los complejos de péptido P6-XB tetramérico, de 14,87 nM (+/- 5,07) para el P5-XB tetramérico, de 4,03 nM (+/- 0,86) para el P12-XB tetramérico y de 1,81 nM (+/- 0,27) para el P13-XB tetramérico. Tal como se esperaba, estas constantes de unión son inferiores a las medidas mediante FP frente al constructo KDRFc para los péptidos monodentados relacionados P6 (69 nM) y P5 (280 nM) (con fluoresceína) pero similares para el péptido monodentado P12 (3 nM). Tal como se esperaba, no se observó ninguna saturación de la unión para el complejo péptido control P1-X-B/Neutravidin-HRP. Tal como se muestra en la figura 9, se trazó la unión de complejos péptido/Neutravidin-HRP a una única concentración (5,55 nM) para demostrar que puede usarse un experimento a una única concentración para diferenciar entre un péptido de unión a KDR (P6-XB, P5-XB y P12-XB) y un péptido no de unión (P1-XB).

#### EXPERIMENTO B

Se diseñó el experimento B para estudiar el efecto de un espaciador (X) entre la secuencia de unión a KDR (P6 y P5) y biotina. En este experimento, se sometieron a prueba P6 y P5 biotinilados (con y sin espaciador X, preparados tal como se expuso anteriormente), y se usó P1 (con y sin espaciador, preparado tal como se expuso anteriormente) como control negativo.

Se realizó este experimento tal como se expuso en el experimento A descrito anteriormente, excepto porque sólo se realizó a una única concentración de 2,78 nM. Resulta evidente a partir de los resultados, mostrados en la figura 10, que se requiere un espaciador (X) para la unión eficaz de P6 y P5. El espaciador (X) entre la secuencia de unión y biotina puede ser útil para potenciar la unión a la molécula diana mediante múltiples mecanismos. En primer lugar, puede ayudar a reducir el impedimento estérico entre cuatro péptidos biotinilados tras su unión a una única molécula de avidina. En segundo lugar, puede proporcionar longitud adicional necesaria para alcanzar múltiples sitios de unión disponibles en una única célula.

#### EXPERIMENTO C

El experimento C examinó el efecto del suero sobre la unión de P6-XB, P5-XB, P12-XB y P13-XB. En este experimento, se sometieron a prueba complejos péptido biotinilado/avidina-HRP de P6-XB, P5-XB, P12-XB y P13-XB en medios M199 (tal como se describió anteriormente en el experimento A) con y sin suero de rata al 40%. Se realizó este experimento tal como se describió para el experimento A, excepto porque sólo se realizó a una única concentración de 6,66 nM para P6-XB y P5-XB, 3,33 nM para P12-XB y 2,22 nM para P13XB.

Los resultados, mostrados en la figura 11, indican que la unión de P6-XB, P5-XB y P13-XB no se vio significativamente afectada por el suero de rata al 40% mientras que la unión de P12-XB disminuyó en más del 50% en presencia de suero de rata al 40%. Se observó una disminución de más del 80% en la unión de P12-C marcado con Tc (P12 con quelato de Tc), preparado mediante el método descrito en el ejemplo 5 anterior, en presencia de suero de rata al 40% (datos mostrados en la figura 25). Dado que el efecto del suero sobre la unión de P12-C marcado con Tc se imita en el ensayo de avidina-HRP dado a conocer en el presente documento, este ensayo puede usarse para evaluar rápidamente el efecto del suero sobre la unión de péptido(s) a KDR.

#### EXPERIMENTO D

Se diseñó el experimento D para evaluar la unión de complejos tetraméricos de polipéptidos P6-XB y P5-XB de unión a KDR y complejo VEGF/KDR, particularmente en los que los constructos incluían al menos dos polipéptidos de unión a KDR. Se prepararon los péptidos de unión a KDR y el péptido de unión control (P1-XB) tal como se describió anteriormente. Se realizó este experimento usando el protocolo expuesto para el experimento A, excepto porque los procedimientos expuestos a continuación fueron únicos para este experimento.

#### Preparación de disoluciones de péptido/Neutravidin-HRP

Se prepararon disoluciones madre 250  $\mu\text{M}$  de péptidos biotinilados P1-X-B, P6-XB y P5-XB en DMSO al 50% y se preparó una disolución madre 33  $\mu\text{M}$  de Neutravidin-HRP disolviendo 2 mg de Neutravidin-HRP (Pierce, n.º de cat. 31001) en 1 ml de ddH<sub>2</sub>O. Se almacenaron las disoluciones madre de péptido a -20°C, mientras que se almacenó la disolución madre de Neutravidin-HRP a -80°C. Para preparar complejos péptido/Neutravidin-HRP, se añadió un total de 5,36  $\mu\text{l}$  de disolución madre de péptido biotinilado 250  $\mu\text{M}$  (o una mezcla de disoluciones de péptido, para dar cuatro veces más moléculas de péptido que moléculas de avidina-HRP) y 10  $\mu\text{l}$  de Neutravidin-HRP 33  $\mu\text{M}$  a 1 ml de medio M199. Se incubó esta mezcla en un dispositivo rotatorio a 4°C durante 60 minutos, seguido por la adición de 50  $\mu\text{l}$  de avidina-Sepharose de liberación suave (suspensión al 50% en ddH<sub>2</sub>O) para eliminar los péptidos en exceso y otra incubación durante 30 minutos en un dispositivo rotatorio a 4°C. Finalmente, se sedimentó la avidina-Sepharose de liberación suave mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se usó el sobrenadante resultante para los ensayos. Se prepararon complejos péptido/Neutravidin-HRP de manera reciente para cada experimento.

#### 15 Ensayo para detectar la unión de péptido/Neutravidin-HRP

Se usó el procedimiento descrito anteriormente para detectar la unión del péptido/Neutravidin-HRP. Los resultados de este experimento establecen que P6-XB y P5-XB se unen a KDR en de manera multimérica, y actúan conjuntamente entre sí para unirse a KDR en células 293H transfectadas.

P1-XB es un derivado biotinilado de P1, un péptido control que no se une a KDR. Tal como se esperaba, un complejo tetramérico de P1-XB con avidina-HRP no mostró unión potenciada a células transfectadas con KDR. Tal como se muestra en la figura 12, los complejos tetraméricos de P6-XB o P5-XB se unieron a células transfectadas con KDR de manera significativamente mejor que a células transfectadas de manera simulada. Sin embargo, los tetrámeros de P6-XB se unieron mucho mejor que los tetrámeros de P5-X. Cuando se añadió P1-XB a la mezcla de péptidos usada para formar los complejos tetraméricos, la unión a las células transfectadas con KDR disminuyó. Se calcularon las razones de unión específica de tetrámeros con respecto a monómero, dímero y trímero dividiendo la unión específica (obtenida restando la unión a células transfectadas de manera simulada de células transfectadas con KDR) de tetrámero, trímero y dímero por la de monómero. Los resultados sugieren que hay un efecto de acción conjunta de la multimerización de P5-XB, P6-XB y P13-XB sobre la unión a células transfectadas con KDR.

Tabla 2. Unión potenciada de constructos homomultiméricos con respecto a monómeros

Número de ref.	Tetrámero	Trímero	Dímero
P5-XB	45,4	5	4,3
P6-XB*	38,6	7,1	2,7
P12-XB	1	1,1	1,1
P13-XB	16	5,7	2,3

\*La unión de péptido monomérico a 3,33 nM fue de cero y por tanto las razones se calcularon usando la unión a 5,55 nM.

Una mezcla del 25% de P1-XB con el 75% de P5-XB no se unió de manera significativa con respecto al fondo a células transfectadas con KDR, lo que indica que la unión multivalente es crítica para que el complejo P5-XB/avidina-HRP permanezca unido a KDR a lo largo de todo el ensayo. Este fenómeno también resultó cierto para P6-XB, en el que la sustitución del 50% del péptido por P1-XB en el complejo tetramérico eliminó casi toda la unión a KDR en las células transfectadas.

Una mezcla de péptidos compuesta por el 50% de P1-XB con el 25% de P6-XB y el 25% de P5-XB se unió bastante bien a células transfectadas con KDR con respecto a células transfectadas de manera simulada, lo que indica que hay una gran ventaja en seleccionar como diana dos sitios de unión en la misma molécula diana. Además, se observó que todos los complejos tetraméricos que contenían diferentes razones de P6-XB y P5-XB (3:1, 2:2 y 1:3) se unían mucho mejor a células transfectadas con KDR que los tetrámeros puros de cualquiera de los péptidos, de acuerdo con la idea de que seleccionar como diana dos sitios distintos en una única molécula diana es superior a la unión multimérica a un único sitio. Esto puede deberse a que la unión multimérica a una única diana requiere que la entidad de unión multimérica abarque dos o más moléculas diana separadas que estén lo bastante cerca entre sí como para que se una a ellas simultáneamente, mientras que un elemento de unión multimérico que puede unirse a dos o más sitios distintos en una única molécula diana no depende de encontrar otra molécula diana dentro de su alcance para lograr la unión multimérica. Se calcularon las razones de unión específica de heterotetrámero, heterotr trímero y heterodímero con respecto a monómero dividiendo la unión específica (obtenida restando la unión a células transfectadas de manera simulada de células transfectadas con KDR) de tetrámero, trímero y dímero por la de monómero. El monómero, que se usó para calcular las razones, para cada conjunto de heterómeros se registra al final de cada lista de heterómeros en la tabla y se le asigna la razón de 1.

Tabla 3. Unión potenciada de constructos heteromultiméricos con respecto a monómeros

Mezcla de péptidos en la que (1X, 2X, 3X) es la ocupación de los cuatro sitios de avidina	Razón de heterómero/monómero	Conc. (nM)
P6-XB(1X)+P5-XB(3X)	529	3,33
P6-XB(2X)+ P5-XB (2X)	777	3,33
P6-XB (3X)+ P5-XB (1X)	633	3,33
P1-XB(1X)+ P6-XB (1X)+ P5-XB (2X)	213	3,33
P1-XB (1X)+ P6-XB (2X)+ P5-XB (1X)	242	3,33
P1-XB (2X)+ P6-XB (1X)+ P5-XB (1X)	109	3,33
P5-XB (1X)+ P1-XB (3X)	1	3,33
P6-XB (1X)+P12-XB(3X)	46	2,78
P6-XB (2X)+ P12-XB (2X)	42	2,78
P6-XB (3X)+ P12-XB (1X)	43	2,78
P1-XB (1X)+ P6-XB (1X)+ P12-XB (2X)	47	2,78
P1-XB (1X)+ P6-XB (2X)+ P12-XB (1X)	52	2,78
P1-XB (2X)+ P6-XB (1X)+ P12-XB (1X)	40	2,78
P1-XB (3X)+ P6-XB (1X)*	1	5,55
P1-XB (1X)+P13-XB(1X)+ P12-XB (2X)	5	2,78
P1-XB (1X)+ P13-XB (2X)+ P12-XB (1X)	7	2,78
P1-XB (2X)+ P13-XB (1X)+ P12-XB (1X)	2	2,78
P13-XB (1X)+ P1-XB (3X)	1	2,78
P1-XB (1X)+ P6-XB (1X)+ P13-XB (2X)	83	2,78
P1-XB (1X)+ P6-XB (2X)+ P13-XB (1X)	31	2,78
P1-XB (2X)+ P6-XB (1X)+ P13-XB (1X)	31	2,78
P1-XB (3X)+ P6-XB (1X)*	1	5,55

Las razones de unión potenciada de los homodímeros oscilan entre aproximadamente 1-4 veces tal como se observa en la tabla 2, mientras que la unión de los heterodímeros oscila entre 2-110 veces, lo que demuestra el efecto sinérgico sobre la fuerza de unión de las secuencias complementarias (tabla 3).

- 5
- EXPERIMENTO E**
- Se diseñó el experimento E para confirmar que P6-XB y P5-XB se unen a sitios de unión distintos en KDR. Si los péptidos se unen al mismo sitio en KDR, probablemente competirán entre sí por unirse a KDR, mientras que si los péptidos se unen a sitios diferentes, no debe haber competencia entre los péptidos por unirse a KDR. Se realizó este experimento usando una única concentración de disolución de P5-XB/avidina-HRP (3,33 nM) en cada pocillo y añadiendo una concentración variable (0-2,5 µM) de P1-XB, P5-XB y P6-XB, ninguno de los cuales estaba complejado con avidina.
- 10
- 15 Resulta evidente a partir de los resultados, mostrados en la figura 13, que P5-XB compite con la disolución de P5-XB/avidina-HRP por unirse a células transfectadas con KDR mientras que P1-XB y P6-XB no compiten con la disolución de P5-XB/avidina-HRP por unirse a células transfectadas con KDR. Por tanto, P5-XB y P6-XB se unen a sitios distintos y complementarios en KDR.

20 **Ejemplo 7**

Preparación de constructos heterodiméricos

- 25 Para obtener un elemento de unión de péptido con afinidad superior al receptor KDR, se unieron entre sí dos péptidos lineales (P9, P10) para formar un heterodímero. Tal como se determina mediante ensayos de competencia por VEGF, estos dos péptidos se unen a sitios diferentes en KDR. Por tanto, es posible que ambos péptidos en el heterodímero puedan unirse a una única molécula de proteína al mismo tiempo y, como resultado, se unan con una afinidad global superior por el receptor. Se sintetizaron dos formas del heterodímero en un esfuerzo por determinar la orientación óptima para este evento de unión bidentado. Se unieron los péptidos entre sí o bien en una orientación

cola con cola a través de sus residuos de lisina C-terminales o bien en una orientación cabeza con cabeza a través de sus grupos amino N-terminales.

Se sintetizaron los péptidos usando protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc convencionales. Para añadir separación entre los dos péptidos en el dímero, se modificó cada monómero de péptido individual o bien en la lisina C-terminal (para preparar el dímero cola con cola) o bien en el amino N-terminal (para preparar el dímero cabeza con cabeza) con un ligador de aminoácidos basado en PEG monodispersado (Fmoc-NH-PEG<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>H). Tras la desprotección del grupo Fmoc de cada ligador de PEG, se marcó el péptido P9 con ácido levulínico (CH<sub>3</sub>(C=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H) y se marcó el péptido P10 con ácido Boc-amino-oxiacético. Tras la desprotección, escisión y purificación, se ligaron los dos péptidos entre sí en una razón 1:1 en tampón desnaturante (urea 8 M, acetato de sodio 0,1 M, pH 4,6) para formar un enlace oxima (-CH=N-O-) entre los dos péptidos diferentes. Usando los dos conjuntos diferentes de monómeros, se formaron los heterodímeros cola con cola y cabeza con cabeza en disolución y se purificaron hasta la homogeneidad mediante protocolos de fase inversa convencionales. Se encuentra una descripción más detallada de esta química de unión en K. Rose, *et al.* JACS, 1999, 121: 7034-7038.

#### Ensayo para determinar la afinidad de unión de constructos heterodiméricos

Para someter a ensayo la afinidad de unión mejorada con respecto a su péptido monomérico, se sometió cada heterodímero a ensayo para determinar la unión usando un instrumento de resonancia de plasmón superficial (Biacore 3000). Se reticuló receptor KDR soluble con la superficie de dextrano de un chip sensor CM5 mediante el procedimiento de acoplamiento de amina convencional. Se diluyó una disolución 0,5 mg/ml 1:40 con acetato 50 mM, pH 6,0 para inmovilizar un R<sub>L</sub> total de 12721. Se realizaron experimentos en tampón PBST (fosfato 5,5 mM, pH 7,65, NaCl 0,15 M, Tween-20 al 0,1% (v/v)). Se diluyeron disoluciones de péptido cuantificadas mediante el coeficiente de extinción para producir disoluciones 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,3 nM. Para la asociación, se inyectaron péptidos a 20 µl/min durante 2 minutos usando el programa Kinject. Tras una disociación de 3 minutos, se separó cualquier péptido restante de la superficie de KDR con una inyección de tipo quickinject de NaOH 50 mM, NaCl 1 M durante 15 s a 75 µl/min. Se ejecutaron P9 y P10 monoméricos como patrones. Se analizaron los sensogramas mediante análisis global usando el software BIAevaluation 3.1.

Los dímeros de péptidos investigados en este estudio mediante análisis BIAcore se unen a KDR con afinidad significativamente superior a la de cualquiera de los monómeros constituyentes. Mediante diseño, se espera que la interacción de un péptido dimérico con KDR avance a través de dos etapas cinéticas. Con un análisis más detallado puede ser posible diseccionar con precisión las constantes de velocidad individuales para estas etapas. Sin embargo, se calculó una K<sub>D</sub> aparente para la interacción de dímero usando la constante de velocidad que describe el encuentro inicial (k<sub>a,1</sub>) y la constante de disociación predominante (k<sub>d,2</sub>). A partir de este análisis, la K<sub>D</sub> aparente del dímero cabeza con cabeza era de 2,2 nM y la del dímero cola con cola era de 11 nM (tabla 4). Estas estimaciones representan un aumento de la afinidad con respecto a los monómeros individuales de más de 60 veces para la comparación de la K<sub>D</sub> de P9 con el dímero cola con cola (732 nM/11,1 nM) y más de 560 veces para la K<sub>D</sub> de P10 con el dímero cabeza con cabeza (1260 nM/2,24 nM).

Tabla 4. Resumen de parámetros cinéticos

Péptido	k <sub>a,1</sub> (1/Ms)	k <sub>d,1</sub> (1/s)	K <sub>D,1</sub> (nM)	Chi2*
P9	4,53 x 10 <sup>3</sup>	3,32 x 10 <sup>-3</sup>	732	0,67
P10	3,60 x 10 <sup>5</sup>	4,5 x 10 <sup>-1</sup>	1260	1,2
Dímero cabeza con cabeza	1,11 x 10 <sup>5</sup>	2,49 x 10 <sup>-4</sup>	2,24	1,25
Dímero cola con cola	1,15 x 10 <sup>5</sup>	1,28 x 10 <sup>-3</sup>	11,1	2,33

#### **Ejemplo 8**

Se usaron los siguientes métodos para la preparación de péptidos individuales y constructos peptídicos diméricos descritos en los ejemplos (8-12).

#### Síntesis de péptidos automatizada

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

Escisión, desprotección de la cadena lateral y asilamiento de péptidos en bruto

Se logró la escisión de los péptidos de la resina y la desprotección de la cadena lateral usando reactivo B durante 4,5 h a temperatura ambiental. Se recogieron las disoluciones de escisión y se lavaron las resinas con una alícuota  
5 adicional de reactivo B. Se concentraron las disoluciones combinadas hasta sequedad. Se añadió dietil éter al residuo con formación de remolinos o agitación para precipitar los péptidos. Se decantó la fase líquida y se recogió el sólido. Se repitió este procedimiento 2-3 veces para eliminar impurezas y componentes del cóctel de escisión residuales.

10 Ciclación de péptidos de di-cisteína

Se ciclaron péptidos que contenían di-cisteína lineales, precipitados en éter, en bruto, mediante disolución en agua, mezclas de acetonitrilo acuoso (TFA al 0,1%), DMSO acuoso o DMSO al 100% y ajuste del pH de la disolución a 7,5  
15 - 8,5 mediante adición de disolución de amoniaco acuoso, de carbonato de amonio acuoso, de bicarbonato de amonio acuoso o DIEA. Se agitó la mezcla en aire durante 16-48 h, se acidificó a pH 2 con ácido trifluoroacético acuoso y después se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa empleando un gradiente de acetonitrilo en agua. Se combinaron las fracciones que contenían el material deseado y se aislaron los péptidos purificados mediante liofilización.

20 Preparación de péptidos que contienen ligadores

En un experimento típico, se trataron 400 mg del péptido unido a resina que portaba una lisina protegida con ivDde con hidrazina al 10% en DMF (2 x 20 ml). Se lavó la resina con DMF (2 x 20 ml) y DCM (1 x 20 ml). Se resuspendió  
25 la resina en DMF (10 ml) y se trató con ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (0,4 mmol), HOBt (0,4 mmol), DIC (0,4 mmol) y DIEA (0,8 mmol) con mezclado durante 4 h. Tras la reacción, se lavó la resina con DMF (2 x 10 ml) y con DCM (1 x 10 ml). Después se trató la resina con piperidina al 20% en DMF (2 x 15 ml) durante 10 min cada vez. Se lavó la resina y se repitió una vez más el acoplamiento con ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico y la eliminación del grupo protector Fmoc.

Se lavó el péptido con un grupo amino libre, unido a resina, resultante y se secó y después se trató con reactivo B  
30 (20 ml) durante 4 h. Se filtró la mezcla y se concentró el filtrado hasta sequedad. Se agitó el residuo con éter para producir un sólido, que se lavó con éter y se secó. Se disolvió el sólido en DMSO anhidro y se ajustó el pH a 7,5 con DIEA. Se agitó la mezcla durante 16 h para realizar la ciclación de disulfuro y se monitorizó la reacción mediante HPLC analítica. Tras completarse la ciclación, se diluyó la mezcla de reacción con acetonitrilo al 25% en agua y se aplicó directamente a una columna C-18 de fase inversa. Se realizó la purificación usando un gradiente de  
35 acetonitrilo en agua (conteniendo ambos TFA al 0,1%). Se analizaron las fracciones mediante HPLC y se combinaron aquellas que contenían el producto puro y se liofilizaron para proporcionar el péptido requerido.

40 Preparación de péptidos biotinilados que contienen ligadores

En un experimento típico, se trataron 400 mg del péptido unido a resina que portaba una lisina protegida con ivDde con hidrazina al 10% en DMF (2 x 20 ml). Se lavó la resina con DMF (2 x 20 ml) y DCM (1 x 20 ml). Se resuspendió  
45 la resina en DMF (10 ml) y se trató con ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (0,4 mmol), HOBt (0,4 mmol), DIC (0,4 mmol) y DIEA (0,8 mmol) con mezclado durante 4 h. Tras la reacción, se lavó la resina con DMF (2 x 10 ml) y con DCM (1x 10 ml). Después se trató la resina con piperidina al 20% en DMF (2 x 15 ml) durante 10 min cada vez. Se lavó la resina y se repitió una vez más el acoplamiento con ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico y la eliminación del grupo protector Fmoc.

Se trató el péptido con un grupo amino libre, unido a resina, resultante con una disolución de éster NHS de biotina  
50 (0,4 mmol, 5 eq.) y DIEA (0,4 mmol, 5 eq.) en DMF durante 2 h. Se lavó la resina y se secó tal como se describió anteriormente y después se trató con reactivo B (20 ml) durante 4 h. Se filtró la mezcla y se concentró el filtrado hasta sequedad. Se agitó el residuo con éter para producir un sólido que se recogió, se lavó con éter y se secó. Se disolvió el sólido en DMSO anhidro y se ajustó el pH a 7,5 con DIEA. Se agitó la mezcla durante 4-6 h para realizar la ciclación de disulfuro que se monitorizó mediante HPLC. Tras completarse la ciclación, se diluyó la mezcla de  
55 reacción con acetonitrilo al 25% en agua y se aplicó directamente a una columna C-18 de fase inversa. Se realizó la purificación usando un gradiente de acetonitrilo en agua (conteniendo ambos TFA al 0,1%). Se analizaron las fracciones mediante HPLC y se recogieron aquellas que contenían el producto puro y se liofilizaron para proporcionar el péptido biotinilado requerido.

60 Preparación de péptidos conjugados con DOTA para el marcaje con isótopos de gadolinio o indio seleccionados

En un experimento típico, se trataron 400 mg del péptido unido a resina que portaba un resto de lisina protegido con N<sup>e</sup>-ivDde con hidrazina al 10% en DMF (2 x 20 ml). Se lavó la resina con DMF (2 x 20 ml) y DCM (1 x 20 ml). Se resuspendió  
65 la resina en DMF (10 ml) y se trató con ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (0,4 mmol), HOBt (0,4 mmol), DIC (0,4 mmol), DIEA (0,8 mmol) con mezclado durante 4 h. Tras la reacción, se lavó la resina con DMF (2 x 10 ml) y con DCM (1x 10 ml). Después se trató la resina con piperidina al 20% en DMF (2 x 15 ml) durante 10 min

- 5 cada vez. Se lavó la resina y se repitió una vez el acoplamiento con ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico y la eliminación del grupo protector Fmoc. Se resuspendió el péptido con un grupo amino libre, unido a resina, resultante en DMF (10 ml) y se trató con una disolución de éster 1,4,7-tris-t-butílico del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (éster tris-t-butílico de DOTA, 0,4 mmol, 5 eq.), HOBt (0,4 mmol), DIC (0,4 mmol) y DIEA (0,8 mmol) en DMF (10 ml) con mezclado durante 4 h. Tras completarse la reacción, se lavó la resina con DMF (2 x 10 ml) y con DCM (1 x 10 ml) y se trató con reactivo B (20 ml) durante 4 h. Se filtró la mezcla y se concentró el filtrado hasta sequedad. Se agitó el residuo en éter para producir un sólido que se recogió, se lavó con éter y se secó. Se disolvió el sólido en DMSO anhidro y se ajustó el pH a 7,5 con DIEA. Se agitó la mezcla durante 16 h para realizar la ciclación de disulfuro, que se monitorizó mediante HPLC. Tras completarse la ciclación, se diluyó la mezcla con acetonitrilo al 25% en agua y se aplicó directamente a una columna de HPLC C-18 de fase inversa. Se realizó la purificación usando un gradiente de acetonitrilo en agua (conteniendo ambos TFA al 0,1%). Se analizaron las fracciones mediante HPLC y se combinaron aquellas que contenían el producto puro y se liofilizaron para proporcionar el péptido biotinilado requerido.
- 10
- 15 Se prepararon los siguientes péptidos monoméricos de la tabla 5 mediante los métodos anteriores.

Tabla 5. Secuencia o estructura de péptidos monoméricos y derivados peptídicos

Número de ref.	Estructura o secuencia	SEQ ID NO
P12-XB-K	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK(biotinaJJ-K)-NH <sub>2</sub>	--
P12-XDT-K	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTJK(DOTAJJ-K)-NH <sub>2</sub>	--
P12-X	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTJK(JJ)-NH <sub>2</sub>	--
P12-E	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[K(ivDde)]-NH <sub>2</sub>	--
P6-F-XB-K	Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(biotina-JJK)-NH <sub>2</sub>	--
P6-F-X	Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(JJ)-NH <sub>2</sub>	--
P13-EB-K	Ac-AQDWYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK(ivDde)K(biotina-JJ)-NH <sub>2</sub>	--
P13-X	Ac-AQDWYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK(J)-NH <sub>2</sub>	--
P13-K-E	Ac-AQDWYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK(ivDde)	--
P6-X	Ac-GDSRVC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(JJ)-NH <sub>2</sub>	--
P12-A	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[(PnAO6-C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K]-NH <sub>2</sub>	--
P12-XDT-K-E	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[(DOTA-JJK(iv-Dde)]-NH <sub>2</sub>	--
P6-F	Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	--
P12-O	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[K(BOA)]-NH <sub>2</sub>	--
P13-A-E	Ac-AQDWYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK[PnAO6 C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K(iv-Dde)]-NH <sub>2</sub>	--
P23	AQDWYDEILJGRGGRGGRGGK	22
P23-K-E	Ac-AQDWYDEILJGRGGRGGRGGK[K(ivDde)]-NH <sub>2</sub>	
P24	APGTWCDYDWEYCWLGTFGGGK	23
P24-A	Ac-APGTWC*DYDWEYC*WLGTFGGGK[(6PnAO-C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K]-NH <sub>2</sub>	
P25	GVDFRCEWSDWGEVGCSPDYGGGK	24
P25-X	Ac-GVDFRC*EWSWGEVGC*RSPDYGGGK(JJ)-NH <sub>2</sub>	
P12-BK	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK(biotina-K)-NH <sub>2</sub>	-
P12-JE	JJAGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK(iv-Dde)-NH <sub>2</sub>	-
P6-J-F	JJVC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGG-NH <sub>2</sub>	--
P12-JA	[-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(PnA06-Glut)-NH <sub>2</sub> ]-	--
P12-S	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[K(SATA)]-NH <sub>2</sub>	--
P12-SX-K	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[SATA-JJ-K]-NH <sub>2</sub>	--
P12-NE	H <sub>2</sub> N-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[K(iv-Dde)]-NH <sub>2</sub>	--

P12-Q	Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WFLGTGGGK{biotina-JJK[NH <sub>2</sub> -Ser(GalNAc-alfa-D)-Gly-Ser(GalNAc3-alfa-D)]-NH <sub>2</sub> }	--
P6-F-Q	Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(NH <sub>2</sub> -Ser(GalNAc-alfa-D)-Gly-Ser(GalNAc-alfa-D)-NH <sub>2</sub> )	--
P26	GSPEMCMMPFLYPCNHHAPGGGK	25
P26-A	Ac-GSPEMC*MMFPFLYPC*NHHAPGGGK[(PnAO6)-C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K]-NH <sub>2</sub>	
P27	GSFFPCWRIDRFYCHANAPGGGK	26
P27-X	Ac-GSFFPC*WRIDRFYCHANAPGGGK(JJ)-NH <sub>2</sub>	
P27-A	Ac-GSFFPC*WRIDRFYCHANAPGGGK[(PnAO6)-C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K]-NH <sub>2</sub>	
P28	AQEWERYFVDGFWGSWFGIPHGGGK	27
P28-X	Ac-AQEWERYFVDGFWGSWFGIPHGGGK(JJ)-NH <sub>2</sub> .	
P29	GDYSECFEPDSFEVKCYDRDPGGGK	28
P29-X	Ac-GDYSEC*FEPEPDSFEVKCYDRDPGGGK(JJ)-NH <sub>2</sub>	

Tal como se usa en la tabla 5 anterior y en otras partes en el presente documento, la designación "C\*" se refiere a un residuo de cisteína que contribuye a un enlace disulfuro. En general, los péptidos monoméricos descritos en el presente documento se preparan como péptidos con disulfuro cíclicos y después se unen entre sí para formar dímeros. Por consiguiente, aunque un residuo de cisteína carezca de la designación "C\*", generalmente puede suponerse la presencia de un enlace disulfuro en la cisteína más próxima en el monómero. Los componentes monoméricos de los dímeros también contendrán generalmente tales enlaces disulfuro, independientemente de si los residuos de cisteína contienen la designación "C\*" o no. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que los dímeros y otros heteromultímeros de la presente invención pueden prepararse alternativamente realizando la ciclación de péptidos con di-cisteína tras unirse los monómeros para formar dímeros.

### Ejemplo 9

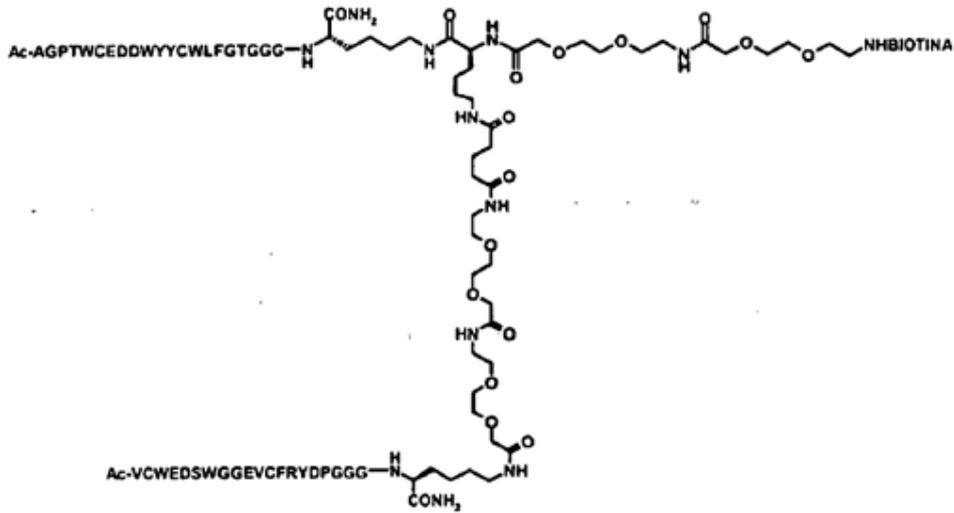
Se usaron los monómeros peptídicos purificados mencionados anteriormente en el ejemplo 8 en la preparación de diversos constructos homodiméricos y heterodiméricos.

#### Preparación de constructos que contienen homodímero

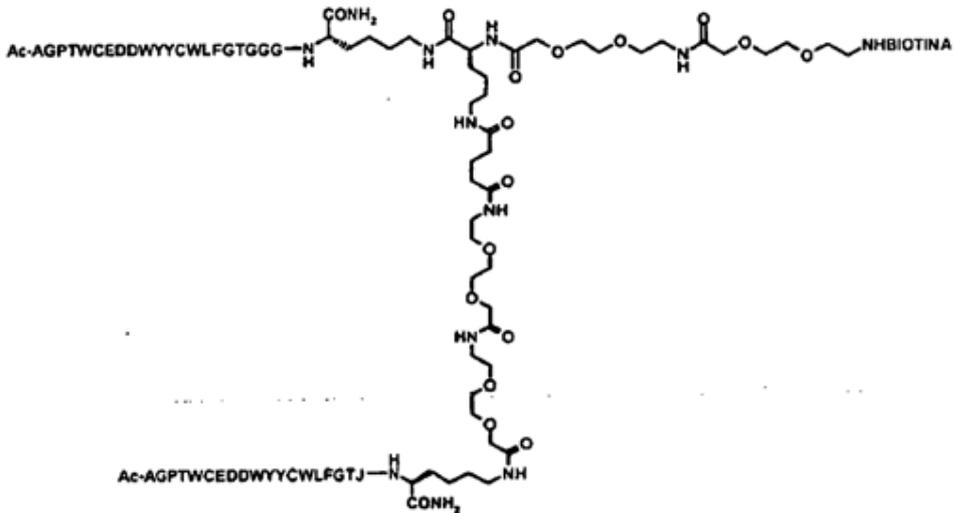
Para preparar compuestos homodiméricos, se disolvió la mitad del péptido necesario para preparar el dímero en DMF y se trató con 10 equivalentes de éster bis-N-hidroxisuccinimidílico del ácido glutárico. Se monitorizó el avance de la reacción mediante análisis por HPLC y espectroscopía de masas. Al completarse la reacción, se eliminaron los compuestos volátiles a vacío y se lavó el residuo con acetato de etilo para eliminar el éster bis-NHS sin reaccionar. Se secó el residuo, se redisolvió en DMF anhidra y se trató con la otra media porción del péptido en presencia de 2 equivalentes de DIEA. Se dejó avanzar la reacción durante 24 h. Se aplicó esta mezcla directamente a una columna de HPLC de fase inversa de YMC y se purificó mediante elución con un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (conteniendo ambos TFA al 0,1%).

#### Preparación de constructos que contienen heterodímero

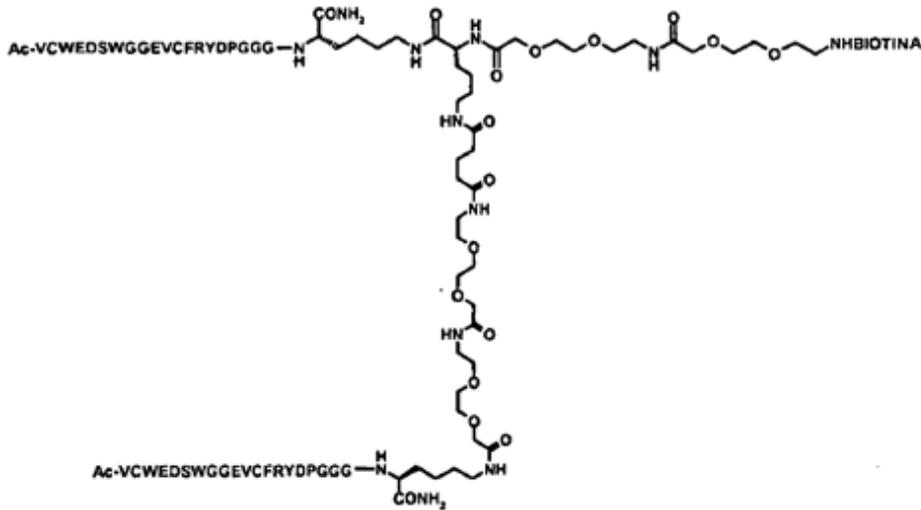
En el caso de heterodímeros, se hizo reaccionar uno de los monómeros ("A") con el éster bis-NHS del ácido glutárico y, tras eliminar por lavado el exceso de éster bis-NHS (tal como se describió para los compuestos homodiméricos), se añadió el segundo monómero ("B") en presencia de DIEA. Tras la reacción se purificó la mezcla mediante HPLC preparativa. Normalmente, a una disolución de éster bis N-hidroxisuccinimidílico del ácido glutárico (0,02 mmol, 10 equivalentes) en DMF (0,3 ml) se le añadió una disolución de péptido A y DIEA (2 eq.) en DMF (0,5 ml) y se agitó la mezcla durante 2 h. Se monitorizó el avance de la reacción mediante análisis por HPLC y espectroscopía de masas. Al completarse la reacción, se eliminaron los compuestos volátiles a vacío y se lavó el residuo con acetato de etilo (3 x 1,0 ml) para eliminar el éster bis-NHS sin reaccionar. Se secó el residuo, se redisolvió en DMF anhidra (0,5 ml) y se trató con una disolución de péptido B y DIEA (2 eq.) en DMF (0,5 ml) durante 24 h. Se diluyó la mezcla con agua (1:1, v/v) y se aplicó directamente a una columna C-18 de HPLC de fase inversa de YMC y se purificó mediante elución con un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (conteniendo ambos TFA al 0,1%). Se analizaron las fracciones mediante HPLC analítica y se combinaron aquellas que contenían el producto puro y se liofilizaron para obtener el dímero requerido. Se prepararon los siguientes dímeros mediante este método (estructura, nombre, número de referencia del compuesto):



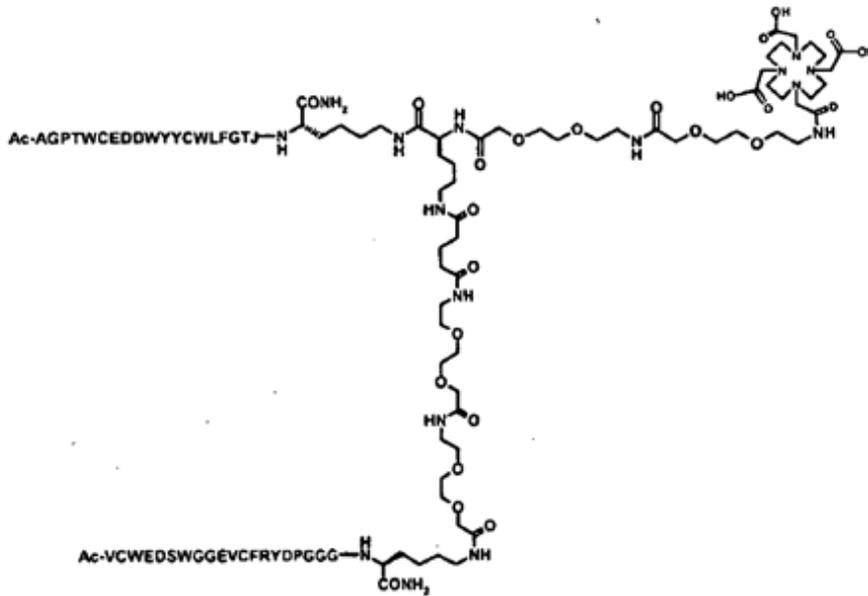
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[(biotina-JJK-(O=C)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)-JJ-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-(S)-CH((Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG)-NH)CONH<sub>2</sub>]-NH<sub>2</sub> : D1



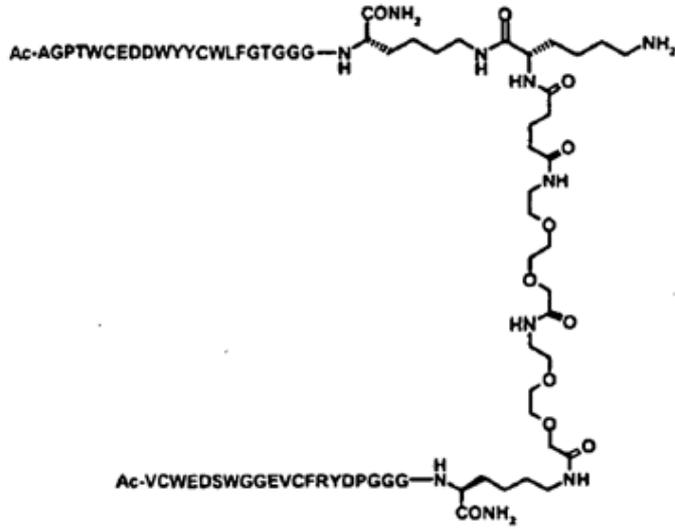
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[(biotina-JJK-(O=C)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)-JJ-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-(S)-CH((Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJ)-NH)CONH<sub>2</sub>]-NH<sub>2</sub> : D2



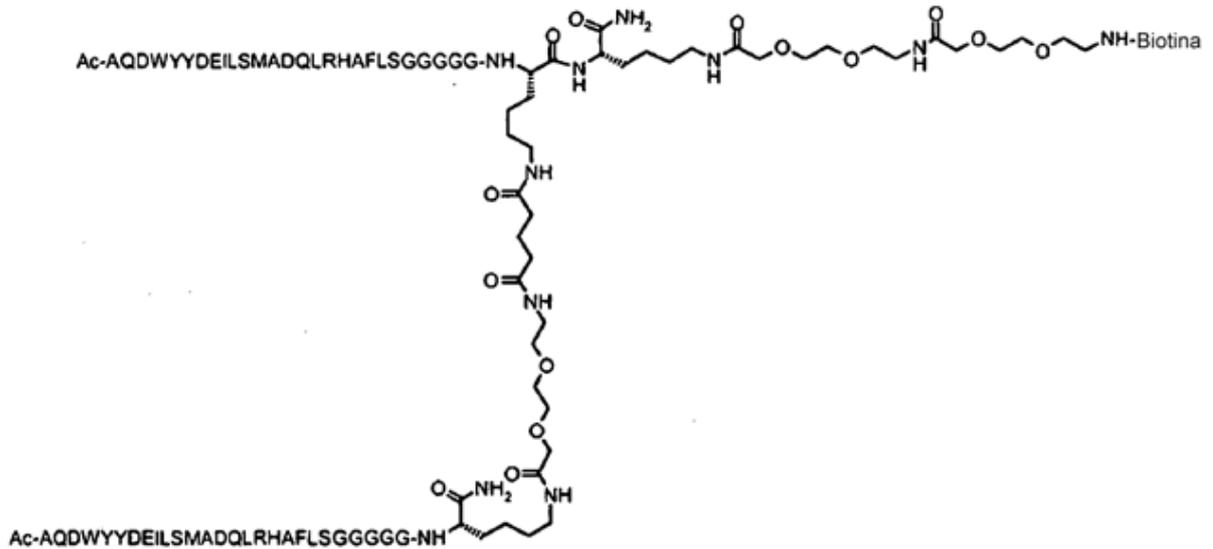
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK[(biotina-JJK-(O=C)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)-JJ-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-(S)-CH((Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG)-NH)CONH<sub>2</sub>]-NH<sub>2</sub> : D3



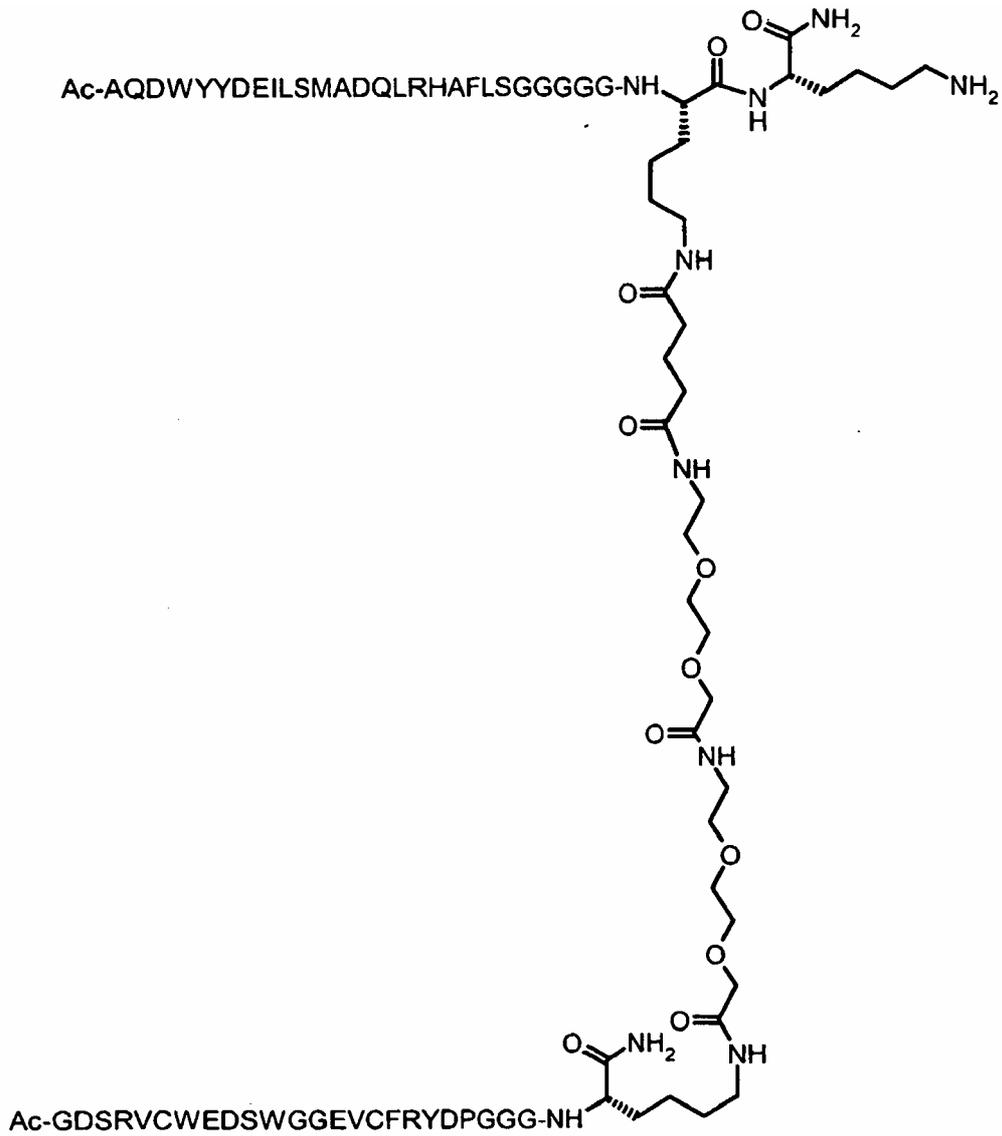
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK[DOTA-JJK-(O=C)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)-JJ-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-(S)-CH((Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG)-NH)CONH<sub>2</sub>]-NH<sub>2</sub> : D4



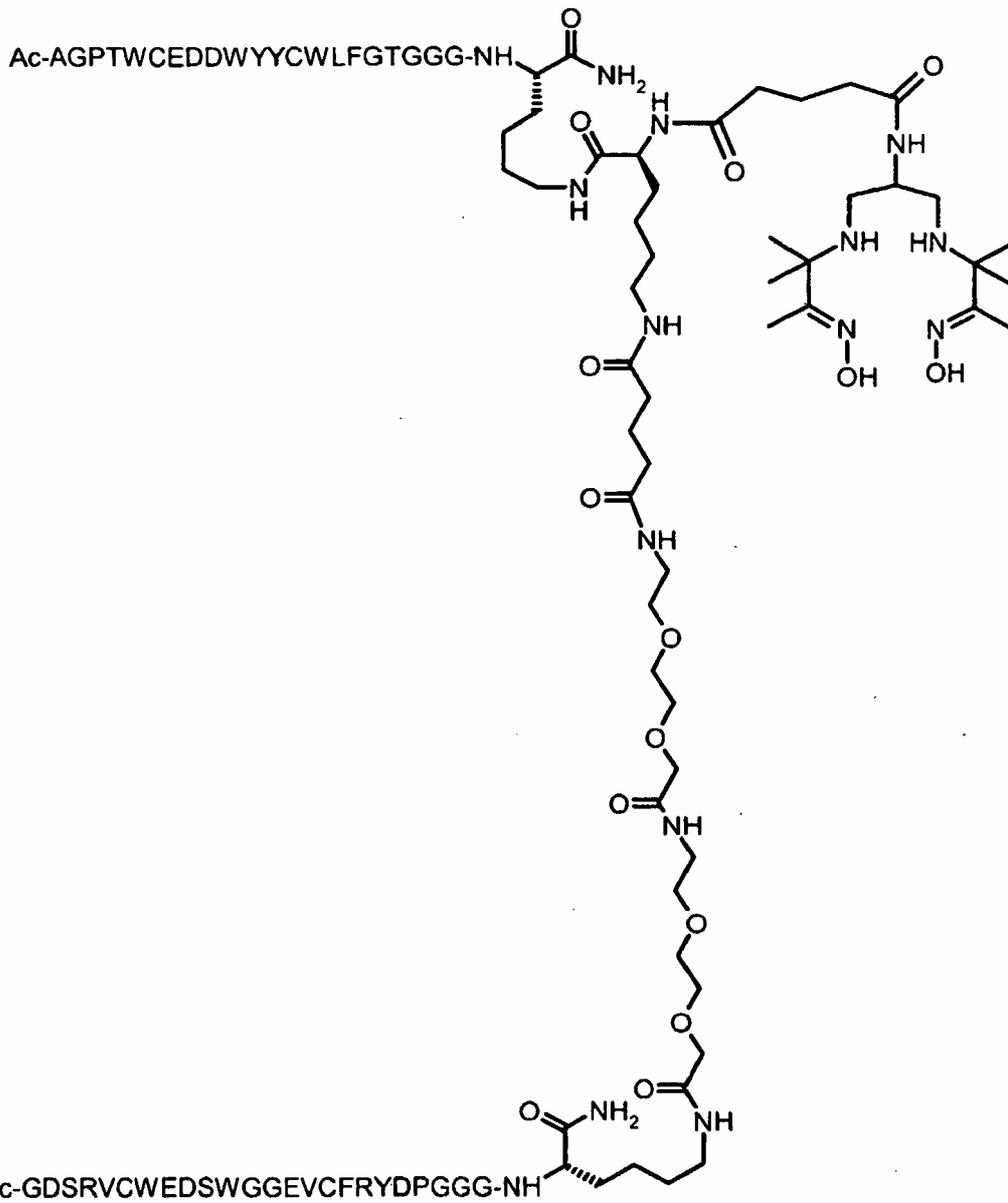
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)-K-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-(S)-CH((Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGG)-NH)CONH<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> : D5



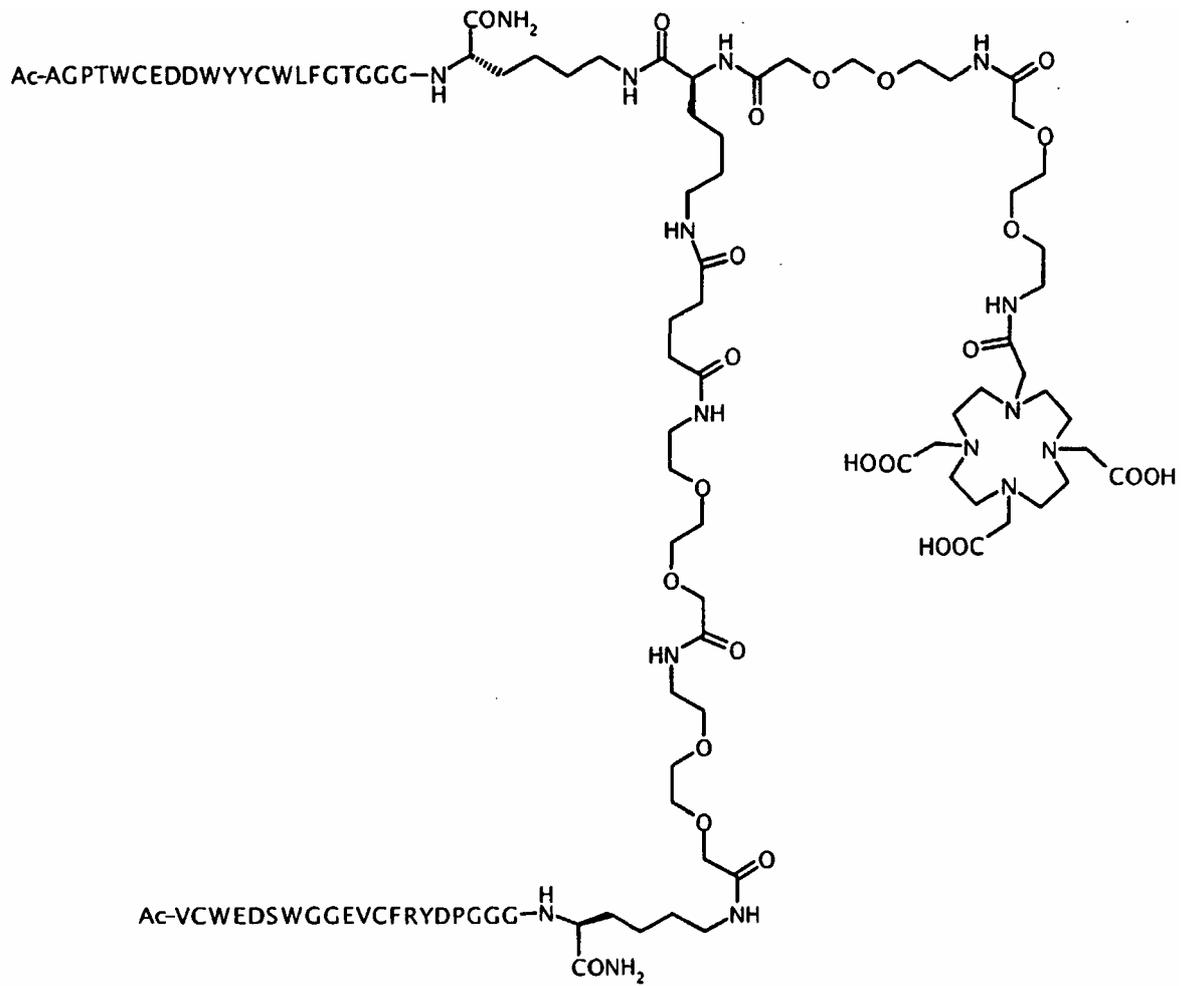
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFSLGGGGGK{Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFSLGGGGGK(J-Glut-)-NH<sub>2</sub>}K(biotina-JJ)-NH<sub>2</sub> : D8



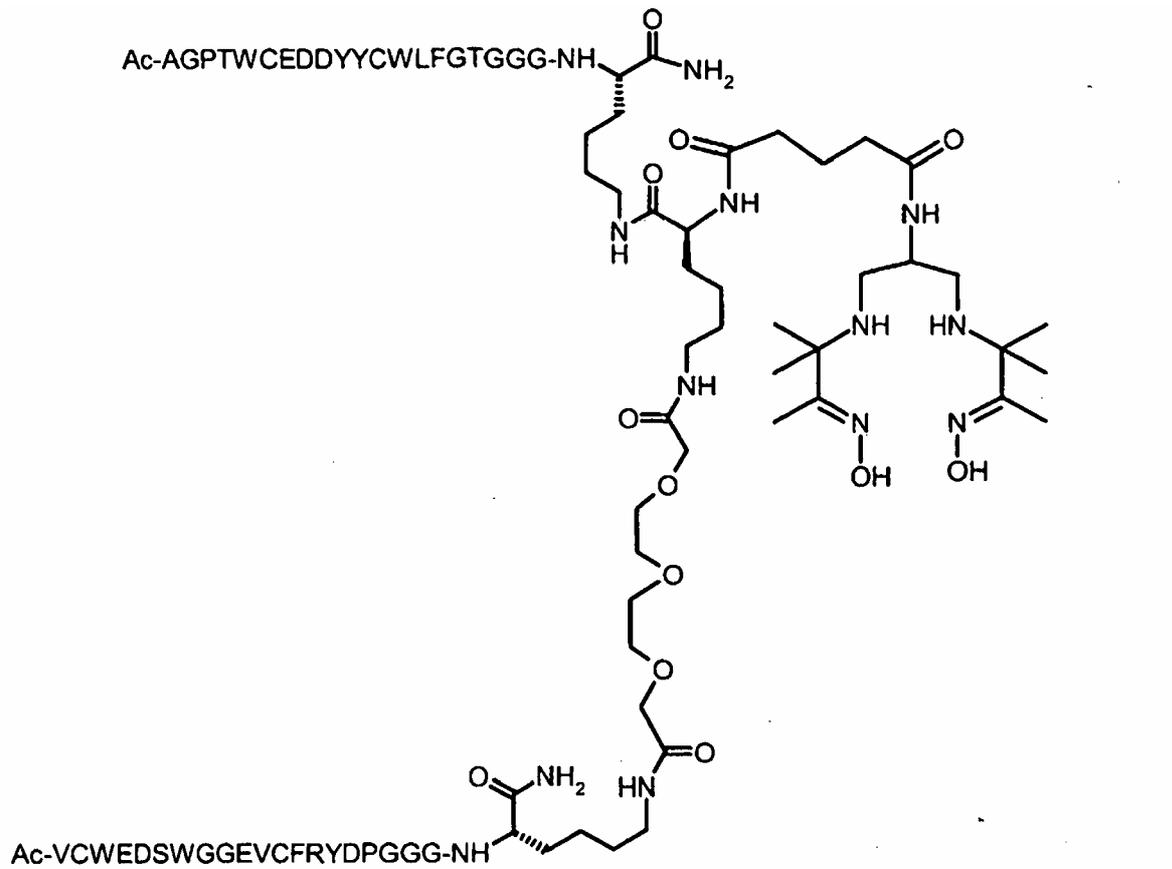
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFSLGGGGGK {[Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut-)]-NH<sub>2</sub>}K-NH<sub>2</sub>: D9



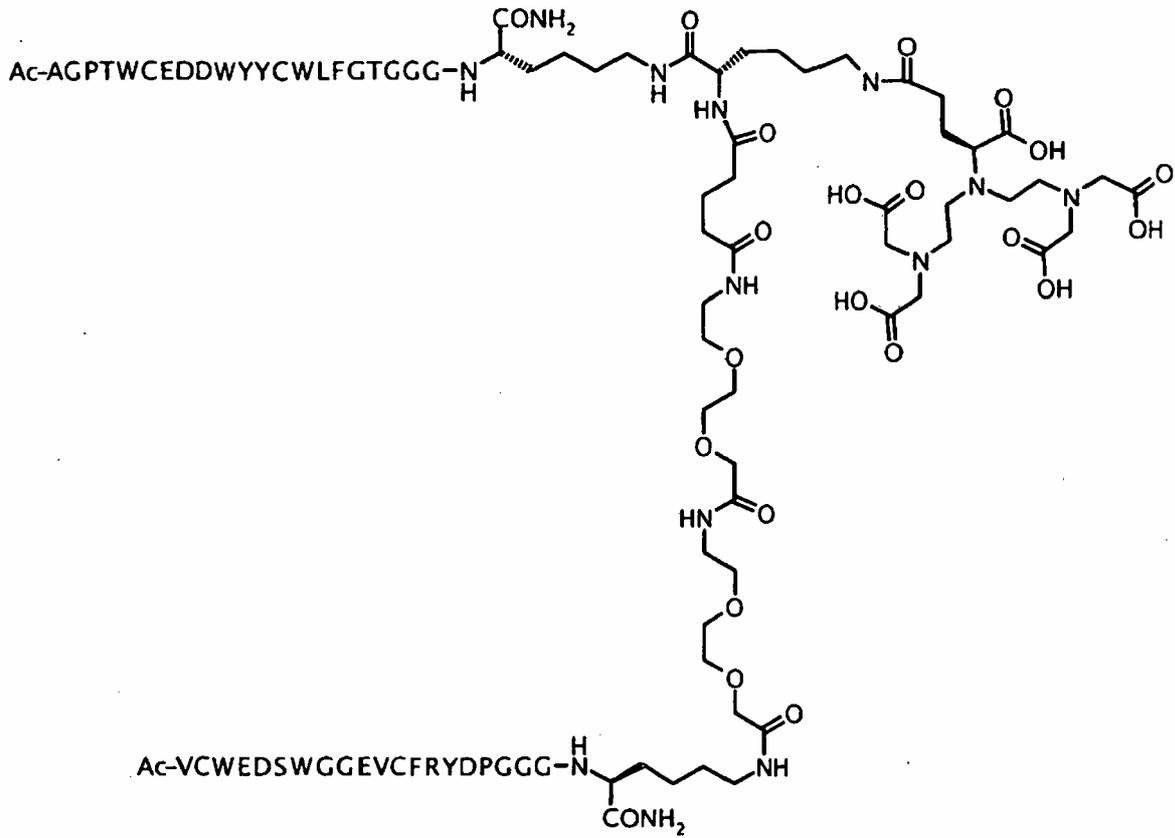
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {[Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-(S)-CH(PnAO6-Glut-NH)(C=O-)]-NH<sub>2</sub>}-NH<sub>2</sub> : D10



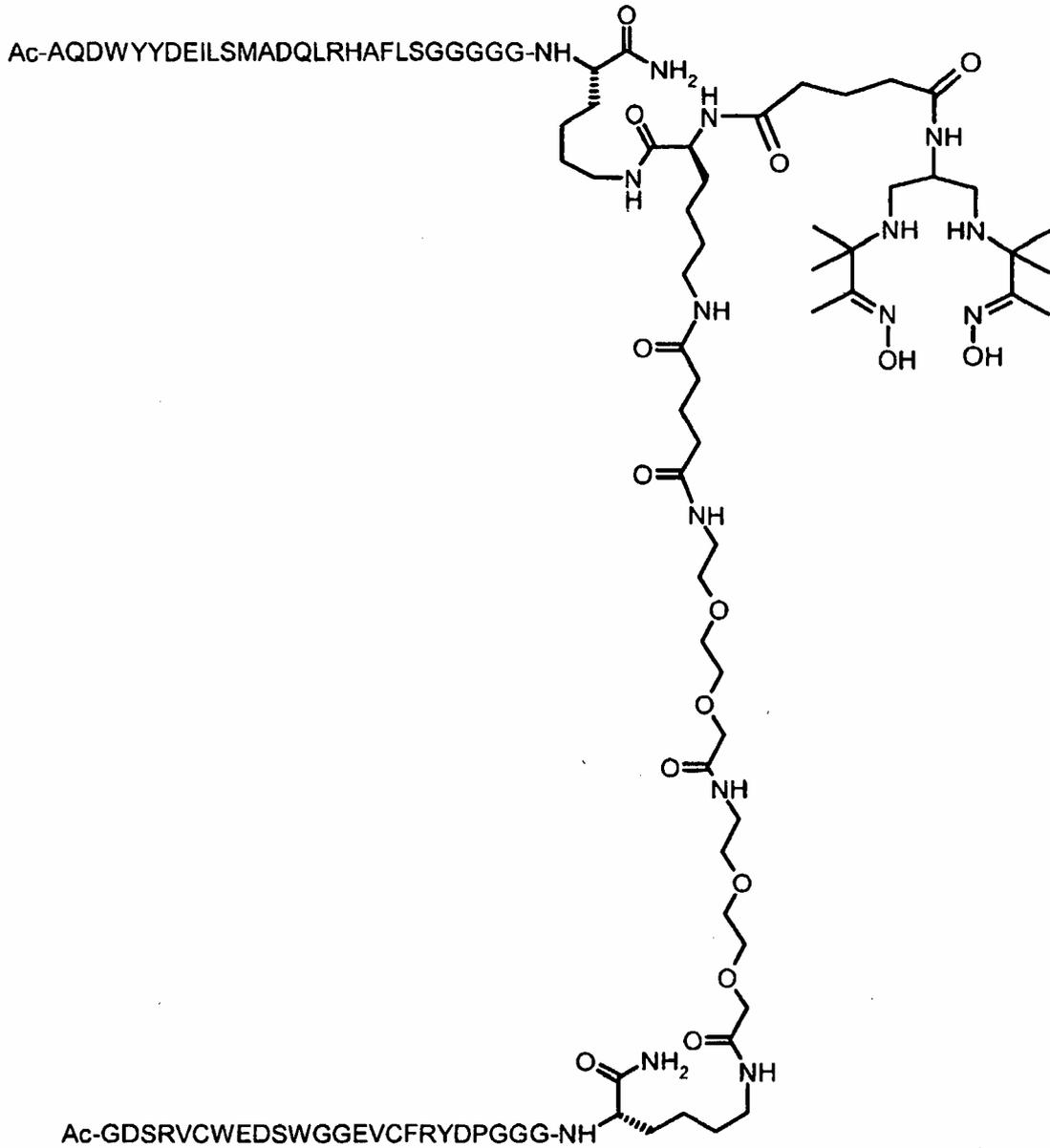
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{Ac-  
 VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK[JJ-Glut-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-(S)-CH(DOTA-JJ-NH-  
 )(C=O)-]-NH<sub>2</sub>}-NH<sub>2</sub> : D11



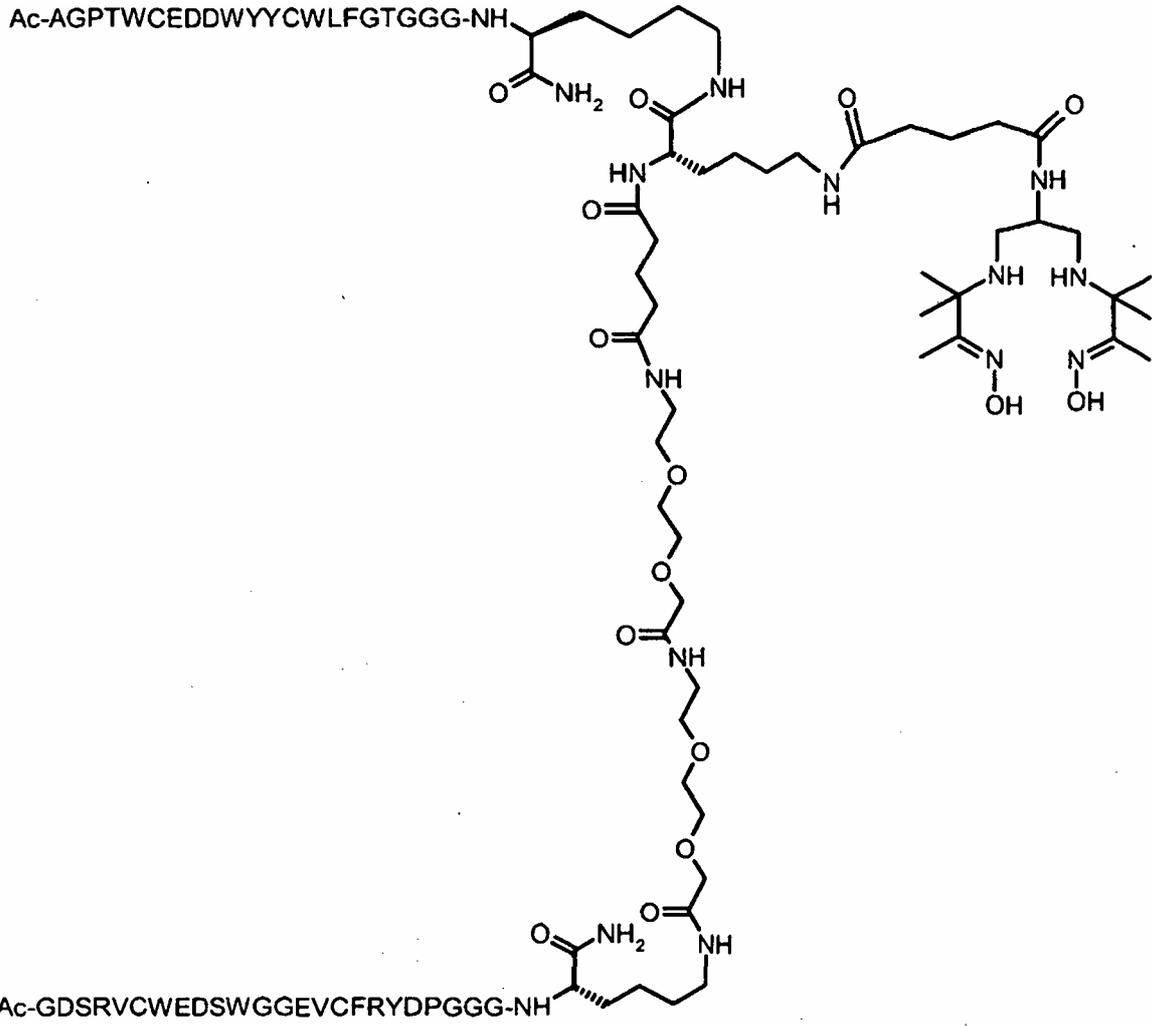
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {[PnA06-Glut-K(Ac-  
VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(-C(=O)CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C(=O)-)-NH<sub>2</sub>]}-NH<sub>2</sub>  
: D12



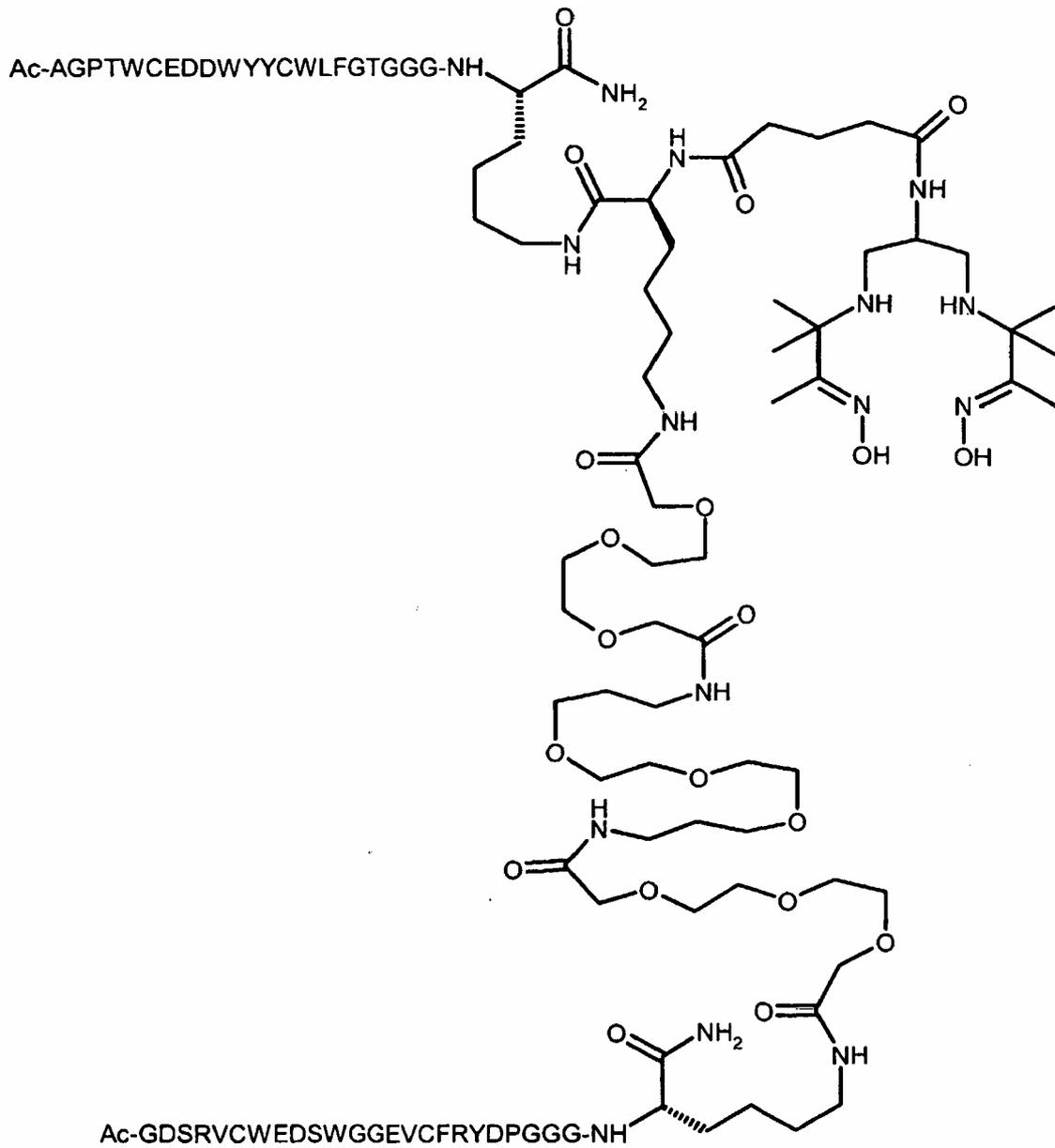
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK[JJ-Glut-K(BOA)]-NH<sub>2</sub>}-NH<sub>2</sub> : D13



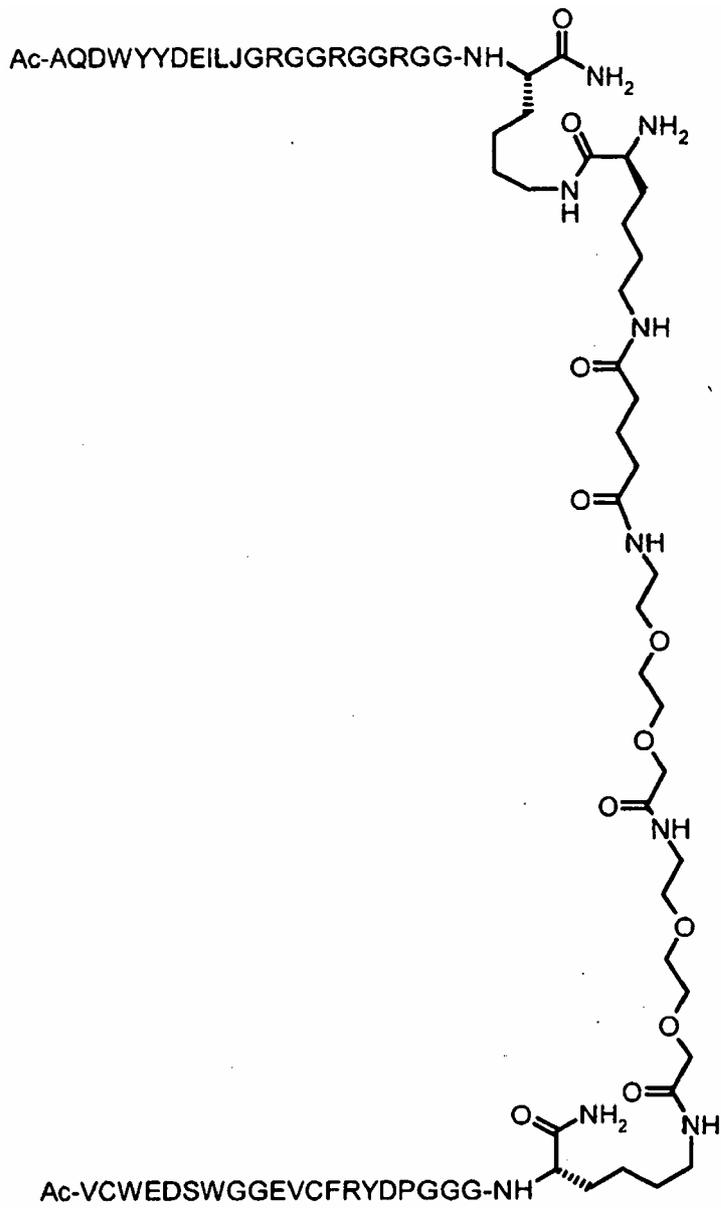
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK {PnAO6-Glut-K[Ac-GSDRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut)-NH<sub>2</sub>]}-NH<sub>2</sub> : D14



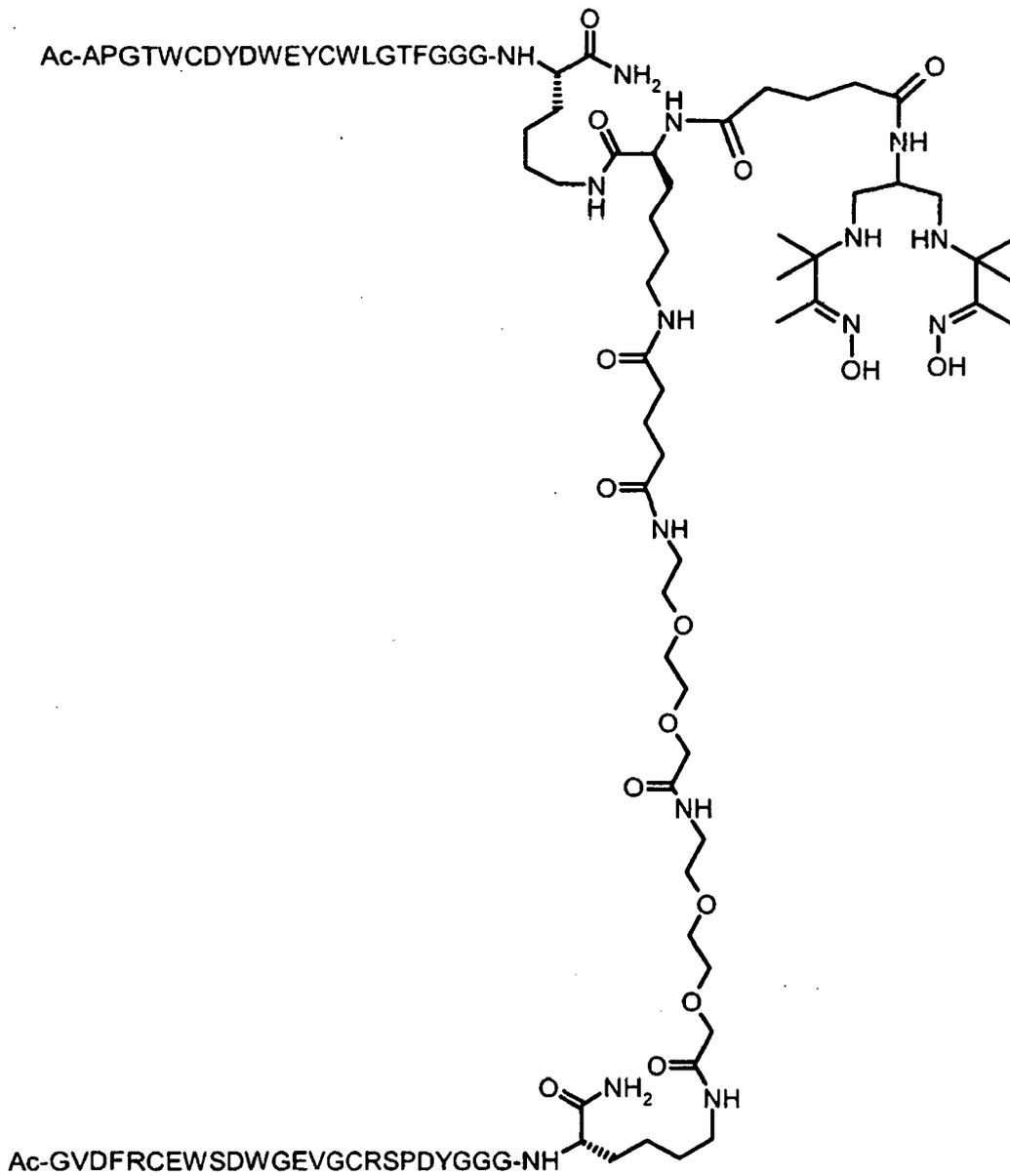
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{[[Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGKJJ-Glut]-NH<sub>2</sub>]-K(PnAO6-Glut)}-NH<sub>2</sub>: D15



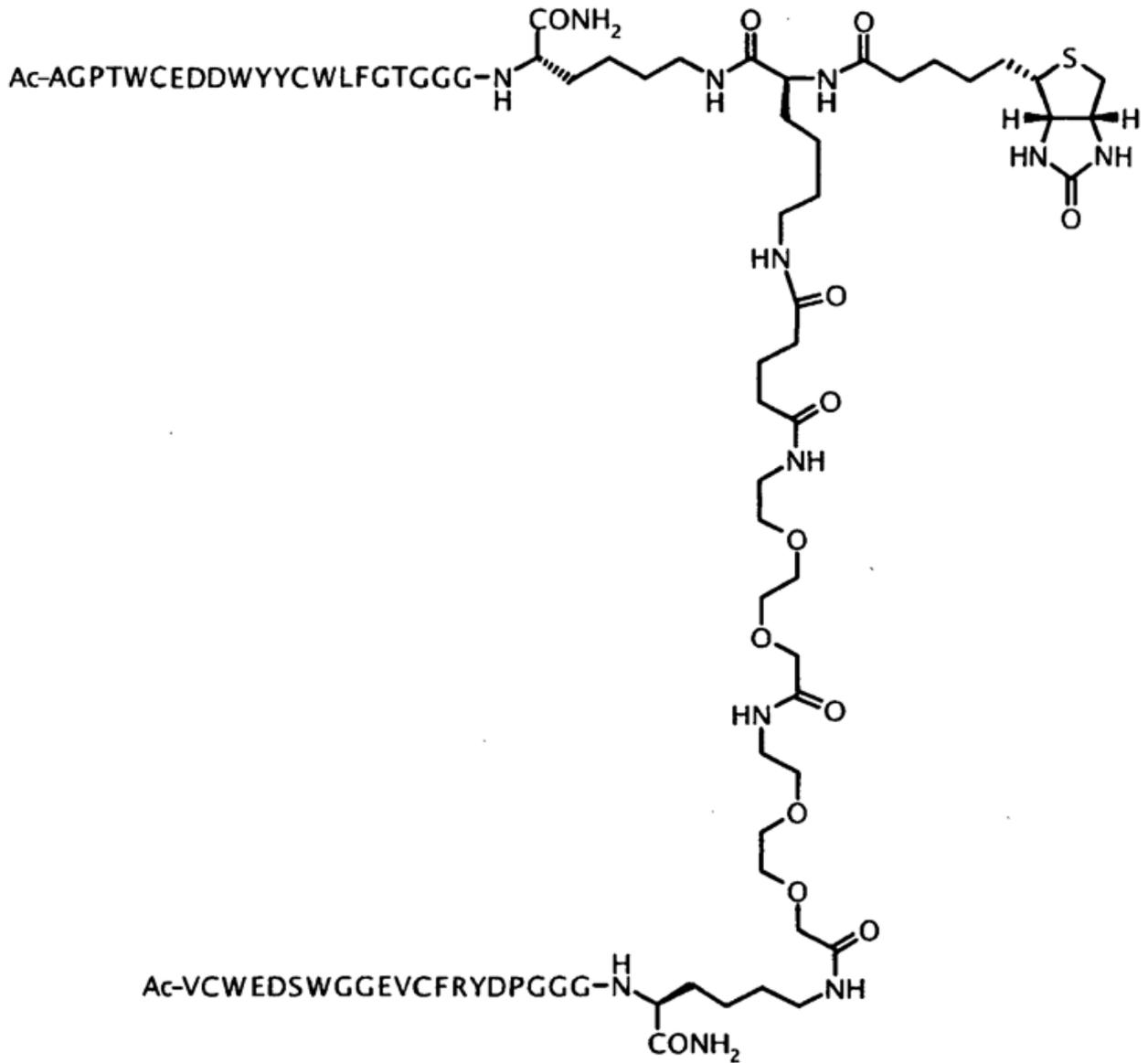
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {PnAO6-Glut-K[Ac-  
 GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK[-  
 C(=O)CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH  
 C(=O)CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-]-NH<sub>2</sub>]}-NH<sub>2</sub> : D16



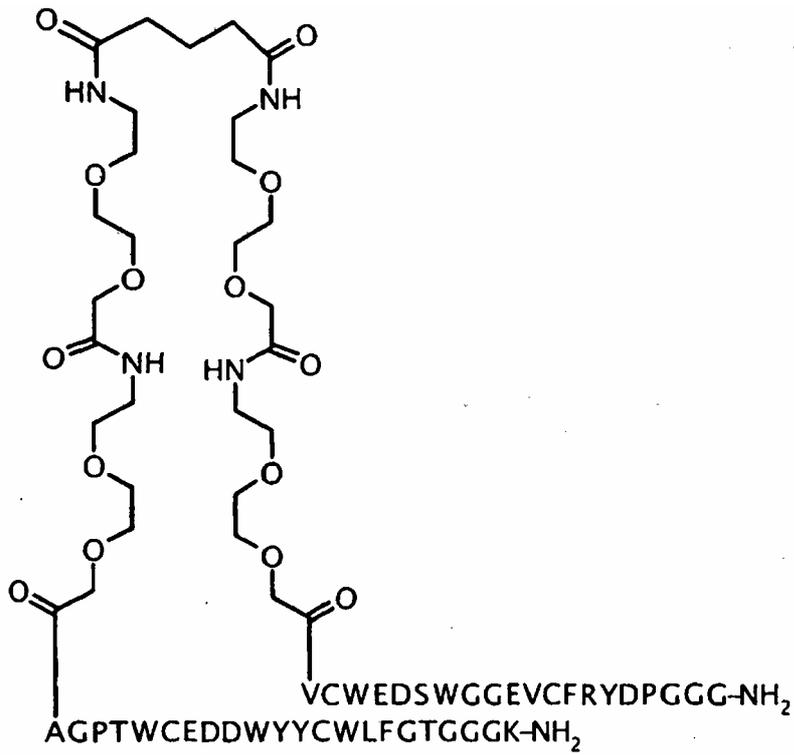
Ac-AQDWYYDEILJGRGGRGGRGGK {K[Ac-  
VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut)-NH<sub>2</sub>]}-NH<sub>2</sub> : D17



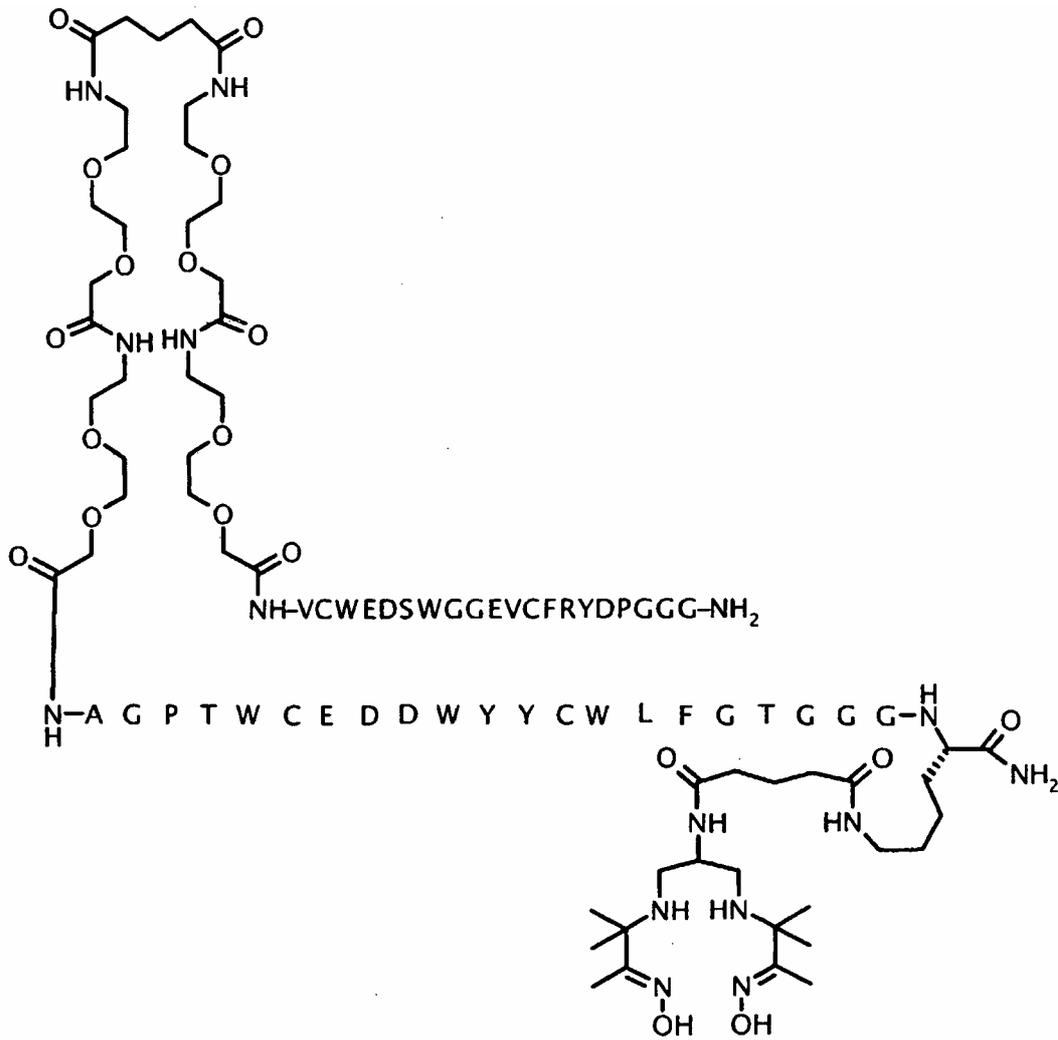
Ac-APGTWCDYDWEYCWLGTFFGGGK {PnAO6-Glut-K[Ac-GVDFRCEWSDWGEVGC RSPDYGGGK(JJ-Glut)-NH<sub>2</sub>]}-NH<sub>2</sub> : D18



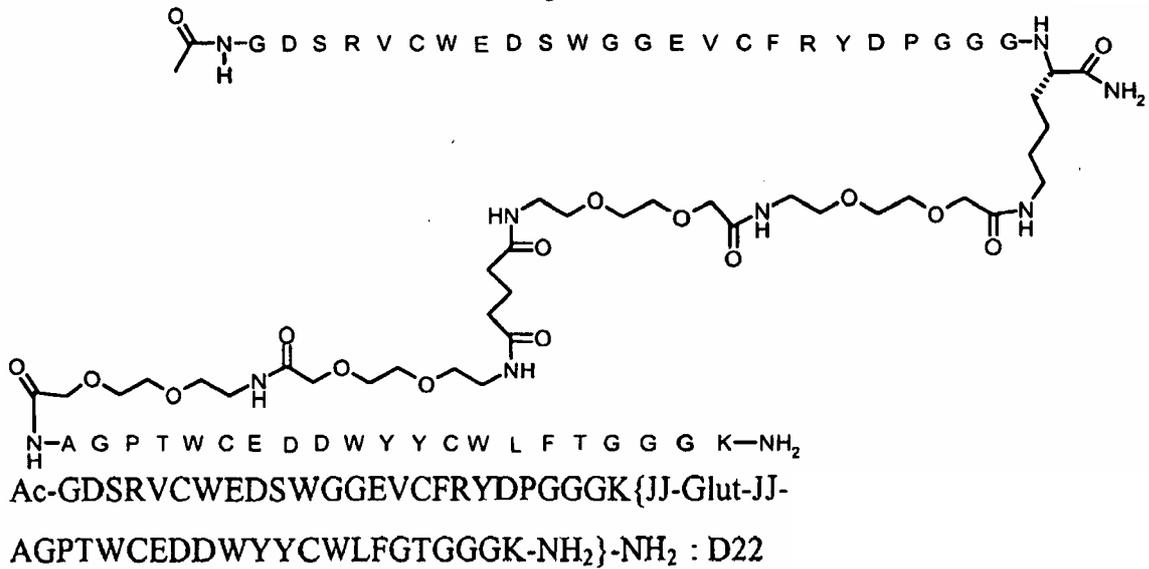
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {Biotina-K[Ac-  
VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut)-NH<sub>2</sub>]}-NH<sub>2</sub> : D19

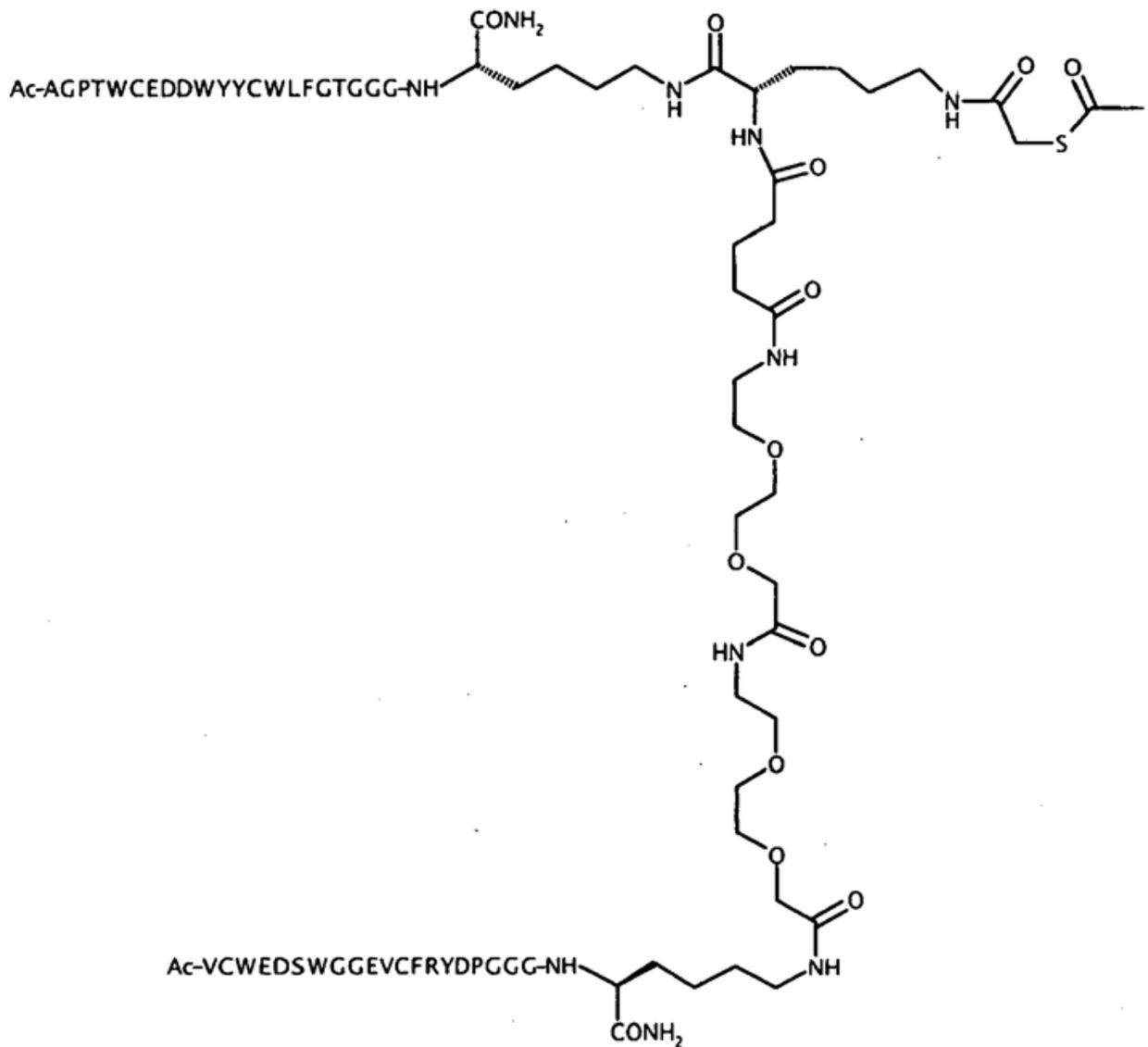


(-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-NH<sub>2</sub>)-Glut-  
VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH<sub>2</sub> : D20

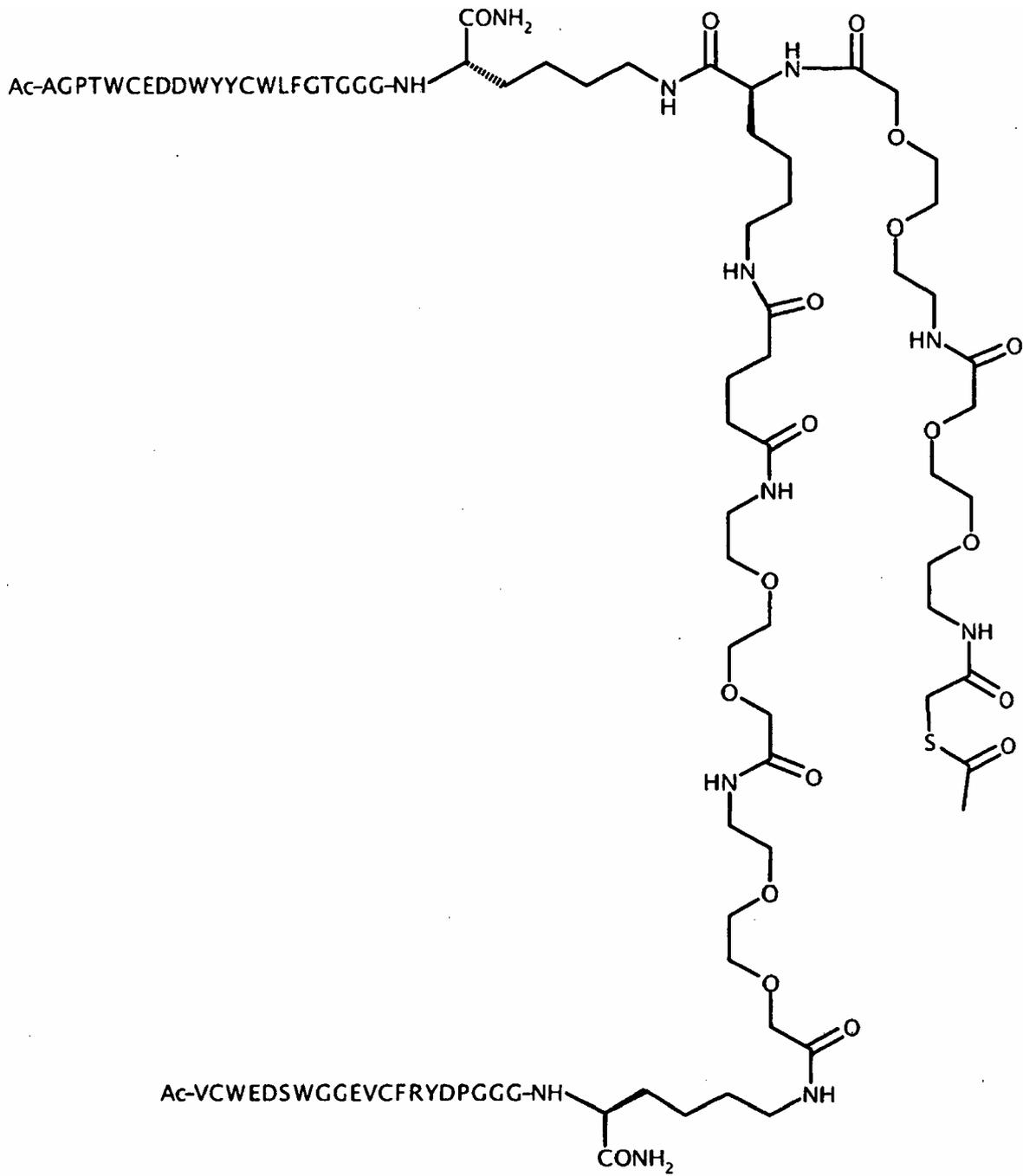


[-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(PnAO6-Glut)-NH<sub>2</sub>]-Glut-  
 JJVCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH<sub>2</sub> : D21

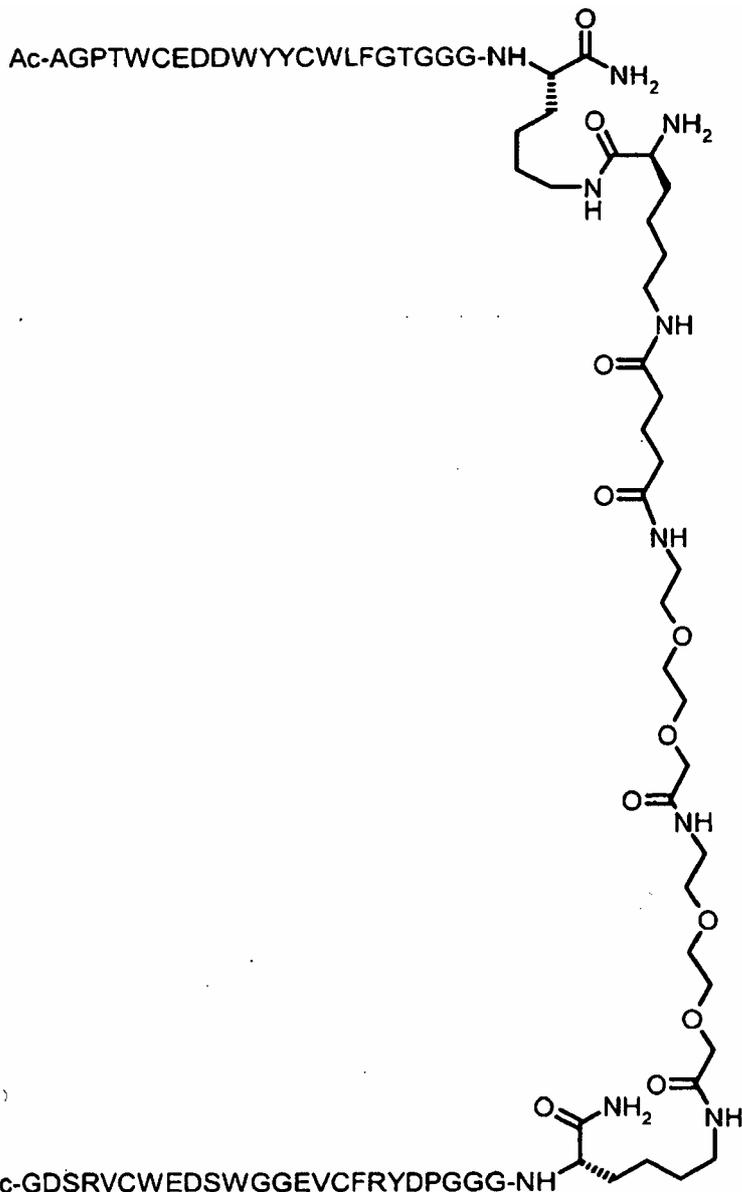




Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK [JJ-  
 Glut-K(SATA)]-NH<sub>2</sub>}-NH<sub>2</sub> : D23 (D5 funcionalizado con el grupo SATA  
 (S-acetiltioacetilo))

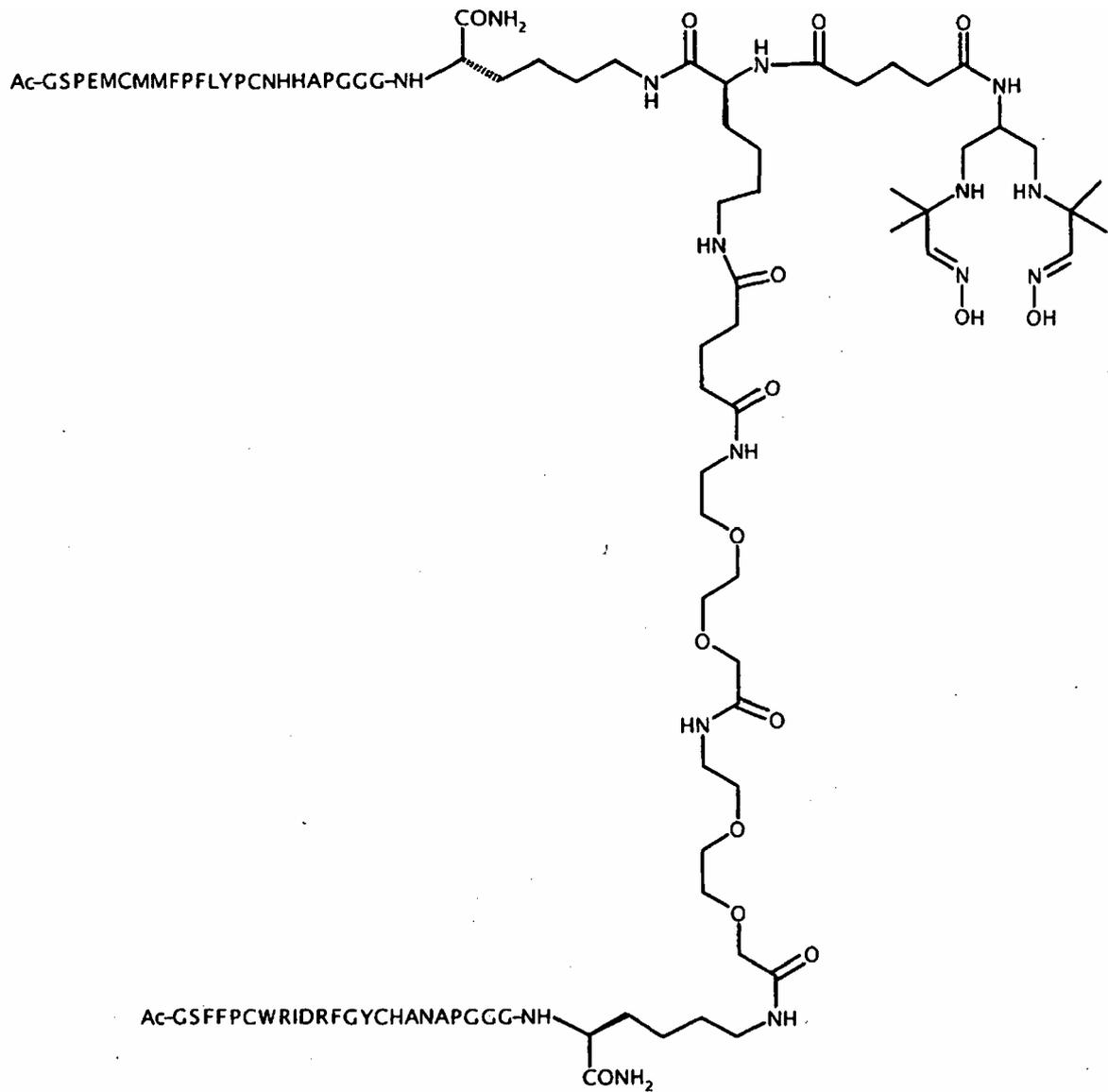


Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{SATA-JJK[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut)-NH<sub>2</sub>]}-NH<sub>2</sub> : D24

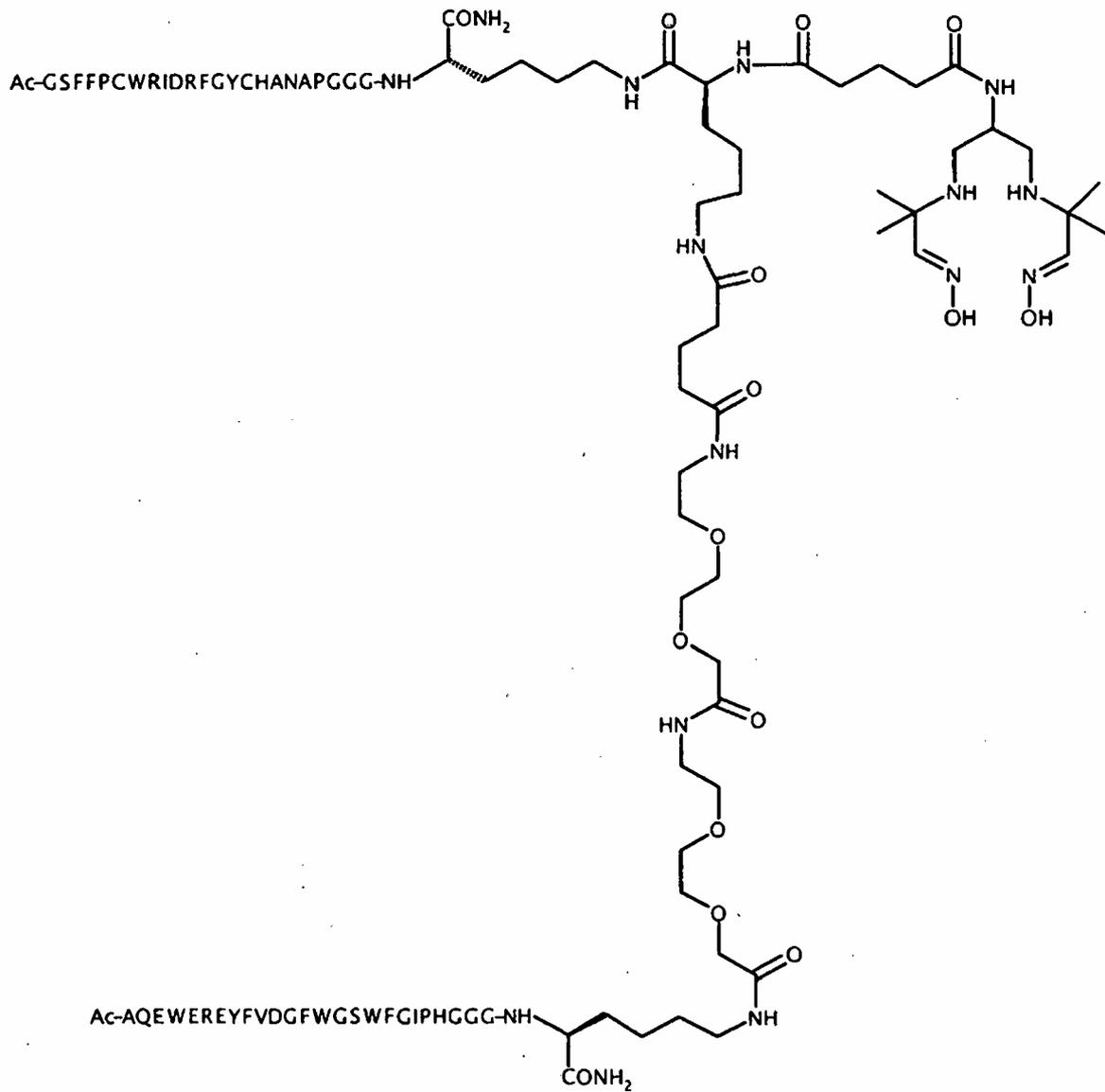


Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {Ac-  
 GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK [JJ-Glut-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-(S)-CH(NH<sub>2</sub>)C(=O)-]-  
 NH<sub>2</sub>}-NH<sub>2</sub> : D25

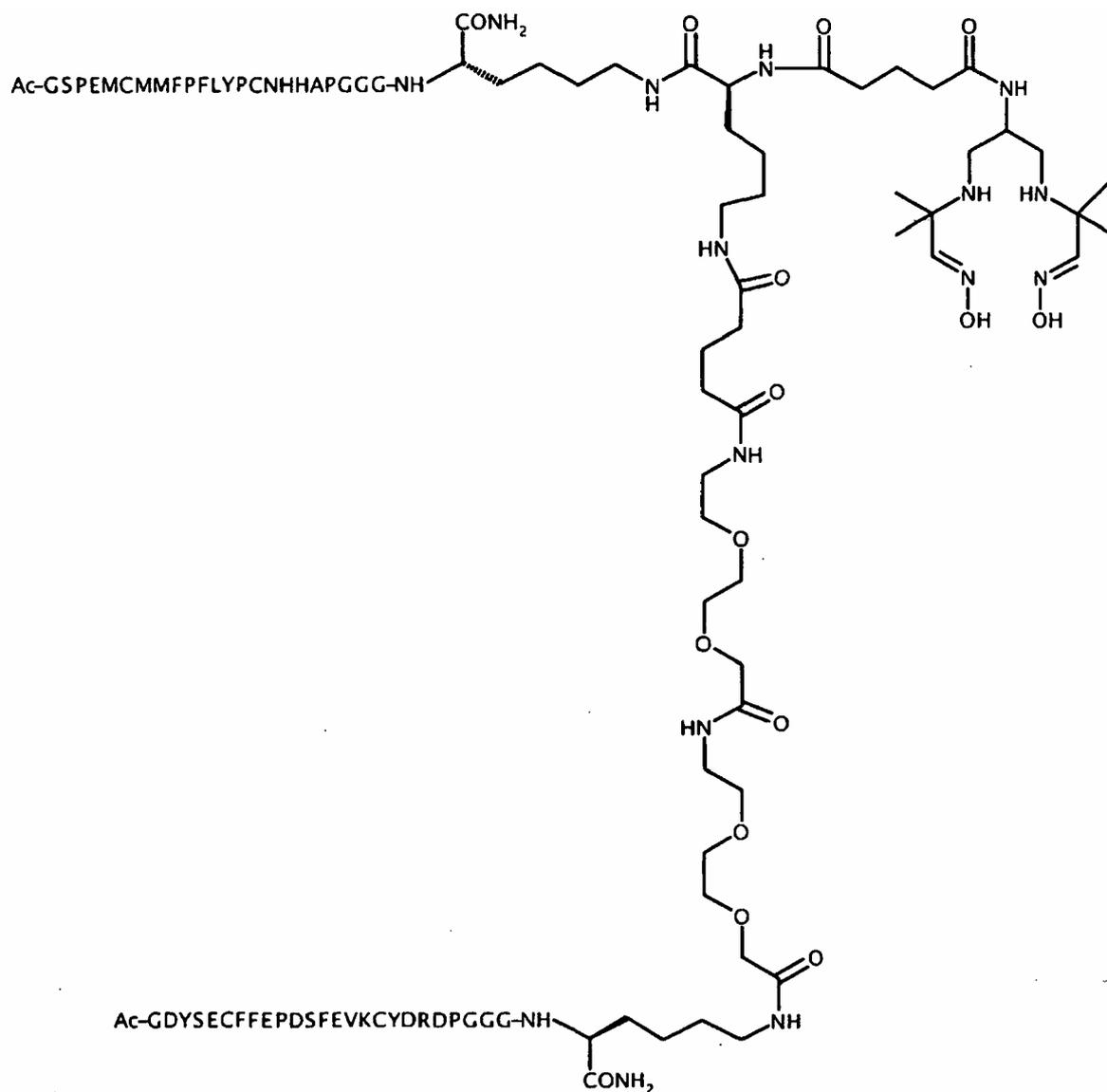




Ac-GSP EMCMMFPFLYPCNHHAPGGGK {PnaO6-Glut-K[Ac-GSFFPCWRIDRFGYCHANAPGGGKJ-Glut]-NH<sub>2</sub>}-NH<sub>2</sub> : D28 (Un elemento de unión a c-Met heterodimérico)



Ac-GSFFPCWRIDRFGYCHANAPGGGK {PnAO6-Glut-K[Ac-AQEWEREYFVDGFWGSWFGIPHGGGK(JJ-Glut)-NH<sub>2</sub>]}-NH<sub>2</sub> : D29 (Un elemento de unión a c-Met heterodimérico)



Ac-GSP EMCMMFPFLYPCNHHAPGGGK {PnAO6-Glut-K[Ac-GDYSECFEPDSFEVKCYDRDPGGGK(JJ-Glut)-NH<sub>2</sub>]}-NH<sub>2</sub> : D30 (Un elemento de unión a c-Met heterodimérico)

5 Para la preparación del dímero D5, tras la reacción de acoplamiento de los péptidos individuales, se añadieron 50  $\mu$ l de hidrazina a la mezcla de reacción (para exponer el grupo N<sup>ε</sup>-amino de lisina) y se agitó la disolución durante 2 min. Se diluyó la mezcla de reacción con agua (1,0 ml) y se ajustó el pH a 2 con TFA. Entonces se purificó mediante el método descrito anteriormente.

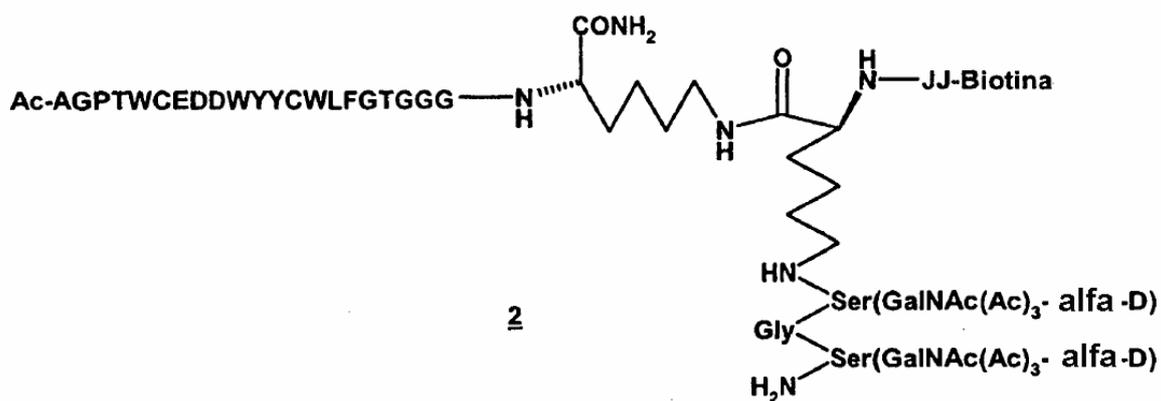
#### Síntesis de D27

10 Esquema 1 – Síntesis del compuesto 2 (P12-Q)

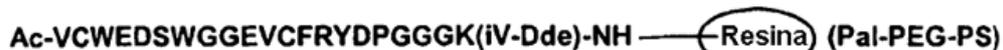
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(iV-Dde)-NH—(Resina) (Pal-PEG-PS)

1

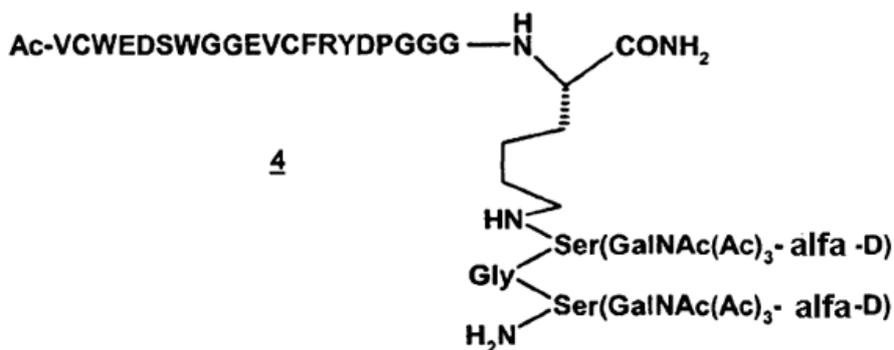
1. Hidrazina al 10% en DMF (2 x 10 min)
2. Fmoc-Lys(iV-Dde)-OH/HOBt/DIC/DMF
3. Piperidina al 20% en DMF (2 x 10 min)
4. Fmoc-NH-JJ-biotina/HOBt/DIC/DMF
5.  $\text{NH}_2\text{NH}_2$ /DMF (al 10%, 2 x 10 min)
6. Fmoc-Ser(GalNAc(Ac)<sub>3</sub>- $\alpha$ -D)-OH/HATU/DIEA/DMF
7. Piperidina al 20% en DMF (2 x 10 min)
8. Fmoc-Gly-OH/HOBt/DIC/DMF
9. Piperidina al 20% / DMF (2 x 10 min)
10. Fmoc-Ser(GalNAc(Ac)<sub>3</sub>- $\alpha$ -D)-OH/HATU/DIEA/DMF
11. Piperidina al 20% en DMF (2 x 10 min)
12. Reactivo B
13. DMSO/N-metilglucamina ac./pH 8/aire/2 días



Esquema 2 – Síntesis del compuesto 4 (P6-F-Q)

**3**

1. Hidrazina al 10% en DMF (2 x 10 min)
2. Fmoc-Ser(GalNAc(Ac)<sub>3</sub>-α-D)-OH/HATU/DIEA/DMF
3. Piperidina al 20% en DMF (2 x 10 min)
4. Fmoc-Gly-OH/HOBt/DIC/DMF
5. Piperidina al 20% en DMF (2 x 10 min)
6. Fmoc-Ser(GalNAc(Ac)<sub>3</sub>-α-D)-OH/HATU/DIEA/DMF
7. Piperidina al 20% en DMF (2 x 10 min)
8. Reactivo B
9. DMSO/N-metilglucamina/pH 8/aire/2 días



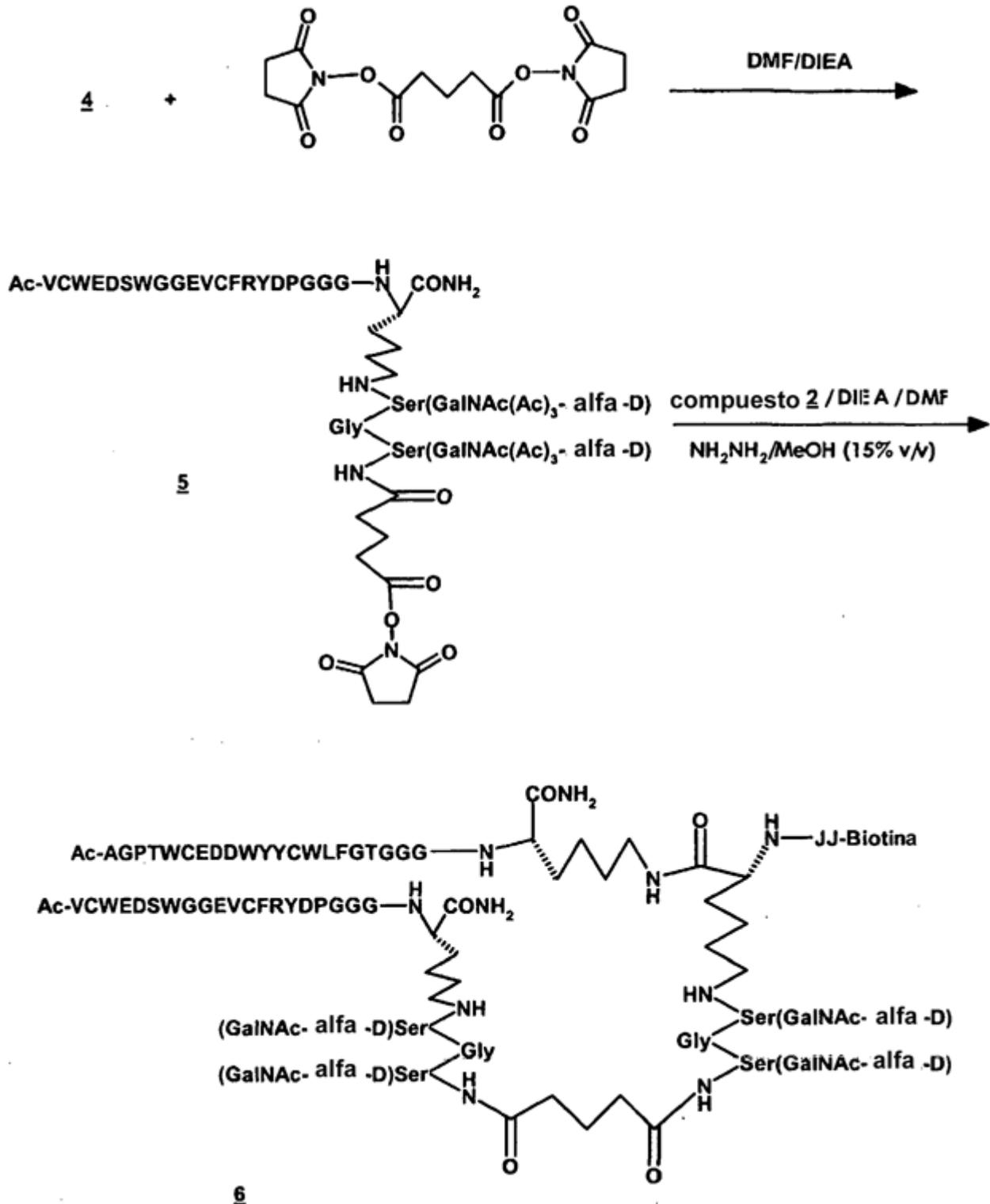
#### Síntesis de 1 y 3

- 5 Se llevó a cabo la síntesis de los monómeros tal como se describió en el método 5 en una escala de 0,25 mmol empleando como resina de partida la resina Fmoc-GGGK(iV-Dde)NH-PAL-PEG-PS. Se lavó el péptido-resina y se secó antes de la escisión o derivatización adicional mediante métodos automatizados o manuales.

#### Procedimiento para la síntesis de 2 y 4

- 10 Se realizó la adición de restos de biotina-JJ, lisilo, glicilo y serinil(GalNAc(Ac)<sub>3</sub>-α-D) en 1 y 3 mediante SPS manual tal como se describió en el método 6 y el método 8. Se llevó a cabo el acoplamiento de aminoácidos en DMF usando activación con HOBt/DIC (a excepción de Ser(GalNAc(Ac)<sub>3</sub>-α-D). Se llevó a cabo la eliminación de Fmoc con piperidina al 20% en DMF. Todos los acoplamientos tuvieron una duración de 5-16 horas. Tras cada acoplamiento,
- 15 se confirmó la finalización mediante la prueba de Kaiser. En el caso de Ser(Gal-NAc(Ac)<sub>3</sub>-α-D, el acoplamiento se realizó en DMF empleando HATU/DIEA como agente de acoplamiento. En los casos en que la prueba de Kaiser indicó grupos amino sin reaccionar, se repitió el acoplamiento. Se realizó la eliminación del grupo Fmoc N-terminal y la escisión de la resina. Se precipitó el péptido en bruto en éter y se lavó dos veces con éter y se secó a vacío. Se cicló directamente el péptido en bruto lineal disolviendo el péptido en DMSO (40 mg/ml). Se ajustó el pH de la
- 20 disolución a 8 mediante la adición de N-metilglucamina acuosa y se agitó la disolución en aire durante 48 h a temperatura ambiente. Entonces se purificaron los péptidos empleando HPLC en gradiente tal como se describió en el método 1 empleando una columna preparativa C-18 ODS de Waters-YMC (250 mm x 4,6 mm de d.i.). Se combinaron las fracciones que contenían el producto puro y se liofilizaron para proporcionar los péptidos necesarios.

- 25 Esquema 3 – Síntesis de D27 (6)



Procedimiento: Síntesis de D27 - Compuesto 6

- 5 A una disolución de éster bis-NHS del ácido glutárico (0,122 mmol, Pierce Scientific Co.) en DMF anhidra se le añadió gota a gota una disolución de 4 en DMF (40 mg, 0,0122 mmol). Se añadió DIEA para neutralizar el ácido trifluoroacético unido al péptido y la N-hidroxisuccinimida formada durante la reacción. Se agitó esta disolución de 0,7 ml durante 4 h. Se monitorizó la reacción mediante HPLC y espectroscopía de masas. Se eliminó la DMF a vacío. Se eliminó el diéster en exceso mediante la adición de acetato de etilo que hizo precipitar el péptido-

monoéster 5 mientras se disolvía el éster bis-NHS del ácido glutámico. Se centrifugó la mezcla y se decantó la porción líquida. Esto se repitió dos veces. Se mantuvo el residuo a vacío durante 10 min. Se disolvió el residuo en DMF y se mezcló con una disolución de 2 (37 mg, 0,009 mmol) en DMF (pH 7). Se agitó a temperatura ambiental durante 16 h. Se eliminaron los compuestos volátiles a alto vacío y se eliminaron las funciones acetato mediante el tratamiento del residuo con 1 ml de disolución de hidracina/MeOH (15/85, v/v) con agitación durante 2,5 h a temperatura ambiental. Se añadió acetona para extinguir el exceso de hidracina y se eliminaron los compuestos volátiles a vacío. Se disolvió el residuo resultante en DMSO y se purificó mediante HPLC preparativa tal como se describió anteriormente para proporcionar 9 mg del material puro.

#### 10 Datos analíticos

Los datos del análisis de HPLC y los datos de espectrometría de masas para los péptidos diméricos D1-5 y D8-30 identificados anteriormente, así como los de los componentes peptídicos del dímero D27, se facilitan en la tabla 6 a continuación.

15

Tabla 6. Datos analíticos para constructos peptídicos homodiméricos y heterodiméricos

N.º de compuesto	Tiempo de retención (sistema)	Datos de espectrometría de masas (API-ES, - ion)
D1	8,98 min (A)	1987,7 (M-3H)/3, 1490,6 (M-4H)/4, 1192,3 (M-5H)/5
D2	16,17 min (B)	2035,3 (M-3H)/3, 1526,1 (M-4H)/4, 1220,7 (M-5H)/5
D3	8,74 min (C)	1933,6 (M-3H)/3, 1449,9 (M-4H)/4, 1159,4 (M-5H)/5
D4	10,96 min (D)	2032,8 (M-3H)/3
D5	6,57 min (E)	1816,2 (M-3H)/3, 1361,8 (M-4H)/4, 1089,4 (M-5H)/5, 907,7 (M-6H)/6
D8	4,96 min; (F)	2379,3 [M-3H]/3
D9	5,49 min; (G)	2146,4 [M-3H]/3
D10	5,44 min; (H)	2082,7 [M-3H]/3, 1561,7 [M-4H]/4, 1249,1 [M-5H]/5, 1040,7 [M-6H]/6
D11	7,23 min; (E)	2041,8 [M-3H]/3, 1531,1 [M-4H]/4, 1224,6 [M-5H]/5
D12	5,84 min; (H)	1877,1 [M-3H]/3, 1407,6 [M-4H]/4, 1125,9 [M-5H]/5, 938,1 [M-6H]/6
D13	5,367 min; (E)	1965,3 [M-3H]/3, 1473,8 [M-4H]/4, 1178,8 [M-5H]/5, 982,2 [M-6H]/6
D14	4,78 min; (I)	2275,0 [M-3H]/3, 1362,8 [M-5H]/5
D15	5,41 min; (H)	1561,3 [M-4H]/4, 1249,1 [M-5H]/5, 1040,8 [M-6H]/6, 891,8 [M-7H]/7
D16	5,44 min; (J)	2150,8 [M-3H]/3, 1613,1 [M-4H]/4, 1289,9 [M-5H]/5, 1074,8 [M-6H]/6, 920,9 [M-7H]/7
D17	4,78 min; (K)	1789,4 [M-3H]/3, 1347,7 [M-4H]/4
D18	4,74 min; (L)	2083,1 [M-3H]/3, 1562,7 [M-4H]/4, 1249,5 [M-5H]/5
D19	7,13 min; (O)	1891,9 [M-3H]/3, 1418,4 [M-4H]/4, 1134,8 [M-5H]/5, 945,5 [M-6H]/6
D20	9,7 min; (P)	2700,4 [M-2H]/2, 1799,3 [M-3H]/3
D21	6,1 min; (P)	2891,3 [M-2H]/2, 1927,2 [M-3H]/3, 1445,1 [M-4H]/4, 1155,8 [M-5H]/5,
D22	6,23 min; (Q)	1994,4 [M-3H]/3, 1495,7 [M-4H]/4, 1196,3 [M-5H]/5
D23	7,58 min; (J)	1854,4 [M-3H]/3, 1390,8 [M-4H]/4, 1112,7 [M-5H]/5, 927 [M-6H]/6
D24	8,913 min; (R)	1952,1 [M-3H]/3, 1463,4 [M-4H]/4, 1171,1 [M-5H]/5, 975,3 [M-6H]/6
D25	5,95 min; (E)	1954,9 [M-3H]/3, 1466,1 [M-4H]/4, 1172,4 [M-5H]/5, 976,8 [M-6H]/6
D26	6,957 min; (S)	1759,1 [M-3H]/3, 1319,6 [M-4H]/4, 1055,1 [M-5H]/5
D27	5,50 min; (M)	2317,6 [M-3H]/3, 1737,2 [M-4H]/4, 1389,3 [M-5H]/5, 1157,7 [M-6H]/6
D28	4,89 min; (N)	6229 [M+H]
D29	5,01 min; (N)	2258,1 [M-3H + TFA]/3
D30	4,35 min; (N)	2176,0 [M-3H]/3, 1631,5 [M-4H]/4, 1302,6 [M-5H]/5, 1087,7 [M-6H]/6, 932,1 [M-7H]/7

P12-Q	7,4 min (T)	2041,3 [M - 2H]/2
P6-F-Q	8,0 min (T)	1636,3 [M - 2H]/2

#### Sistemas de análisis de HPLC

- 5 Sistema A: Columna: C-4 de YMC (4,6 x 250 mm); Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 25% de B, Gradiente lineal del 25-60% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 2,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 10 Sistema B: Columna: C-4 de YMC (4,6 x 250 mm); Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 25% de B, Gradiente lineal del 25-60% de B en 20 min; Velocidad de flujo: 2,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 15 Sistema C: Columna: C-4 de YMC (4,6 x 250 mm); Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 30% de B, Gradiente lineal del 30-60% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 2,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 20 Sistema D: Columna: C-4 de YMC (4,6 x 250 mm); Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 20% de B, Gradiente lineal del 20-60% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 2,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 25 Sistema E: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 10% de B, Gradiente lineal del 10-60% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 30 Sistema F: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 30% de B, Gradiente lineal del 30-70% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 35 Sistema G: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 30% de B, Gradiente lineal del 30-75% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 40 Sistema H: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 20% de B, Gradiente lineal del 20-52% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 45 Sistema I: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 10% de B, Gradiente lineal del 10-65% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 50 Sistema J: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 20% de B, Gradiente lineal del 20-60% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 55 Sistema K: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 5% de B, Gradiente lineal del 5-60% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 60 Sistema L: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 5% de B, Gradiente lineal del 5-65% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 60 Sistema M: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 15% de B, Gradiente lineal del 15-50% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 60 Sistema N: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 10% de B, Gradiente lineal del 20-80% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.
- 60 Sistema O: Columna: C18 de YMC, 4,6 x 250 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 30% de B, Gradiente lineal del 30-60% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 2,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Sistema P: Columna: C18 de YMC, 4,6 x 250 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 20% de B, Gradiente lineal del 20-80% de B en 20 min; Velocidad de flujo: 2,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

5 Sistema Q: Columna: C18 de YMC, 4,6 x 250 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 20% de B, Gradiente lineal del 20-60% de B en 6 min; Velocidad de flujo: 2,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

10 Sistema R: Columna: C18 de YMC, 4,6 x 250 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 25% de B, Gradiente lineal del 25-60% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 2,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

15 Sistema S: Columna: C18 de YMC, 4,6 x 100 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 10% de B, Gradiente lineal del 10-60% de B en 10 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

20 Sistema T: Columna: XTerra de Waters, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (TFA al 0,1%), B: Acetonitrilo (TFA al 0,1%); Elución: Condiciones iniciales, el 15% de B, Gradiente lineal del 15-50% de B en 8 min; Velocidad de flujo: 3,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

### Ejemplo 10

#### Competencia con <sup>125</sup>I-VEGF por unirse a KDR en células HUVEC y transfectadas con KDR

25 El siguiente experimento evaluó la capacidad de polipéptidos de unión a KDR, homodímeros y heterodímeros de la invención para competir con VEGF marcado con <sup>125</sup>I para unirse a KDR expresado por células 293H transfectadas.

Protocolo:

30 Se transfectaron células 293H con el ADNc de KDR o se transfectaron de manera simulada mediante técnicas convencionales descritas en el presente documento. Se incubaron las células con <sup>125</sup>I-VEGF en presencia o ausencia de compuestos de competencia (a 10 μM, 0,3 μM y 0,03 μM). Tras lavar las células, se cuantificó la radiactividad unida en un contador gamma. Se calculó la inhibición en porcentaje de la unión de VEGF usando la fórmula  $[(Y1-Y2) \times 100 / Y1]$ , donde Y1 es la unión específica a células 293H transfectadas con KDR en ausencia de péptidos, e Y2 es la unión específica a células 293H transfectadas con KDR en presencia de competidores peptídicos. Se calculó la unión específica a células 293H transfectadas con KDR restando la unión a células 293H transfectadas de manera simulada de la unión a células 293H transfectadas con KDR.

Resultados:

40 Tal como se muestra en la figura 14, todos los compuestos de unión a KDR sometidos a ensayo pudieron competir con <sup>125</sup>I-VEGF por unirse a células transfectadas con KDR. El heterodímero (D1) fue claramente el más eficaz en la competencia con <sup>125</sup>I-VEGF, incluso con respecto a los dos homodímeros (D2 y D3), lo que confirma la unión superior de D1.

### Ejemplo 11

#### Ensayo de activación de receptor

50 Se evaluó la capacidad de constructos multiméricos de unión a KDR, incluyendo los heteromultímeros de la invención, para inhibir la activación inducida por VEGF (fosforilación) de KDR usando el siguiente ensayo (véase también el ejemplo 4 anterior).

Protocolo:

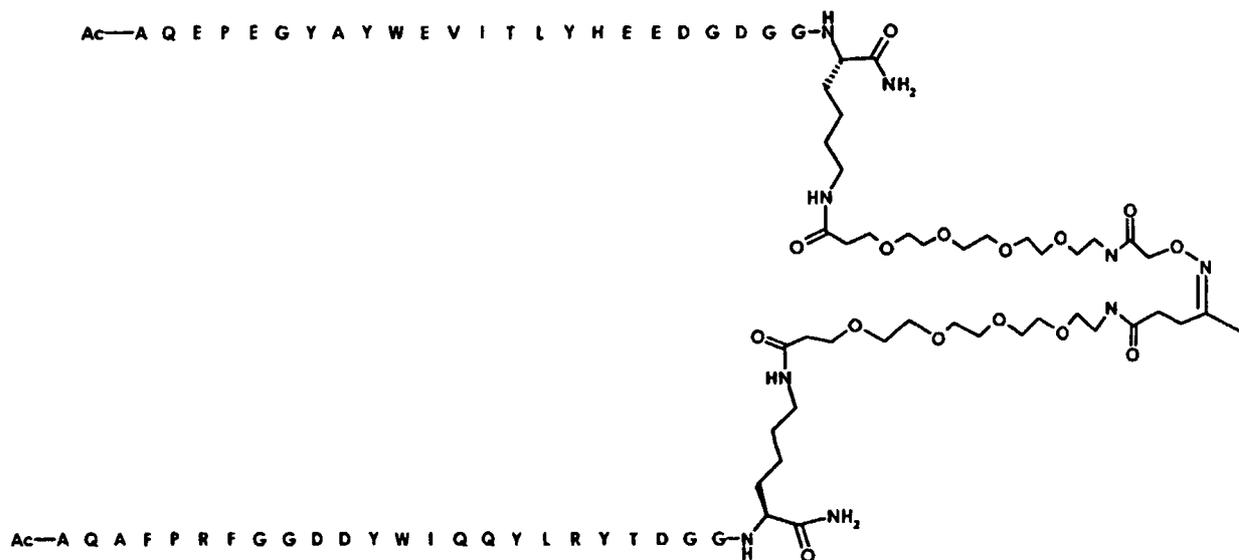
55 Se colocaron placas de HUVEC casi confluentes en medio basal que carecía de suero o factores de crecimiento durante la noche. Al día siguiente, se pretrataron las placas en el siguiente grupo (c) durante 15 min en medio basal con un péptido de unión a KDR, luego se colocaron las células en las placas en los grupos (a), (b) y (c) en medio basal recién preparado que contenía:

- 60 (a) ausencia de aditivos (control negativo),
- (b) VEGF 5 ng/ml (control positivo), o
- 65 (c) VEGF 5 ng/ml más el supuesto péptido de competencia/inhibición.

Tras 5 min de tratamiento, se prepararon lisados de las placas. Se analizó el KDR inmunoprecipitado de los lisados de manera secuencial mediante inmunotransferencia para determinar la fosforilación con un anticuerpo anti-fosfotirosina, y para determinar el KDR total con un anticuerpo anti-KDR (para controlar la carga de muestra).

## 5 Resultados:

Tal como se muestra en la figura 15, D1 pudo bloquear completamente la fosforilación de KDR inducida por VEGF en HUVEC a 10 nM. Más de la mitad de la fosforilación se inhibió mediante el compuesto a 1 nM. Los homodímeros D2 y D3, compuestos por los dos restos de unión individuales que están contenidos en D1, no tuvieron ningún efecto sobre la fosforilación en hasta 100 nM, lo que demuestra el beneficio que puede lograrse usando un heterodímero apropiado para bloquear una interacción receptor-ligando. En múltiples experimentos, la  $CI_{50}$  para D1 en este ensayo varió entre 0,5 y 1 nM. Un heterodímero diferente que contenía secuencias de unión no relacionadas, D31 (estructura mostrada más adelante), no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación a 100 nM pese a su alta afinidad de unión (11 nM para KDR mediante Biacore), lo que sugiere que la elección de restos de unión a KDR es importante cuando se construye un multímero para competir con VEGF por unirse a KDR. Aun cuando la afinidad de D1 por KDR es 10 veces superior a la de D2 (mediante análisis de SPR), su  $CI_{50}$  en el ensayo de activación es al menos 100 veces inferior, lo que sugiere que seleccionar como diana dos epítopos distintos en KDR con una única molécula de unión puede generar mayor impedimento estérico que una molécula con afinidad similar que sólo se une a un único epítipo en KDR. De manera similar, debe señalarse que los dos restos de unión a KDR dentro de D1 cuando se sometieron a prueba como péptidos libres monoméricos (P12-XB y P6-D) en el ensayo de activación de receptor tuvieron  $CI_{50}$  de 0,1 y 1 micromolar, respectivamente, que es de 100 a 1000 veces superior a la  $CI_{50}$  para D1 en el ensayo y de 14 a 30 veces superior a las  $K_D$  para los derivados con fluoresceína de los péptidos monoméricos. Por tanto, crear un dímero que contiene dos péptidos con actividad bloqueante de VEGF débil ha dado como resultado una molécula con una actividad bloqueante de VEGF muy potente que va mucho más allá de la afinidad de unión aumentada de D1.



D31: Ac-AQEPGYAYWEVITLYHEEDGDGGK(Ac-AQAFPRFGDDYWIQQYLR YTDGGK(-

(O=)C(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)=NOCH<sub>2</sub>C(=O)NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-)NH<sub>2</sub>)NH<sub>2</sub>

## Ejemplo 12

30

### Ensayo de migración

El siguiente experimento evaluó la capacidad de D1, un heteromultímero de la invención, para bloquear la migración inducida por VEGF de HUVEC en cultivo.

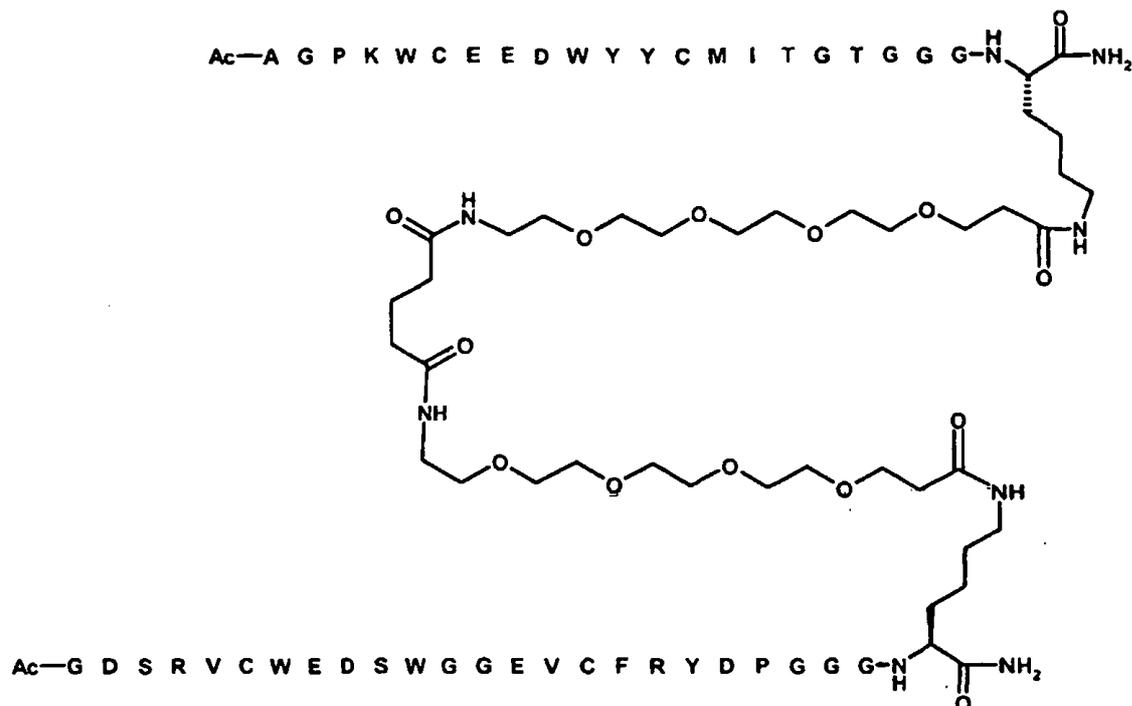
35

Protocolo:

Se colocaron HUVEC privadas de suero, 100.000 células por pocillo, en las cámaras superiores de placas de inserción de 24 pocillos FluoroBlok recubiertas con Matrigel de BD (n.º 354141). Se añadió medio basal, que contenía o bien nada o bien diferentes agentes atrayentes tales como VEGF (10 ng/ml) o suero (FBS al 5%) en presencia o ausencia de posibles compuestos de bloqueo/inhibición de VEGF, a la cámara inferior de los pocillos. Tras 22 horas, se logró la cuantificación de la migración/invasión celular marcando posteriormente las células en las placas de inserción con un colorante fluorescente y midiendo la fluorescencia de las células que invadían/migraban en un lector de placas para fluorescencia. Se calculó la migración inducida por VEGF restando la migración que se producía cuando sólo se colocó medio basal en la cámara inferior de los pocillos.

Resultados:

VEGF indujo un gran aumento en la migración de células endoteliales en el ensayo, que se bloqueó de manera potente por D1. A D1 5 nM, la migración de células endoteliales estimulada por VEGF se bloqueó en un 84% (véase la figura 16). A D1 25 nM, esta migración se bloqueó casi completamente. En otros experimentos, se sometió a prueba un inhibidor de KDR conocido, SU-1498 ((E)-3-(3,5-diisopropil-4-hidroxifenil)-2-[(3-fenil-n-propil)aminocarbonil]acrilonitrilo) en el ensayo. SU1498 a 3 micromolar no bloqueó la migración inducida por VEG tan bien como D1 (bloqueo del 47% a 3 micromolar). D7 (estructura facilitada más adelante), a 50 nM, también produjo una inhibición esencialmente completa de la migración estimulada por VEGF. El suero fue un agente atrayente muy poderoso en el ensayo cuando se usó el lugar de VEGF, pero su efecto no se disminuyó significativamente por D1, lo que indica que D1 inhibe específicamente la migración endotelial inducida por VEGF.



D7: Ac-AGPKWC\*EEDWYYC\*MITGTGGGK(Ac-GDSRVC\*WEDSWGGEVC\*FRYDPGGGK(-(O=)C(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C(=O)-)NH<sub>2</sub>)NH<sub>2</sub>

### 25 Ejemplo 13

Los siguientes experimentos describen métodos usados para preparar compuestos marcados con Tc, In, Lu e I.

Preparación de <sup>99m</sup>Tc-P12-P

30

Se disolvió SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (20 mg) en 1 ml de HCl 1 N, y se añadieron 10 µl de esta disolución a 1 ml de una disolución de DTPA que se preparó disolviendo 10 mg de CaNa<sub>2</sub>DTPA 2,5 H<sub>2</sub>O (Fluka) en 1 ml de agua. Se ajustó el pH de la disolución estannosa de DTPA a pH 6-8 usando NaOH 1 N. Se mezclaron 50 µg de P12-P (Ac-AGPTWC\*EDDWYYC\*WLFGTGGGK(PnA06-NH-(O=)C(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)-JJ)-NH<sub>2</sub>) en 50 µl de DMF al 10% con 20 µl de <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> (de 2,4 a 4 mCi, Syncor), seguido por 100 µl de disolución estannosa de Sn-DTPA. Tras 30 minutos a TA, la pureza radioquímica (RCP) fue del 93%. Se purificó el producto en una columna de amida Discovery C16 de Supelco (4 x 250 mm, tamaño de poro de 5 µm) eluida a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min usando un gradiente de fase acuosa/fase orgánica de acetato de amonio 1 g/l en agua (A) y acetonitrilo (B). Se usó el siguiente gradiente: del 30,5% de B al 35% de B en 30 minutos, aumento hasta el 70% de B en 10 min. Se recogió el compuesto, que eluyó a un tiempo de retención de 21,2 minutos, en 500 µl de tampón citrato 50 mM (pH 5,2) que contenía ácido ascórbico al 1% y HSA al 0,1%, y se eliminó el acetonitrilo usando un aparato Speed Vacuum (Savant). Tras la purificación, el compuesto tenía una RCP >98%.

#### Preparación de <sup>111</sup>In-P12-XDT

Se mezclaron 50 µg de P12-XDT (Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK(JJ-DOTA)-NH<sub>2</sub>) en 50 µl de DMF al 10% con <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (50 µl, 400 µCi, Mallinckrodt) y 100 µl de acetato de amonio 0,2 M o tampón citrato a un pH de 5,3. Tras calentarse a 85°C durante 45 minutos, la pureza radioquímica (RCP) osciló entre el 44% y el 52,2% tal como se determina usando HPLC. Se separó el compuesto marcado con <sup>111</sup>In del ligando no marcado usando una columna C18 de Vydac (4,6 x 25 cm, tamaño de poro de 5 micrómetros) en las siguientes condiciones: fase acuosa, acetato de amonio 1 g/l (pH 6,8); fase orgánica, acetonitrilo. Gradiente: del 23% de fase orgánica al 25% de fase orgánica en 30 minutos, hasta el 30% de fase orgánica en 2 minutos, mantenido durante 10 minutos. Se recogió el compuesto, que eluyó a un tiempo de retención de 20,8 min, en 200 µl de tampón citrato 50 mM (pH 5,2) que contenía ácido ascórbico al 1% y HSA al 0,1%, y se eliminó el acetonitrilo usando un aparato Speed Vacuum (Savant). Tras la purificación, el compuesto tenía una RCP >93%.

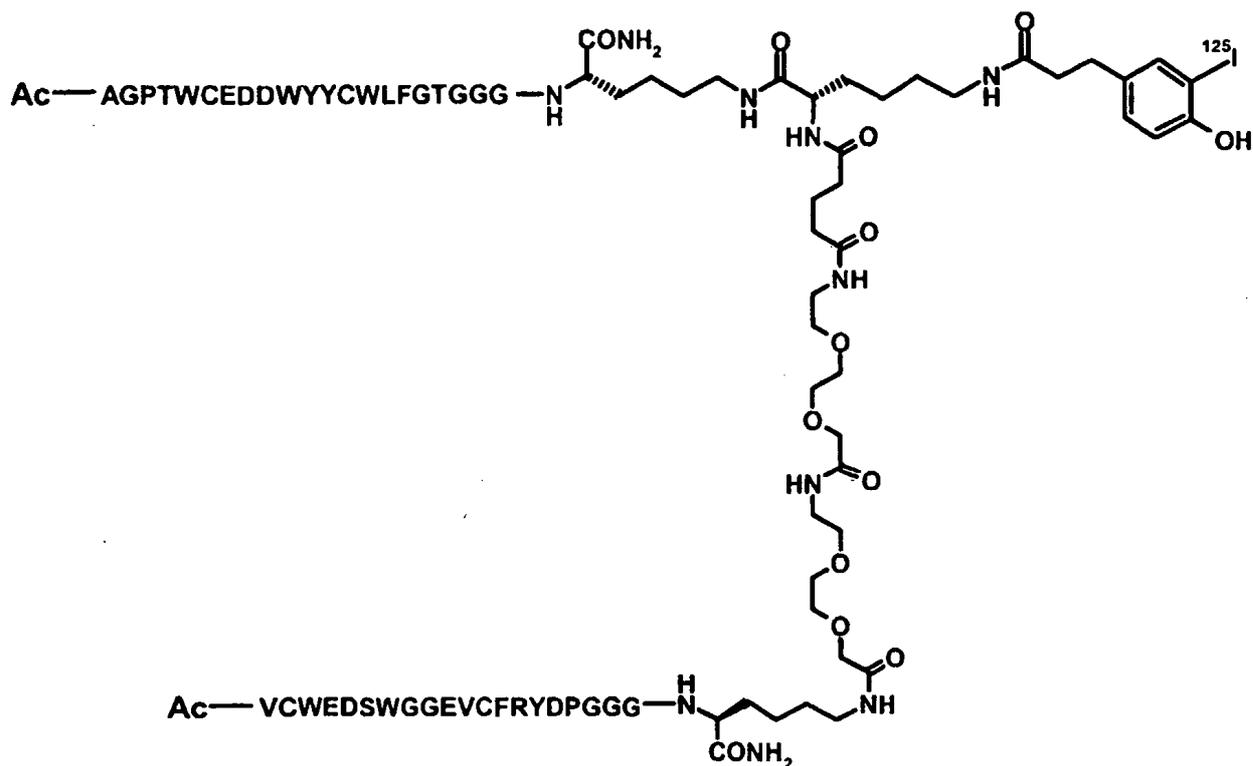
#### Preparación de <sup>111</sup>In-D4

Se preparó un tampón de histidina ajustando una disolución de histidina 0,1 M (Sigma) a pH 6,25 con hidróxido de amonio concentrado. Se preparó tampón acetato de amonio ajustando una disolución de acetato de amonio 0,2 M (al 99,99%, Aldrich) a pH 5,5 usando HCl concentrado (J. T. Baker, Ultra Pure). Se añadió <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> de alta pureza (100 µl, 1,2 mCi, Mallinckrodt) a D4 (200 µg en 200 µl del 50% de DMF, el 10% de DMSO, el 20% de acetonitrilo y el 20% de agua), seguido por la adición de 300 µl de tampón de histidina. El pH final fue de 5,5. Tras la incubación de la mezcla de reacción a 85°C durante 45 minutos, la RCP fue del 20%.

Alternativamente, se añadió <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> facilitado con un kit OctreoScan™ disponible comercialmente (134 µl, 0,6 mCi, Mallinckrodt) a D4 (135 µg) en 162 µl de tampón acetato de amonio 0,2 M. El pH final fue de 5,5. Tras la incubación de la mezcla de reacción a 85°C durante 45 min, la RCP fue del 20%.

#### Preparación de <sup>125</sup>I- D5

Se añadió D5 (200 µg), en 30 µl de DMF que se había ajustado previamente a pH 8,5-9,0 usando diisopropilamina, a 1 mCi de reactivo de Bolton-Hunter-<sup>125</sup>I monoydodado (NEX-120, Perkin-Elmer) que se había evaporado hasta sequedad. Se agitó el vial y luego se incubó en hielo durante 30 minutos con agitación ocasional. Tras este tiempo, la RCP fue del 23%. Se purificó <sup>125</sup>I-D5 (mostrado a continuación) mediante HPLC a una velocidad de flujo de 1 ml/min usando una columna C18 de Vydac (4,6 x 250 mm, tamaño de poro de 5 micrómetros) en las siguientes condiciones. Fase acuosa: TFA al 0,1% en agua; fase orgánica: TFA al 0,085% en acetonitrilo. Gradiente: del 30% de fase orgánica al 36% de fase orgánica en 30 minutos, hasta el 60% de fase orgánica en 5 minutos, mantenido durante 5 minutos. Se recogió el compuesto en 200 µl de tampón citrato 50 mM (pH 5,2) que contenía ácido ascórbico al 1% y HSA al 0,1%. Se eliminó el acetonitrilo usando un aparato Speed Vacuum (Savant). El compuesto resultante tenía una RCP de 97%.



#### Preparación de $^{177}\text{Lu-D11}$

- 5 Se añadió D11 (5  $\mu\text{l}$  de una disolución  $\sim 1 \mu\text{g/ml}$  en  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,05 N/ $\text{EtOH}$  al 10%) a un microvial de inserción de vidrio que contenía 80  $\mu\text{l}$  de tampón  $\text{NaOAc}$  0,2 M, pH 5,6. Se añadió suficiente  $^{177}\text{Lu}$  para llevar la razón ligando: $\text{Lu}$  a 2:1 (1-5 mCi). Se cerró el vial mediante un sello prensado y se calentó a  $100^\circ\text{C}$  durante 15-20 minutos, se enfrió durante 5 minutos y se trató con 3  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  al 1%. $2\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{H}_2\text{O}$ . Se inyectó toda la mezcla de reacción en una columna de amida Discovery RP C16 de Supelco (4 mm x 250 mm x 5  $\mu\text{m}$ ). Se usaron las siguientes condiciones de HPLC: Temperatura de la columna =  $50^\circ\text{C}$ , Disolvente A =  $\text{H}_2\text{O}$  con TFA al 0,1%, Disolvente B = ACN con TFA al 0,085%, gradiente de 0,6/0,25 ml/min de A/B a t = 0 minutos a 0,5/0,4 ml/min de A/B a t = 60 minutos. El tiempo de retención para D11 fue de  $\sim 40$  minutos; el de  $^{177}\text{Lu-D11}$  1334 fue de  $\sim 42$  minutos. Se recogió el pico radiactivo en 0,7 ml de tampón citrato 0,05 M, pH 5,3 que contenía la fracción V de albúmina sérica humana al 0,1% y ácido ascórbico al 1,0%, y se centrifugó la mezcla en un aparato Speed Vac de Savant para eliminar los disolventes orgánicos. Se obtuvieron purzas radioquímicas mayores del 80%.

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

- 20 Se disolvió  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (20 mg) en 1 ml de  $\text{HCl}$  1 N, y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de esta disolución a 1 ml de una disolución de DTPA que se preparó disolviendo 10 mg de  $\text{CaNa}_2\text{DTPA} \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$  (Fluka) en 1 ml de agua. Se mezcló D12 (100  $\mu\text{g}$  en 100  $\mu\text{l}$  de DMF al 50%) con 75  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 0,1 M, pH 9 y 60  $\mu\text{l}$  de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  (de 2,4 a 4 mCi, Syncor), seguido por 100  $\mu\text{l}$  de la disolución estannosa de Sn-DTPA. Tras 10 min a  $40^\circ\text{C}$ , la pureza radioquímica (RCP) fue del 16%. Se purificó el producto en una columna de amida Discovery C16 de Supelco (4 x 250 mm, tamaño de poro de 5  $\mu\text{m}$ ) eluida a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min usando un gradiente de fase acuosa/fase orgánica de TFA al 0,1% en agua (A) y TFA al 0,085% en acetonitrilo (B). Se usó el siguiente gradiente: del 30% de B al 42% de B en 36 min, aumento hasta el 70% de B en 10 min. Se recogió el compuesto, que eluyó a un tiempo de retención de 37,1 min, en 500  $\mu\text{l}$  de tampón citrato 50 mM (pH 5,2) que contenía HSA al 0,2%, y se eliminó el acetonitrilo usando un aparato Speed Vacuum (Savant). Tras la purificación, el compuesto tenía una RCP  $>90\%$ .

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

Se disolvió  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (20 mg) en 1 ml de  $\text{HCl}$  1 N, y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de esta disolución a 1 ml de una disolución de DTPA que se preparó disolviendo 10 mg de  $\text{CaNa}_2\text{DTPA} \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$  (Fluka) en 1 ml de agua. Se mezcló D14 (100  $\mu\text{g}$  en 100  $\mu\text{l}$  de DMF al 50%) con 50  $\mu\text{l}$  de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  (6 mCi, Syncor) y 125  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 0,1 M, pH 9 seguido

5 por 100  $\mu$ l de la disolución estannosa de Sn-DPTA. Tras 15 min a 40°C, la pureza radioquímica (RCP) fue del 21%. Se purificó el producto en una columna para péptidos C18 de Vydac (4,6 x 250 mm) eluida a una velocidad de flujo de 1 ml/min usando un gradiente de fase acuosa/fase orgánica de TFA al 0,1% en agua (A) y TFA al 0,085% en acetonitrilo (B). Se usó el siguiente gradiente: del 30% de B al 45% de B en 40 min. Se recogió el compuesto, que  
10 eluyó a un tiempo de retención de 34,9 min, en 500  $\mu$ l de tampón citrato 50 mM (pH 5,3) que contenía HSA al 0,2%, y se eliminó el acetonitrilo usando un aparato Speed Vacuum (Savant). Tras la purificación, el compuesto tenía una RCP de 92,5%.

#### Ejemplo 14

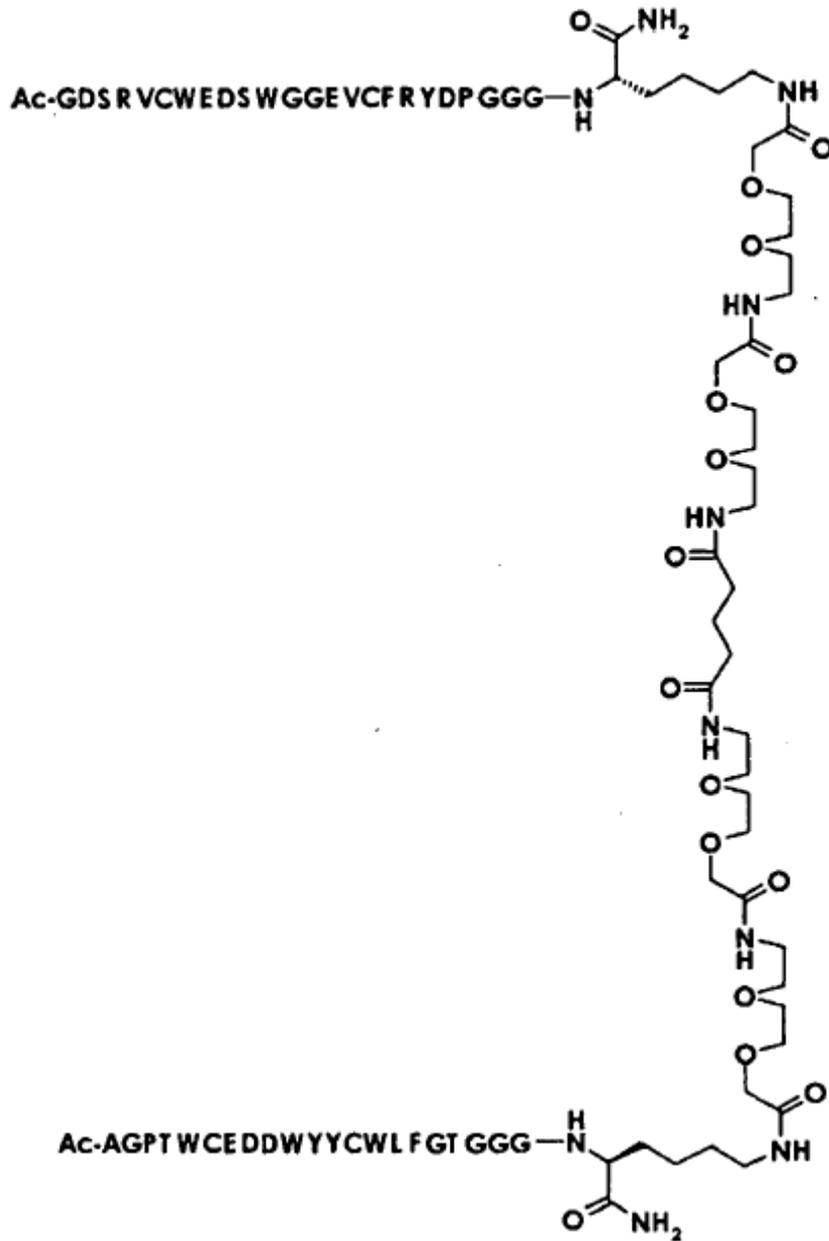
##### 10 Unión de heteromultímeros de la invención marcados con $^{125}$ I a células transfectadas con KDR

15 Se realizó un experimento para someter a prueba la capacidad de D5 marcado con  $^{125}$ I para unirse a células 293H transfectadas con KDR. En este experimento, se incubaron diferentes cantidades de D5 marcado con  $^{125}$ I (1-4  $\mu$ Ci/ml, marcado con reactivo de Bolton-Hunter- $^{125}$ I y purificado mediante HPLC) con células 293H transfectadas de manera simulada y con KDR en placas de 96 pocillos durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizó la unión con y sin suero de ratón al 40% para evaluar el efecto del suero sobre la unión a células transfectadas con KDR. Tras eliminar por lavado el compuesto no unido, se lisaron las células en cada pocillo con NaOH 0,5 N y se contaron los lisados en un contador gamma.

20 Los resultados de este experimento se resumen en la figura 17 y la figura 18. Resulta claramente evidente a partir de estos resultados que D5 marcado con  $^{125}$ I puede unirse específicamente a células transfectadas con KDR y su unión no resulta afectada por la presencia de suero de ratón al 40%. Se observó algo más de unión a células transfectadas con KDR en ausencia de suero en comparación con la unión en presencia de suero de ratón al 40%.  
25 Sin embargo, también aumentó la unión de  $^{125}$ I-D5 a células transfectadas de manera simulada aproximadamente en el mismo grado cuando se omitió el suero durante el ensayo, lo que indica que la unión aumentada en ausencia de suero no era específica (figura 17). La unión específica a células transfectadas con KDR (tras restar la unión a células transfectadas de manera simulada) parecía casi idéntica con o sin suero de ratón (tal como se muestra en la figura 18). En este experimento, el 10-14% de las CPM totales añadidas se unieron específicamente a células  
30 transfectadas con KDR (datos no mostrados).

#### Ejemplo 15

35 Se preparó un heterodímero de péptido (D6, mostrado a continuación) tal como se describió anteriormente en el ejemplo 9 usando éster bis-N-hidroxisuccinimidílico del ácido glutárico. Se sometió a prueba el heterodímero para determinar la unión a KDR-Fc usando Biacore y se determinó una constante de afinidad tal como sigue.



Peso molecular = 6030,58

Masa exacta = 6024

5 Fórmula molecular =  $C_{269}H_{368}N_{66}O_{86}S_4$

Composición molecular = C 53,58%, H 6,15%, N 15,33%, O 22,82%, S 2,13%

Heterodímero de péptido: D6

10 Se reticularon tres densidades de KDR-Fc con la superficie de dextrano de un chip sensor CM5 mediante el procedimiento de acoplamiento de amina convencional (disolución 0,5 mg/ml diluida 1:100 ó 1:50 con acetato 50 mM, pH 6,0). Se activó la célula de flujo 1 y luego se bloqueó para que sirviera como sustracción de referencia. Los niveles de inmovilización final logrados:

15  $R_L$  Fc 2 KDR-Fc = 1607

$R_L$  Fc 3 KDR-Fc = 3001

$R_L$  Fc 4 KDR-Fc = 6319

20 Se realizaron experimentos en tampón PBS (fosfato 5,5 mM, pH 7,65, NaCl 0,15 M) + P-20 al 0,005% (v/v)). Se

diluyó D6 hasta 250 nM en PBS y se realizaron diluciones en serie para producir disoluciones 125, 62,5, 31,3 15,6, 7,8 y 3,9 nM. Se inyectaron todas las muestras por duplicado. Para la asociación, se inyectaron péptidos a 20  $\mu$ l/min durante 12,5 minutos usando el programa Kinject. Tras una disociación de 10 minutos, se separó cualquier péptido restante de la superficie de KDR con una inyección de tipo quickinject de NaOH 50 mM + NaCl 1 M durante 12 s a 75  $\mu$ l/min. Se analizaron los sensogramas usando el software Bioevaluation 3.1 y una ecuación de regresión rectangular doble hiperbólica en SigmaPlot 6.0. Se determinaron las afinidades de unión ( $KD_{AV}$ ) en estado estacionario del heterodímero a las tres densidades de inmovilización de KDR (tabla 7).

Tabla 7. Resumen de parámetros

		$KD_1$ (nM)	$RMax_1$	$KD_{AV}$ (nM)	$RMax_{AV}$	$R^2$
D6	Frente a 1600 RU	46	13,1	1,5	12,6	0,995
	Frente a 3000 RU	25,5	21,2	0,665	22,7	0,991
	Frente a 6000 RU	17	61,3	0,662	62,2	0,993

A partir de estos datos, parece que a las densidades de inmovilización superiores, el heterodímero se une a KDR con una afinidad sub-nanomolar ( $\sim 0,6$  nM).

Para evaluar el aclaramiento *in vivo* de este heterodímero de péptido, se yodó una pequeña cantidad de material usando Iodogen y  $Na^{125}I$  según protocolos convencionales (Pierce). Se realizó radioyodación en el laboratorio de seguridad radiológica, dentro de la campana designada. Se humedeció previamente un tubo recubierto con el reactivo Iodogen con 1 ml de Tris 25 mM, NaCl 0,4 M, pH 7,5. Esto se desechó y se añadieron 100  $\mu$ l del mismo tampón. Usando una jeringa Hamilton, se transfirieron 11  $\mu$ l de  $^{125}I$ -Nal al tubo de reacción. Basándose en las estimaciones originales de la concentración de  $Na^{125}I$  de 143,555 mCi/ml, los 11  $\mu$ l deben contener aproximadamente 1,5 mCi. No había calibrador de dosis en la sala. Tras la adición, se agitó con formación de remolinos la muestra y se fijó en un lingote de plomo para incubarse durante 6 min con una agitación con formación de remolinos cada 30 s. Tras 6 min, se transfirió toda la muestra al péptido que estaba en un tubo Eppendorf. Se agitó con formación de remolinos la muestra y se fijó para su incubación durante 8 min, con una agitación con formación de remolinos cada 30 s. Tras 8 min, se extinguió (terminó) la reacción con tirosina (10 mg/ml, una disolución saturada), se permitió que se asentara durante 5 min, y entonces se retiraron 2  $\mu$ l para obtener un patrón.

Para la purificación, se usó una columna de 10 ml de poliácridamida D-Salt 1800 para separar el péptido marcado de la tirosina marcada. En primer lugar se lavó la columna con 10 ml de solución salina, luego con 5 ml de Tris 25 mM, NaCl 0,4 M, pH 7,5 que contenía HSA al 2,5% para bloquear los sitios no específicos. Tras el lavado con el tampón HSA, se eluyó la columna con 60 ml del tampón Tris 25 mM, NaCl 0,4 M, y se almacenó la columna durante la noche a 4°C. La muestra marcada contenía 1,355 mCi, tal como se determina mediante el calibrador de dosis. La muestra de 2  $\mu$ l que se retiró como patrón contenía 8,8  $\mu$ Ci. Se aplicó la muestra de péptido a la columna D-salt 1800 y se eluyó con el tampón Tris/NaCl, pH 7,5. Se controló el flujo aplicando alícuotas individuales de 0,5 ml para cada fracción, n.º 1-14, y luego 1,0 ml para las fracciones 25-43. Se supuso que el pico de actividad en las fracciones n.º 9, 10 y 11 correspondía al péptido. La radioactividad en de 24 a  $\sim 40$  es probablemente la tirosina marcada. A partir de esta purificación, se combinaron las fracciones n.º 9-12 y se usaron para el estudio de aclaramiento posterior (la concentración de  $^{125}I$ -D6 en la combinación es de 7,023  $\mu$ g/ml; 100  $\mu$ l = 0,702  $\mu$ g con 8,6  $\mu$ Ci).

Se inyectaron a un total de 15 ratones 100  $\mu$ l de  $^{125}I$ -D6 y se sacrificaron los ratones (en conjuntos de 3) en los siguientes puntos de tiempo: 0, 7, 15, 30, 90 minutos. La actividad real inyectada fue de aproximadamente 6  $\mu$ Ci. Con 6  $\mu$ Ci inyectados, el péptido correspondiente administrado fue de  $\sim 0,5$   $\mu$ g por animal. Una vez sacrificados, se determinaron los recuentos en una muestra de plasma de 50  $\mu$ l de cada animal. Para cada conjunto de tres animales en cada punto de tiempo, se obtuvo el promedio de los recuentos, se convirtieron a % de dosis inyectada/ml de plasma (% de DI/ml), y luego se representaron gráficamente para evaluar la tasa de aclaramiento (figura 19). Entonces se ajustaron estos datos a una ecuación de 4 o bien 5 parámetros para determinar la semivida bifásica de esta molécula. El ajuste de 4 parámetros dio como resultado una  $T_{1/2\alpha}$  de 2,55 minutos y una  $T_{1/2\beta}$  de 64,66 minutos. El ajuste de 5 parámetros dio como resultado una  $T_{1/2\alpha}$  de 2,13 minutos y una  $T_{1/2\beta}$  de 23,26 minutos.

Además de tomar recuentos de las muestras de plasma, se tomaron mayores volúmenes de plasma de los ratones sacrificados en los puntos de tiempo de 0, 30 y 90 minutos. Se inyectaron estas muestras en una columna para péptidos Superdex (Pharmacia) acoplada a un detector de radiactividad para evaluar la asociación del péptido con proteínas séricas (figura 20). Tal como se muestra, el péptido marcado sí se asocia con proteínas de PM superior, lo que podría explicar su comportamiento de aclaramiento de semivida bifásica.

Para ayudar a evaluar la potencia del péptido como inhibidor anti-angiogénesis, se sometió a prueba D6 en un ensayo de proliferación de células endoteliales usando HUVEC y detección de BrdU. En resumen, se cultivaron HUVEC recién aisladas (entre p3 - 6) en RPMI + FCS al 10% + antibióticos al 1% + 1-glutamina al 1% + BBE

(extracto de cerebro bovino) al 0,4% y se sembraron por pocillo, 5000-10000/pocillo en 100 µl. Se permitió que las células se recuperaran durante 24 h antes de su uso. Entonces se lavaron las células con PBS dos veces y se trataron durante 48 h con anticuerpo anti-VEGF (control positivo) o péptidos A, B y C (0,1 y 10 µg/ml) en RPMI + BSA al 0,1% + 1-glutamina al 1%. Se sometieron a prueba las 6 variables siguientes en 2 series (n=4):

- 5 Serie I: sin VEGF
- Serie II: con VEGF (30 ng/ml)
- 10 1. Medio patrón: RPMI + FCS al 10% + antibióticos al 1% + 1-glutamina al 1% + BBE al 0,4%
2. Control negativo 1: RPMI (privación verdadera)
- 15 3. Control negativo 2: RPMI + BSA al 0,1% + 1-glutamina al 1%
4. Control positivo: anticuerpo anti-VEGF 10 µg/ml en RPMI +BSA al 0,1% + 1-glutamina al 1%
5. Péptidos KDR 0,1 µg/ml en RPMI + BSA al 0,1% + 1-glutamina al 1%
- 20 6. Péptidos KDR 10 µg/ml en RPMI + BSA al 0,1% + 1-glutamina al 1%
- Protocolo:
- 1) Se incuban las células durante 48 horas en diversas condiciones
- 25 2) Se añaden 10 µl de dilución de BrdU (1:100 en EBM) a cada pocillo a las 24 horas
- 3) Se incuban otras 24 horas (total 48 h)
- 30 4) Se aspira el medio de cultivo
- 5) Se añaden 100 µl de FixDenat a cada pocillo, se incuban a temperatura ambiente durante 30 min
- 6) Se desecha la disolución de FixDenat
- 35 7) Se añaden 100 µl de disolución de anticuerpo (PBS, BSA al 1% y anticuerpo anti-BrdU PO) a cada pocillo
- 8) Se incuba a TA durante 90 minutos
- 40 9) Se lava 3 veces con PBS, 200 µl/pocillo, 5 min
- 10) Se añade disolución de sustrato (TMB), se incuba durante 10-30 minutos
- 45 11) Se transfiere todo a una placa Flexibel
- 12) Se detiene la reacción añadiendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M, 25 µl/pocillo
- 13) Se lee la absorbancia a 450 nm en el plazo de 5 minutos tras detener la reacción.
- 50 Nota: Se determinó la unión de fondo omitiendo el anticuerpo anti-BrdU en 4 pocillos con células control (cultivadas en medio completo; EBM + BulletKit) y mediante el marcaje completo de células que no se expusieron a BrdU.

De los dos constructos de unión a KDR sometidos a prueba (D6 y P12-G (Ac-AGPTWC\*EDDWYYC\*WLFGT-GGGK-NH<sub>2</sub>)) tal como se muestra en la figura 21, D6 inhibe completamente la proliferación de HUVEC a 10 µg/ml en presencia de VEGF, de manera similar a un anticuerpo anti-VEGF (control positivo). Se usó PNC-1 (Ac-AEGTGDHLHCYFPWVCSLDPGPEGGK-OH) (SEQ ID NO: 29) como control negativo. Por otra parte, P12-G (uno de los péptidos que constituyen el heterodímero) no inhibe la proliferación en este ensayo a la concentración superior sometida a prueba (10 µg/ml). Como resultado, el heterodímero muestra claramente una capacidad potenciada para competir con VEGF en comparación con P12-G solo.

### Ejemplo 16

#### Análisis de BIAcore – Unión a KDR-Fc murino de los dímeros de péptido D1 y D7

65 Usando BIAcore, se determinan las constantes de unión de los dímeros de péptido (un heterodímero de P12-G y

una forma truncada de P6-D) y D7 (un heterodímero de P5-D y P6-D) para KDR-Fc murino.

Procedimiento

5 Se reticularon tres densidades de KDR-Fc murino recombinante con la superficie de dextrano de un chip sensor CM5 mediante el procedimiento de acoplamiento de amina convencional (disolución 0,5 mg/ml diluida 1:100 ó 1:40 con acetato 50 mM, pH 6,0). Se activó la célula de flujo 1 y luego se bloqueó para que sirviera como sustracción de referencia. Los niveles de inmovilización final logrados:

10  $R_L$  Fc 2 KDR-Fc = 2770

$R_L$  Fc 3 KDR-Fc = 5085

$R_L$  Fc 4 KDR-Fc = 9265

15 Se realizaron experimentos en tampón PBS (fosfato 5,5 mM, pH 7,65, NaCl 0,15 M) + P-20 al 0,005% (v/v)). Se diluyó P12-G, utilizado como control, hasta 125 nM en PBS. Se realizaron diluciones en serie para producir disoluciones 62,5, 31,3, 15,6, 7,8 y 3,9 nM. Se diluyeron D1 y D7 hasta 50 nM en PBS y se realizaron diluciones en serie para producir disoluciones 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 y 0,39 nM. Se inyectaron todas las muestras por duplicado. Para la asociación, se inyectaron péptidos a 30  $\mu$ l/min durante 3 minutos usando el programa Kinject. Tras una disociación de 10 minutos, se separó cualquier péptido restante de la superficie de rmKDR-Fc con una inyección de tipo quickinject de NaOH 50 mM + NaCl 1 M durante 12 s a 75  $\mu$ l/min.

25 Se analizaron los sensogramas usando el programa de ajuste de  $k_a/k_d$  simultáneo en el software BIAevaluation 3.1. Los resultados se muestran en la tabla 8 y en las figuras 22-24. El hecho de que se logró aproximadamente la misma constante  $K_{D2}$  para ambos heterodímeros incluso cuando la densidad de receptor en el chip sensor se redujo a la mitad estaba de acuerdo con la unión multimérica de los heterodímeros a receptores individuales en vez de con la unión de tipo reticulación entre receptores.

30 Tabla 8. Resumen de parámetros cinéticos

		$k_{a1}$ (1/Ms)	$k_{d1}$ (1/s)	$k_{a2}$ (1/RU)	$k_{d2}$ (1/s)	$KD1^{\#}$ (nM)	$KD2^{\ddagger}$ (nM)	$\chi^2$
D1	Frente a 2700 RU	7,94E+05	0,0139	3,31E-04	5,96E-04	17,5	0,751	0,077
	Frente a 5000 RU	5,54E+05	8,88E-03	1,17E-04	4,57E-04	16,0	0,825	0,323
D7	Frente a 2700 RU	7,59E+05	0,011	3,36E-04	6,44E-04	14,5	0,848	0,082
	Frente a 5000 RU	5,21E+05	7,39E-03	1,17E-04	4,68E-04	14,2	0,898	0,278
P12-G marcado con fluoresceína	Frente a 2700 RU	1,02E+06	0,037	-	-	36,4	-	0,073
	Frente a 5000 RU	5,18E+05	0,0174	-	-	33,6	-	0,167

$^{\#}K_{D1}$  es una  $K_D$  calculada basándose en  $k_{d1}/k_{a1}$

$^{\ddagger}K_{D2}$  es una  $K_D$  calculada basándose en  $k_{d2}/k_{a1}$  (es decir, factor de avidéz)

\*El valor de  $\chi^2$  es una medida estadística convencional de la proximidad del ajuste. Para un buen ajuste a datos ideales,  $\chi^2$  es del mismo orden de magnitud que el ruido del instrumento en RU (normalmente < 2).

35 **Ejemplo 17**

Demostración de la distinción entre afinidad de unión y potencia biológica a través de ensayos *in vitro*

40 Los siguientes experimentos mostraron que los heteromultímeros pueden presentar una potencia biológica mucho mayor que un péptido monomérico don afinidad de unión similar a la misma diana.

Experimento de protocolo 1:

45 Se transfectaron células 293H con el ADNc de KDR o se transfectaron de manera simulada mediante técnicas

convencionales descritas en el ejemplo 6. Se incubaron las células con  $^{125}\text{I}$ -VEGF en presencia o ausencia de PG-1 (Ac-ERVTTCWPGEYGGVECVSVAI-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 30) o D1 (a 300, 30, 3 y 0,3 nM). Tras lavar las células, se cuantificó la radiactividad unida en un contador gamma. Se calculó la inhibición en porcentaje de la unión de VEGF usando la fórmula  $[(Y1 - Y2) \times 100 / Y1]$ , donde Y1 es la unión específica a células 293H transfectadas con KDR en ausencia de péptidos, e Y2 es la unión específica a células 293H transfectadas con KDR en presencia de competidores peptídicos. Se calculó la unión específica a células 293H transfectadas con KDR restando la unión a células 293H transfectadas de manera simulada de la unión a células 293H transfectadas con KDR.

#### Experimento de protocolo 2:

Se colocaron HUVEC privadas de suero, 100.000 células por pocillo, en las cámaras superiores de placas de inserción de 24 pocillos FluoroBlok recubiertas con fibronectina de BD. Se añadió medio basal, con o sin VEGF (10 ng/ml) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de PG-1 o D1, a la cámara inferior de los pocillos. Tras 22 horas, se logró la cuantificación de la migración/invasión celular marcando posteriormente las células en las placas de inserción con un colorante fluorescente y midiendo la fluorescencia de las células que invadían/migraban en un lector de placas para fluorescencia. Se derivó la migración estimulada por VEGF restando la migración basal medida en ausencia de VEGF.

#### Resultados del experimento 1:

Tal como se muestra en la figura 26, PG-1 y D1 compitieron aproximadamente igual de bien con  $^{125}\text{I}$ -VEGF por unirse a células transfectadas con KDR, lo que indica que presentan afinidades de unión comparables así como una capacidad comparable para inhibir que VEGF se una a KDR.

#### Resultados del experimento 2:

Pese al hecho de que tanto PG-1 como D1 bloquean de manera potente la unión de  $^{125}\text{I}$ -VEGF a células que expresan KDR en el mismo grado (figura 26), D1 heterodimérico fue significativamente más potente en bloquear los efectos biológicos de VEGF tal como se demuestra en un ensayo de migración de células endoteliales (figura 27) que PG-1 monomérico. Hasta 62,5 nM, PG-1 no tuvo ningún efecto sobre la migración estimulada por VEGF mientras que D1 bloqueó completamente la migración estimulada por VEGF a 50 nM. Estos datos sugieren que la unión heteromultimérica puede bloquear de manera más eficaz la actividad biológica de un ligando que un monómero, aún cuando el monómero tenga una capacidad comparable para inhibir la unión del ligando a su receptor.

### **Ejemplo 18**

#### Unión de heterodímeros de la invención a marcados con Tc células 293H transfectadas con KDR

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de D10 marcado con Tc para unirse a KDR usando células 293H transfectadas con KDR. Los resultados muestran que D10 marcado con Tc se unió de manera significativamente mejor a células 293H transfectadas con KDR que a células 293H transfectadas de manera simulada, y se mantuvo la buena unión en presencia de suero de ratón al 40%. Además, se mostró que un derivado de D10 marcado con Tc con su secuencia de aminoácidos desordenada, D18, no presenta ninguna afinidad por células que expresan KDR, lo que confirma la especificidad de la unión de D10 a esas células.

#### Síntesis de péptidos marcados con $^{99m}\text{Tc}$

##### Preparación de $^{99m}\text{Tc}$ -D10:

Se disolvió SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (20 mg) en 1 ml de HCl 1 N, y se añadieron 10 µl de esta disolución a 1 ml de una disolución de DTPA que se preparó disolviendo 10 mg de CaNa<sub>2</sub>DTPA·2,5 H<sub>2</sub>O (Fluka) en 1 ml de agua. Se mezcló D10 (100 µg en 100 µl de DMF al 50%) con 75 µl de tampón fosfato 0,1 M, pH 9 y 50 µl de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (de 2,4 a 5 mCi, Syncor), seguido por 100 µl de la disolución estannosa de Sn-DTPA. Tras 15 min a TA, la pureza radioquímica (RCP) fue del 72%. Se purificó el producto en una columna de amida Discovery C16 de Supelco (4 x 250 mm, tamaño de poro de 5 µm) eluida a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min usando un gradiente de fase acuosa/fase orgánica de TFA al 0,1% en agua (A) y TFA al 0,085% en acetonitrilo (B). Se usó el siguiente gradiente: del 30% de B al 42% de B en 36 min, aumento hasta el 70% de B en 10 min. Se recogió el compuesto, que eluyó a un tiempo de retención de 32 min, en 500 µl de tampón citrato 50 mM (pH 5,2) que contenía HSA al 0,2%, y se eliminó el acetonitrilo usando un aparato Speed Vacuum (Savant). Tras la purificación, el compuesto tenía una RCP >90%.

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

Se disolvió SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (20 mg) en 1 ml de HCl 1 N, y se añadieron 10 µl de esta disolución a 1 ml de una disolución de DTPA que se preparó disolviendo 10 mg de CaNa<sub>2</sub>DTPA·2,5 H<sub>2</sub>O (Fluka) en 1 ml de agua. Se mezcló D18 (100 µg en 100 µl de DMF al 50%) con 50 µl de tampón fosfato 0,1 M, pH 9 y 90 µl de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (14 mCi, Syncor), seguido

5 por 100 µl de la disolución estannosa de Sn-DPTA. Se calentó la reacción durante 20 minutos a 37°C. Se inyectó toda la reacción en una columna 218TP54 C18 de Vydac (4,6 x 250 mm, sílice de 5 µm) y se eluyó a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min usando un gradiente de fase acuosa/fase orgánica de TFA al 0,1% en agua (A) y TFA al 0,085% en acetonitrilo (B). Se usó el siguiente gradiente: del 32% al 39% de B en 30 minutos, aumento hasta el 80% de B en 2 min. El ligando libre eluyó a un tiempo de retención de 19 minutos. Se recogió el complejo, que eluyó a 24 minutos, en 500 µl de tampón citrato 50 mM (pH 5,3) que contenía HSA al 0,1% y ácido ascórbico al 1%. Se eliminaron el acetonitrilo y el TFA en exceso usando un aparato Speed Vacuum (Savant) durante 40 minutos. Tras la purificación, el compuesto tenía una RCP de 93%.

#### 10 Transfección de células 293H

15 Se transfectaron células 293H usando el protocolo descrito en el ejemplo 6. Se realizó la transfección en placas de 96 pocillos negras/transparentes (Becton Dickinson, n.º de cat. 354640). Las células en una mitad de la placa (48 pocillos) se transfectaron de manera simulada (sin ADN) y las células de la otra mitad de la placa se transfectaron con ADNc de KDR. Las células eran confluentes al 80-90% en el momento de la transfección y completamente confluentes al día siguiente, en el momento del ensayo; de lo contrario se abortó el ensayo.

#### Preparación de medios opti-MEMI con HSA al 0,1%

20 Se obtuvo Opti-MEMI de Invitrogen (n.º de cat. 11058-021) y se obtuvo albúmina sérica humana (HSA) de Sigma (n.º de cat. A-3782). Para preparar medios opti-MEMI con HSA al 0,1%, se añadió el 0,1% p/v de HSA a opti-MEMI, se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos, y después se esterilizó por filtración usando un filtro de 0,2 µm.

#### Preparación de diluciones de péptido marcado con Tc para el ensayo

25 Se diluyeron disoluciones madre de D10 y D18 marcados con Tc en opti-MEMI con HSA al 0,1% para proporcionar disoluciones con concentraciones finales de 1,25, 2,5, 5,0 y 10 µCi/ml de cada heterodímero marcado con Tc. También se preparó un segundo conjunto de diluciones usando una mezcla de suero de ratón al 40%/opti-MEMI al 60% con HSA al 0,1% como diluyente.

#### 30 Ensayo para detectar la unión de los heterodímeros marcados con Tc

35 Se usaron células 24 h tras la transfección, y para preparar las células para el ensayo, se lavaron 1 vez con 100 µl de opti-MEMI con HSA al 0,1% a temperatura ambiente. Tras el lavado, se eliminó el opti-MEMI con HSA al 0,1% de la placa y se sustituyó por 70 µl de 1,25, 2,5, 5,0 y 10 µCi/ml de D10 o D18 marcados con Tc (preparados como anteriormente con ambas disoluciones de diluyente). Se añadió cada dilución a tres pocillos separados de células transfectadas de manera simulada y con KDR. Tras incubar a temperatura ambiente durante 1 h, se lavaron las placas 5 veces con 100 µl de tampón de unión frío (opti-MEMI con HSA al 0,1%). Se añadieron 100 µl de disolución de solubilización (NaOH 0,5 N) a cada pocillo y se incubaron las placas a 37°C durante 10 minutos. Se mezcló la disolución de solubilización en cada pocillo aspirando y devolviendo con pipeta, y se transfirió a tubos de 1,2 ml. Se lavó cada pocillo una vez con 100 µl de disolución de solubilización y se añadieron los lavados al tubo de 1,2 ml correspondiente. Después se transfirió cada tubo de 1,2 ml a un tubo de 15,7 mm X 10 cm para contarse en un contador gamma de LKB.

#### 45 Unión de heterodímeros marcados con Tc a células transfectadas con KDR

50 Se demostró la capacidad de D10 y D18 marcados con Tc para unirse específicamente a KDR usando células 293H transfectadas de manera transitoria. Tal como se muestra en la figura 28A, D10 marcado con Tc se unió de manera significativamente mejor a células 293H transfectadas con KDR, en comparación con células 293H transfectadas de manera simulada tanto en presencia como en ausencia de suero de ratón al 40%, aunque hubo algo de inhibición en presencia de suero. La unión específica total de este heterodímero marcado con Tc a células que expresan KDR fue mucho mayor que la observada anteriormente con un péptido monomérico marcado con Tc (ejemplo 5). D18 marcado con Tc, por otra parte, no mostró ninguna afinidad por células 293H ni transfectadas de manera simulada ni transfectadas con KDR, lo que confirma la especificidad de la unión de D10.

#### 55 **Ejemplo 19**

#### Unión de heterodímeros marcados con Lu a células 293H transfectadas con KDR

60 En este ejemplo, se evaluó la capacidad de D13 marcado con Lu para unirse a KDR usando células 293H transfectadas con KDR. Los resultados muestran que D13 marcado con Lu se unió de manera significativamente mejor a células 293H transfectadas con KDR que a células 293H transfectadas de manera simulada, y se mantuvo la buena unión en presencia de suero de ratón al 40%.

#### 65 Síntesis de péptido marcado con <sup>177</sup>Lu

Preparación de  $^{177}\text{Lu}$ -D13:

5 Se añadió D13 (306  $\mu\text{g}$ ) a un vial de inyector automático de 2 ml con un inserto cónico de  $\sim 450 \mu\text{l}$  y se disolvió en  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,01 N (50  $\mu\text{l}$ ). A esto se le añadieron 300  $\mu\text{l}$  de estabilizadores que contenían acetato de amonio 0,5 M. Se añadió una alícuota de 6,8  $\mu\text{l}$  de  $^{177}\text{LuCl}_3$  en  $\text{HCl}$  0,05 N (39,3 mCi), se cerró el vial mediante un sello prensado, se calentó durante 15 min a  $37^\circ\text{C}$ , se enfrió durante  $\sim 5$  minutos y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 1% en  $\text{H}_2\text{O}$ . Se inyectó una alícuota de 350  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción en una columna de amida Discovery RP C16 de Supelco (4 mm x 250 mm x 5  $\mu\text{m}$ ). Se usaron las siguientes condiciones de HPLC: Temperatura de la columna =  $37^\circ\text{C}$ , Disolvente A =  $\text{H}_2\text{O}$  que contenía tampón  $\text{NH}_4\text{OAc}$  2 g/l, pH 7,0, Disolvente B = 80% de ACN/20% de  $\text{H}_2\text{O}$ , gradiente de 0,56/0,24 ml/min de A/B a t = 0 minutos a 0,47/0,33 ml/min de A/B a t = 30 minutos. El tiempo de retención para D13 fue de  $\sim 28$  minutos; el tiempo de retención para  $^{177}\text{Lu}$ -D13 fue de  $\sim 29$  minutos. Se recogió el pico radiactivo en 1 ml de un tampón que contenía estabilizadores, pH final = 7,6 ajustado con hidróxido de sodio. Entonces se centrifugó  $\sim 40$  minutos usando un aparato Speed Vacuum (Savant) para eliminar el ACN. La RCP del producto aislado fue del 86%.

Transfección de células 293H

20 Se transfectaron células 293H usando el protocolo descrito en el ejemplo 6. Se realizó la transfección en placas de 96 pocillos negras/transparentes (Becton Dickinson, n.º de cat. 354640). Las células en una mitad de la placa (48 pocillos) se transfectaron de manera simulada (sin ADN) y las células de la otra mitad de la placa se transfectaron con ADNc de KDR. Las células eran confluentes al 80-90% en el momento de la transfección y completamente confluentes al día siguiente, en el momento del ensayo; de lo contrario se abortó el ensayo.

25 Preparación de medios opti-MEMI con HSA al 0,1%

Se prepararon medios opti-MEMI con HAS al 0,1% como en el ejemplo 18.

30 Preparación de diluciones de péptido marcado con Lu para el ensayo

Se diluyó una disolución madre de D13 marcado con Lu en opti-MEMI con HSA al 0,1% para proporcionar disoluciones con concentraciones finales de 1,25, 2,5, 5,0 y 10  $\mu\text{Ci/ml}$  de heterodímero marcado. También se preparó un segundo conjunto de diluciones usando una mezcla de suero de ratón al 40%/opti-MEMI al 60% con HSA al 0,1% como diluyente.

35 Ensayo para detectar la unión de los heterodímeros marcados con Lu

Esto se llevó a cabo tal como se detalló en el ejemplo 18, excepto que se usó D13 marcado con Lu en lugar de los heterodímeros marcados con Tc.

40 Unión del heterodímero marcado con Lu a células transfectadas con KDR

Se demostró la capacidad de D13 marcado con Lu para unirse específicamente a KDR usando células 293H transfectadas de manera transitoria. Tal como se muestra en la figura 29, D13 marcado con Lu se unió de manera significativamente mejor a células 293H transfectadas con KDR, en comparación con células 293H transfectadas de manera simulada tanto en presencia como en ausencia de suero de ratón al 40%, aunque hubo algo de inhibición de unión en presencia de suero.

50 **Ejemplo 20**55 Radioterapia con heterodímeros marcados con Lu en ratones portadores de tumores.

En este ejemplo, se demuestra la capacidad de D13 marcado con Lu para inhibir el crecimiento de tumores de células PC3 implantados en ratones desnudos.

60 Síntesis de D13 marcado con  $^{177}\text{Lu}$ 

Se preparó D13 marcado con  $^{177}\text{Lu}$  tal como se describió en el ejemplo 19.

65 Modelo animal

Se inyectaron por vía subcutánea células PC3 de ATCC, que se hicieron crecer tal como recomienda el proveedor, entre los omóplatos de ratones desnudos. Cuando sus tumores alcanzaron 100-400  $\text{mm}^3$ , se inyectaron por vía intravenosa a doce ratones 500 microcurios de D13 marcado con Lu y se monitorizó su crecimiento durante 18 días adicionales. Se sacrificaron los ratones si perdían el 20% o más de su peso corporal o sus tumores superaban 2000

mm<sup>3</sup>. Se comparó el crecimiento tumoral en los ratones tratados con el crecimiento tumoral promedio en 37 ratones desnudos no tratados a los que se implantaron tumores de PC3.

Resultados

5 En 6 de los 12 ratones tratados en el estudio, los tumores experimentaron un retraso del crecimiento significativo o completo (figura 30) en relación con los ratones con tumores no tratados, lo que indica que D13 fue eficaz en ralentizar el crecimiento tumoral de PC3 en las condiciones empleadas.

10 **Ejemplo 21**

Ensayo basado en células para determinar la unión de elementos de unión a complejo KDR/VEGF

15 En este experimento se demuestra la capacidad de un péptido de unión a complejo KDR/VEGF para unirse selectivamente al complejo KDR/VEGF.

Preparación de reactivos

20 Los reactivos para este ensayo se prepararon tal como se describió en el ejemplo 5, excepto cuando se indique.

Preparación de disolución de complejo péptido-<sup>125</sup>I-estreptavidina

25 Se usaron péptidos biotinilados P30-XB, P31-XB, P32-XB y un péptido control de no unión biotinilado para preparar disoluciones madre 1,25 µM en DMSO al 50%. Se adquirió una disolución madre 33,33 nM de <sup>125</sup>I-estreptavidina de Amersham. Se preparó a disolución madre de <sup>125</sup>I-estreptavidina 13,33 nM /VEGF 100 nM mezclando 850 µl de <sup>125</sup>I-estreptavidina con 22 µl de VEGF 10 µM y 1275 µl de medios M199. Se preparó otra disolución madre de la misma manera, pero que carecía de VEGF. Para preparar la disolución de complejo péptido-<sup>125</sup>I-estreptavidina 13,33 nM ± VEGF, se mezclaron 500 µl de las disoluciones madre de <sup>125</sup>I-estreptavidina (con y sin VEGF) (preparadas en la última etapa) con 24 µl de disolución de péptido 1,25 µM de P30-XB, P31-XB, P32-XB, o péptido control. Se incubaron las mezclas en un dispositivo rotatorio a 4°C durante 60 minutos, seguido por la adición de 50 µl de avidina-Sepharose de liberación suave (suspensión al 50% en ddH<sub>2</sub>O) para eliminar los péptidos en exceso y otra incubación durante 30 minutos en un dispositivo rotatorio a 4°C. Finalmente, se sedimentó la avidina-Sepharose de liberación suave mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se usaron los sobrenadantes resultante para los ensayos.

35 Tabla 9. Péptidos biotinilados

Número de referencia	Estructura o secuencia	SEQ ID NO.
P30	AGPGPCKGYMPHQCWYMGTTGGGK	31
P30-XB	Ac-AGPGPCKGYMPHQCWYMGTTGGGK(Biotina-JJ)-NH <sub>2</sub>	
P31	AGMPWCVEKDHWDWWTGGGK	32
P31-XB	Ac-AGMPWCVEKDHWDWWTGGGK(Biotina-JJ)-NH <sub>2</sub>	
P32	AGYGPCKNMPPWMCWHEGTGGGK	33
P32-XB	Ac-AGYGPCKNMPPWMCWHEGTGGGK(Biotina-JJ)-NH <sub>2</sub>	

40 En este ensayo, se sometieron a prueba complejos de péptido control y péptidos de prueba (P30-XB, P31-XB, P32-XB) con <sup>125</sup>I-estreptavidina en presencia o ausencia de VEGF (preparados como anteriormente) para determinar su capacidad para unirse a células 293H que se transfectaron de manera transitoria con KDR. El complejo de P30-XB con <sup>125</sup>I-estreptavidina se unió específicamente a células 293H transfectadas con KDR en comparación con células transfectadas de manera simulada en presencia de VEGF (figura 31A), pero no cuando se omitió VEGF (figura 31B). P30-XB también fue el mejor elemento de unión a complejo KDR/VEGF entre los péptidos sometidos a prueba usando ensayos de polarización de fluorescencia y SPR (BiaCore). Este ejemplo muestra que el péptido (P30-XB) puede unirse específicamente al complejo KDR/VEGF presente en la superficie celular. Por tanto, puede usarse posiblemente para seleccionar como diana el complejo KDR/VEGF *in vitro* e *in vivo* para fines diagnósticos o terapéuticos. Puesto que el péptido de unión a KDR/VEGF sólo detecta el receptor KDR funcional y activo y no todos los KDR presentes en la superficie celular, puede ser útil en la detección y/o el tratamiento de angiogénesis activa en tumores, metástasis, retinopatía diabética, psoriasis y artropatías. Además, estos péptidos, así como otros péptidos que se unen al complejo KDR/VEGF, pueden incluirse ventajosamente en heteromultímeros de la invención.

**Ejemplo 22**

El siguiente experimento evaluó la capacidad de heterodímeros D24 y D26 para bloquear la migración inducida por

VEGF de HUVEC en cultivo y demostró que la glicosilación añadida y/o la estructura de espaciador distinta usada en D26 mejoraba su potencia.

Protocolo:

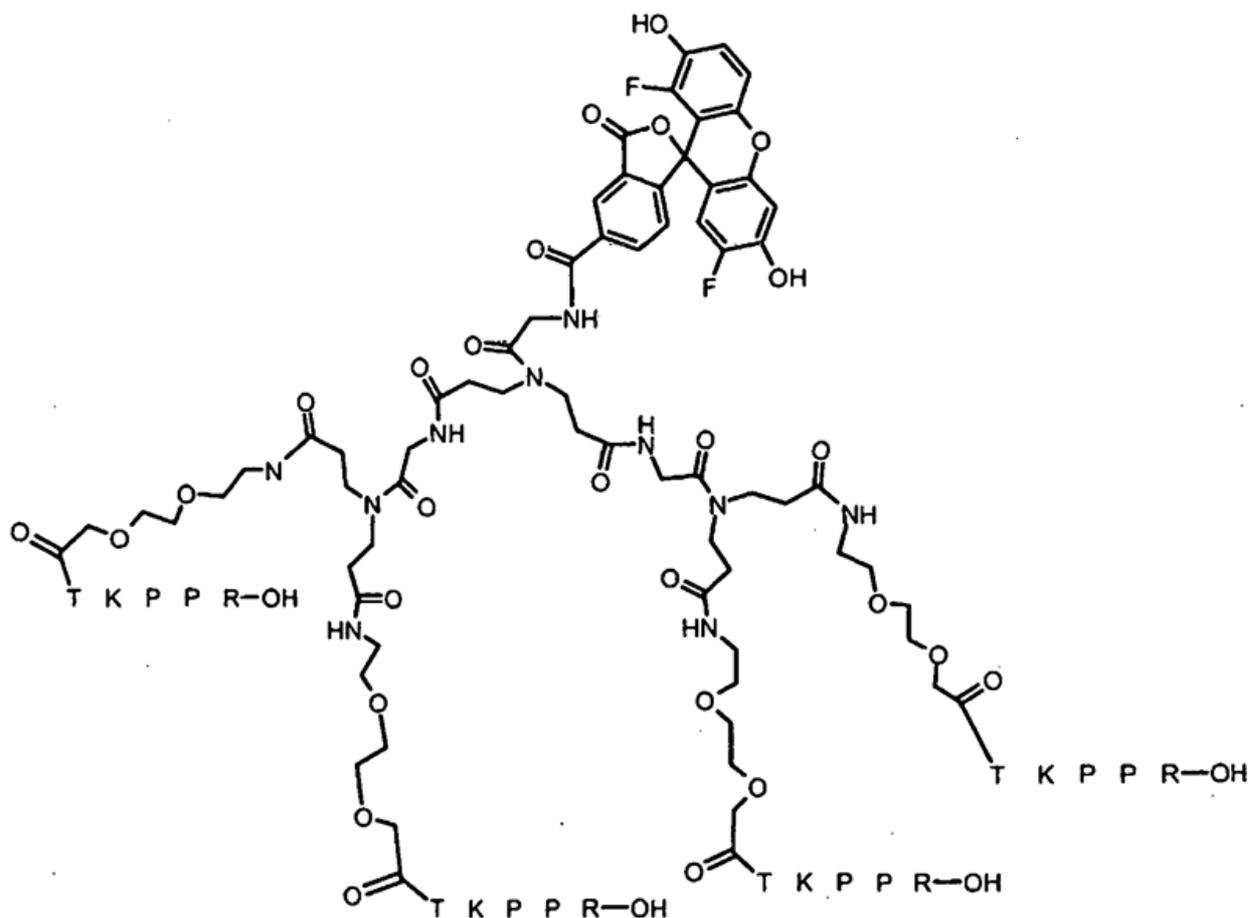
5 Se colocaron HUVEC privadas de suero, 100.000 células por pocillo, en las cámaras superiores de placas de inserción de 24 pocillos FluoroBlok recubiertas con fibronectina de BD. Se añadió medio basal, con o sin VEGF (10 ng/ml) en presencia o ausencia de D24 o D26, a la cámara inferior de los pocillos. Tras 22 horas, se logró la  
10 cuantificación de la migración/invasión celular marcando posteriormente las células en las placas de inserción con un colorante fluorescente y midiendo la fluorescencia de las células que invadían/migraban en un lector de placas para fluorescencia. Se calculó la migración inducida por VEGF para cada condición experimental restando la cantidad de migración que se producía cuando sólo se añadió medio basal a la cámara inferior de los pocillos.

Resultados:

15 VEGF indujo un gran aumento en la migración de células endoteliales en el ensayo, que se bloqueó de manera potente tanto por D24 como por D26 (figura 32). D26 fue diez veces más potente que D24 ( $CI_{50}$  de 0,5 nM y 5 nM respectivamente), lo que indica que la glicosilación de D26 y/o sus propiedades de espaciador distintas han  
20 potenciado su capacidad para unirse a KDR y bloquear los efectos de VEGF.

### Ejemplo 23

El siguiente experimento evaluó la capacidad de TK-1 (estructura proporcionada a continuación), un constructo multimérico del péptido TKPPR (que se une a NP-1, un receptor de VEGF que potencia los efectos de VEGF  
25 mediados por KDR), para potenciar la inhibición de la migración inducida por VEGF de HUVEC en cultivo producida por D6.



**5CF-Gly-N{[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-Gly-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-Adoa-Thr-Lys-Pro-Pro-Arg-OH]<sub>2</sub>}**  
**en la que Adoa = 3,6-dioxa-8-amiooctanoilo, 5CF = 5-carboxifluoresceinilo**

### TK-1

Protocolo:

- 5 Se colocaron HUVEC privadas de suero, 100.000 células por pocillo, en las cámaras superiores de placas de inserción de 24 pocillos FluoroBlok recubiertas con fibronectina de BD. Se añadió medio basal, con o sin VEGF (10 ng/ml) en presencia o ausencia de concentraciones variables de D6, o concentraciones variables de D6 en combinación con TK-1 10 nM constante (sintetizado tal como se describe en el documento WO 01/91805 A2) a la cámara inferior de los pocillos. Tras 22 horas, se logró la cuantificación de la migración/invasión celular marcando posteriormente las células en las placas de inserción con un colorante fluorescente y midiendo la fluorescencia de las células que invadían/migraban en un lector de placas para fluorescencia. Se calculó la migración inducida por VEGF para cada condición experimental restando la cantidad de migración observada en ausencia de VEGF.

Resultados:

- 15 VEGF indujo un gran aumento en la migración de células endoteliales en el ensayo, que se bloqueó de manera potente por D6 (CI<sub>50</sub> de aproximadamente 12,5 nM), pero no por TK-1 100 nM solo (figura 33). Sorprendentemente, sin embargo, TK-1 pudo mejorar la potencia de D6 en aproximadamente 10 veces cuando se usó en el ensayo simultáneamente con D6 (CI<sub>50</sub> de aproximadamente 2,5 nM). Esto indica que los compuestos que contienen la secuencia TKPPR (o análogas) encontrada en TK-1 pueden usarse para mejorar la potencia de determinados compuestos tales como D6 que compiten con VEGF por unirse a KDR. Además, un heteromultímero que contiene las secuencias peptídicas encontradas en D6 (o similares) así como la secuencia TKPPR (o análogas), en una o más repeticiones, presentará probablemente actividad potenciada en este ensayo. (Véase el documento U.S.S.N.

09/871.974 para obtener detalles sobre la preparación de constructos de TKPPR).

**Ejemplo 24**

5 Identificación de fragmentos de P13-XB con actividad de unión a KDR

El siguiente experimento mostró que fragmentos de P13-XB pueden mantener actividad de unión a KDR significativa.

10 Protocolo:

Se transfectaron células 293H con el ADNc de KDR o se transfectaron de manera simulada mediante técnicas convencionales descritas en el ejemplo 6. Se prepararon complejos estreptavidina-HRP que contenían P12-XB como en el ejemplo 6. Se llevó a cabo la unión de los complejos estreptavidina-HRP a las células como en el ejemplo 6 con una concentración de complejo de 5,5 nM en presencia de 0 a 250 nM o de 0 a 1000 nM de los siguientes péptidos de competencia: P13-XB, F1, F2, y F3. Tras determinar la unión específica en cada condición experimental, se determinó la  $CI_{50}$  para cada péptido (cuando fue posible).

20 Resultados:

Tal como se muestra en la tabla 9, F1, compuesto sólo por el motivo de unión Asp-Trp-Tyr-Tyr que también se comparte con P12-XB junto con la secuencia Gly-Gly-Gly-Lys no seleccionada como diana que se añadió a la mayoría de los péptidos monoméricos sintetizados basándose en datos de presentación en fagos, fue el fragmento más pequeño que podía bloquear la unión a complejo P12-XB-estreptavidina-HRP con una  $CI_{50}$  por debajo de uno micromolar. Sorprendentemente, un fragmento más grande derivado de P13-XB, F2, no inhibió significativamente la unión a complejo a uno micromolar. Sin embargo, cuando se añadió un motivo de solubilización, (Gly-Arg-Gly)<sub>3</sub>, a este último péptido para obtener F3, pudo competir con el complejo por unirse con una  $CI_{50}$  de 175 nM, lo que confirma que determinados fragmentos de P13-XB que contienen el motivo Asp-Trp-Tyr-Tyr conservan la actividad de unión a KDR. Estos fragmentos (u otros fragmentos de los polipéptidos de unión dados a conocer en el presente documento), que conservan la capacidad unirse a la diana, pueden utilizarse en lugar del péptido de longitud completa en los heteromultímeros de la invención.

Tabla 9. Fragmentos de P13-XB en un ensayo de desplazamiento que compite con un complejo compuesto por P12-XB y estreptavidina-HRP por unirse a células que expresan KDR

Número de ref.	Secuencia/Estructura	$CI_{50}$ , nM	SEQ ID NO:
P13-XB	Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGG-GGGK-(Biotina-JJ)-NH <sub>2</sub>	93	--
F1	Ac-DWYYGGGK-NH <sub>2</sub>	850	34
F2	Ac-AQDWYYDEIL-NH <sub>2</sub>	>1000	35
F3	Ac-AQDWYYDEILJGRGRGGG-NH <sub>2</sub>	175	36

35 **Ejemplo 25**

Los heterodímeros que seleccionan como diana dos epítopos en una única molécula diana dan como resultado una unión superior a la de homodímeros que se unen a uno de los dos epítopos en la molécula diana.

El siguiente experimento proporciona una evidencia adicional de que los constructos heterodiméricos son superiores a los homodímeros en su capacidad para bloquear los efectos biológicos de un factor de crecimiento de péptidos o citocina.

45 Protocolo:

Se colocaron HUVEC privadas de suero, 100.000 células por pocillo, en las cámaras superiores de placas de inserción de 24 pocillos FluoroBlok recubiertas con fibronectina de BD. Se añadió medio basal, que contenía o bien nada o bien VEGF en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de D8 homodimérico o D17 heterodimérico, a la cámara inferior de los pocillos. Tras 22 horas, se logró la cuantificación de la migración/invasión celular marcando posteriormente las células en las placas de inserción con un colorante fluorescente y midiendo la fluorescencia de las células que invadían/migraban en un lector de placas para fluorescencia.

55 Resultados:

VEGF indujo un gran aumento en la migración de células endoteliales en el ensayo, que se bloqueó de manera potente por D17 pero no por D8 (figura 34). D17 bloqueó la migración inducida por VEGF con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 250 nM mientras que D8 no tuvo ningún efecto significativo sobre la migración incluso a 800 nM.

- 5 Esto es pese al hecho de que D8 usó la secuencia de direccionamiento completa encontrada en P13-XB mientras que D17 contenía la versión truncada de la secuencia de P13-XB (tal como se observa en F3) con una afinidad inferior por KDR (tal como se demostró en el ejemplo 24). Por tanto, un heterodímero con capacidad de unirse a dos epítopos separados en la misma molécula diana puede ser más eficaz en el bloqueo de la unión del ligando a la molécula diana que un homodímero que contiene la misma secuencia de direccionamiento o incluso secuencias de direccionamiento más potentes.

### Ejemplo 26

- 10 Preparación de péptidos cíclicos en los que el enlace disulfuro se sustituye por un enlace amida

- 15 Se prepararon análogos de sustitución de enlace disulfuro de P12-G (P12 con secuencia GGGK no diana) en los que los residuos de Cys en la posición 6 y 13 se sustituyen por un par de aminoácidos, uno con una cadena lateral que porta carboxilo (o bien Glu o bien Asp) y el otro con una cadena lateral que porta amino [(Lys o Dpr (ácido 2,3-diaminopropanoico)]. El ciclo, que engloba las mismas posiciones de secuencia que las incluidas en p12-G (obtenidas mediante la formación del enlace disulfuro) se obtuvo mediante la condensación de los restos amino de cadena lateral y ácido de cadena lateral, dando como resultado un anillo de lactama que forma un puente con los residuos 6-13 como lo hace el enlace disulfuro de P12-G.

- 20 Tabla 10. Ejemplos de las sustituciones obtenidas para Cys<sup>6</sup> y Cys<sup>13</sup> de P12-G en análogos de lactama

Análogos de lactama de P12					
N.º de ref.	Secuencia o estructura	SEQ ID NO	Posición 6	Posición 13	Diferencia en tamaño de anillo frente a P12
P12-G (sec. original)	AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK	29	Cys	Cys	--
P33	AGPTWEEDDWYYKWLFGTGGGK	37	Glu	Lys	--
P33-L	Ac-AGPTWEEDDWYYKWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> (6-13 lactama)		Glu	Lys	4
P34	AGPTWKEDDWYYEWLFGTGGGK	38	Lys	Glu	--
P34-L	Ac-AGPTWKEDDWYYEWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> (6-13 lactama)		Lys	Glu	4
P35	AGPTW-Dpr-EDDWYYDWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	39	Dpr	Asp	--
P35-L	Ac-AGPTW-Dpr-EDDWYYDWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> (6-13 lactama)		Dpr	Asp	0
P36	AGPTWDEDDWYY-Dpr-WLFGTGGGK	40	Asp	Dpr	--
P36-L	Ac-AGPTWDEDDWYY-Dpr-WLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> (6-13 lactama)		Asp	Dpr	0
P37	AGPTWDEDDWYYKWLFGTGGGK	41	Asp	Lys	--
P37-L	Ac-AGPTWDEDDWYYKWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> (6-13 lactama)		Asp	Lys	3

Síntesis representativa de péptidos de lactama cíclicos - P33-L



#### Síntesis de péptido unido a resina 1

- 5 Se llevó a cabo la síntesis de 1 usando el método 5 en una escala de 0,25 mmol. Se lavó el péptido-resina 1 y se secó para su derivatización adicional de manera manual.

#### Síntesis de 4 P33-L

- 10 A 1 (240 mg, 0,06 mmol) se le añadió NMM (N-metilmorfolina)/HOAc/DMF 1/2/10 (v/v/v) (65 ml). Se añadió tris-trifenilfosfina de paladio [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 554,4 mg, 0,48 mmol] y se agitó la resina durante 20 h protegida de la luz. Se filtró la resina y se lavó con una disolución de dietilditiocarbamato de sodio (0,5 g)/DIEA (0,5 ml)/DMF (100 ml), y finalmente con DMF (3 x 70 ml). Este tratamiento sirvió para exponer sólo los grupos carboxilo y amino de Glu6 y Lys13 que se requieren para la reacción de formación de lactama. Se llevó a cabo la ciclación en resina de 2 usando HATU (114 mg, 0,3 mmol), NMM (66 µl, 0,6 mmol) y DMF (10 ml) durante 3 h. Se monitorizó que se completó la ciclación mediante la prueba de Kaiser. Se escindió el péptido del péptido-resina 3 usando el reactivo B durante 4 h. Se filtró la resina y se evaporó el filtrado hasta obtener una pasta. Se precipitó el péptido en bruto en éter y se lavó dos veces con éter. Se purificó el péptido cíclico mediante HPLC preparativa de fase inversa con gradiente lineal usando una columna C-18 de Waters-YMC (250 mm x 30 mm de d.i.) con CH<sub>3</sub>CN en H<sub>2</sub>O (ambos con TFA al 0,1%) como eluyente. La liofilización de las fracciones que contienen el producto proporcionó 8 mg de (P33-L). Se prepararon P34-L, P35-L, P36-L y P37-L de manera similar.

#### Sustitución del puente disulfuro de P12-G mientras que se mantiene la actividad de unión a KDR

- 25 El siguiente experimento demostró que la lactama P34-L, que sustituyó el puente disulfuro químicamente reactivo de P12-G, mantenía una actividad de unión a KDR significativa.

#### Protocolo:

- 30 Se transfectaron células 293H con el ADNc de KDR o se transfectaron de manera simulada mediante técnicas

convencionales descritas en el ejemplo 6. Se prepararon complejos estreptavidina-HRP que contenían P12-XB como en el ejemplo 6. Se llevó a cabo la unión de los complejos estreptavidina-HRP a las células como en el ejemplo 6 con una concentración de complejo de 5,5 nM en presencia de P12-G de 0 a 250 nM, o P34-L. Tras determinar la unión específica en cada condición experimental, se determinó la  $CI_{50}$  para cada péptido.

5

Resultados:

Tal como se muestra en la tabla 11, P34-L, que contenía una sustitución de puente disulfuro por lactama, todavía podía competir con complejos P12-XB-estreptavidina-HRP por unirse a KDR aunque se perdió algo de afinidad ( $CI_{50}$  de 108 nM frente a 13 nM para P12-G). Estos péptidos de lactama (o análogos de lactama preparados de manera similar de polipéptidos de unión dados a conocer en el presente documento) pueden utilizarse en lugar de los péptidos que contienen puente disulfuro en los heteromultímeros de la invención.

10

Tabla 11. P12-G y P34-L (análogo de sustitución de puente disulfuro) en un ensayo de desplazamiento que compite con un complejo compuesto por P12-XB y estreptavidina-HRP por unirse a células que expresan KDR

15

Fragmento (número de ref.)	$CI_{50}$ , nM
P12-G	13
P34-L	108

### Ejemplo 27

#### Medición de unión de dímeros de péptido a cMet

20

Usando una máquina de BIAcore, se determinó la constante de unión para la unión del dímero D28 a cMet-Fc inmovilizado.

#### Procedimiento

25

Se reticularon tres densidades de cMet-Fc (R&D Systems) con la superficie de dextrano de un chip sensor CM5 mediante el procedimiento de acoplamiento de amina convencional (disolución 3  $\mu$ M diluida 1:100, 1:50 ó 1:20 con acetato 50 mM, pH 6,0). Se activó la célula de flujo 1 y luego se bloqueó para que sirviera como sustracción de referencia. Los niveles de inmovilización final logrados:

30

$R_L$  Fc 2 cMet-Fc = 2582

$R_L$  Fc 3 cMet-Fc = 5048

35

$R_L$  Fc 4 cMet-Fc = 9721

Se realizaron experimentos en tampón PBST (fosfato 5,5 mM, pH 7,65, NaCl 0,15 M) + Tween- 20 al 0,05% (v/v). Se disolvieron los dímeros de péptido en  $H_2O$  desionizada para obtener disoluciones 1 mg/ml. Se diluyeron los dímeros hasta 50 nM en PBS. Se realizaron diluciones en serie para producir disoluciones 25, 12,5, 6,25 y 3,125 nM. Se inyectaron todas las muestras por duplicado. Para la asociación, se inyectaron dímeros a 30  $\mu$ l/minuto durante 3 minutos usando el programa Kinject. Tras una disociación de 10 minutos, se separó cualquier péptido restante de la superficie de cMet con dos inyecciones de tipo quickinject de  $MgCl_2$  4 M durante 2 minutos a 50  $\mu$ l/minuto. Se analizaron los sensogramas usando el software Bioevaluation 3.1.

40

Se obtuvo el valor de  $K_d$  de 0,79 nM para D28 (heterodímero de P26-A y P27-X), que era significativamente mejor que el valor de  $K_D$  de cualquiera de los heterodímeros solo.

45

### Ejemplo 28

#### Ensayo de proliferación celular *in vitro*

50

Se usaron células endoteliales microvasculares (MVEC, Cascade Biologics, Portland, OR) para evaluar la eficacia *in vitro* de D6 y análogos relacionados en cuanto a su capacidad para inhibir la proliferación estimulada por VEGF. Se hicieron crecer MVEC (pase 2) hasta el 90% de confluencia, se sometieron a tripsinización y se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con gelatina a una densidad de  $4-8 \times 10^3$  células/pocillo. De dieciséis a 24 horas tras la siembra en placa, se lavaron las células una vez (200  $\mu$ l/pocillo) con medios desprovistos de suero bovino fetal pero que contenían albúmina sérica bobina al 0,1% (BSA). Se añadieron medios que contenían BSA recién preparados a cada pocillo y se incubaron las células durante 24 horas adicionales. Tras este periodo de 24 horas de privación, se añadieron medios que contenían BSA recién preparados con o sin D6 u otras sustancias de prueba y se incubaron las células durante 48 horas adicionales a 37°C. Se eliminaron los medios y se añadieron medios que contenían BSA recién preparados con o sin BrdU y se incubaron las células durante 24 horas

55

60

adicionales antes de determinar el nivel de incorporación exactamente tal como se describe por el fabricante (Oncogene, n.º de cat. QIA58). Los resultados se muestran en la figura 35.

### Ejemplo 29

5

#### Inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral

Se describen las condiciones que proporcionan métodos para determinar la eficacia de tres (3) concentraciones para un compuesto de prueba (dímero D6) que se sospecha que tiene actividad anti-angiogénica sobre células de carcinoma de colon humano SW-480 usando un modelo tumoral de xenoinjerto *in vivo*.

10

Los ratones desnudos atímicos son huéspedes aceptables para el crecimiento de células alogénicas y heterogénicas. Se requieren ratones desnudos en puntos a tener en cuenta para la caracterización de líneas celulares para producir productos biológicos (Points to Consider in the Characterization of Cell Lines used to Produce Biologicals, FDA 1993).

15

D6 es un péptido heterodimérico sintético que se sospecha que tiene actividad anti-angiogénica. Este péptido se une al receptor 2 de VEGF humano (KDR) con alta afinidad y compite con la unión a VEGF. Los siguientes experimentos confirman su actividad anti-angiogénica.

20

#### Células de carcinoma humano SW-480

Se cultivaron células de carcinoma de colon, SW-480, (ATCC) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con L-glutamina 4 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 50 mg/ml, Fungizone 250 mg/ml y suero bovino fetal inactivado por calor al 10% a 37°C en 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

25

Se recogieron células que crecían exponencialmente, se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar cualquier traza de tripsina o suero. Se suspendieron las células en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) para inyecciones.

30

Se preparó solución salina tamponada con fosfato estéril (BioWhittaker) según las normas de BPFa y se sometió a prueba el cultivo celular para garantizar la compatibilidad; teniendo un pH de 7,3-7,7 y una osmolaridad de 271-287 mOsm/kg. PBS fue el vehículo usado para reconstituir los artículos de prueba y para las inyecciones control con vehículo.

35

Se preparó cisplatino (American Pharmaceutical Partners, Inc.; Los Ángeles, CA) según las especificaciones del fabricante. Se preparó cisplatino de forma aséptica usando una campana de protección BL2 BioChem.

40

#### Sistema de prueba

40

Especie/Cepa: *Mus musculus*, CrI: ratones NU/NU-nuBR (ratones desnudos)

Sexo: Hembra

45

Edad: 6-8 semanas al inicio del tratamiento

Intervalo de peso: No se requiere peso determinado

50

Fuente: Los animales se recibieron del departamento de gnotobiótica en Charles River Laboratories, Wilmington, MA.

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

55

#### Método de identificación:

Se numeraron los ratones de manera individual usando un sistema de identificación en la oreja. Adicionalmente, se marcaron las jaulas con tarjetas de jaula que identificaban como mínimo el número de grupo, el número de animal, el número de estudio y el número de protocolo de IACUC.

60

Aleatorización:

Se asignaron aleatoriamente los animales a los grupos de tratamiento usando el programa Microsoft® Excel 97 SR-1.

65

#### Cuidado de los animales

Se alimentó a los ratones con alimento para roedores irradiado con gamma a voluntad. Se esterilizó el agua del grifo y se suministró a través de botellas y tubos para sorber a voluntad.

Entorno de los animales:

5 Se alojó a los animales en grupos en aisladores semirrígidos. Se alojó a los ratones en jaulas de fondo plano que contenían de cinco a diez animales. Las jaulas contenían lecho de contacto irradiado con gamma. El número de ratones en cada jaula puede haberse alterado debido al comportamiento de los ratones, indicándose los cambios en el inventario del aislador. El alojamiento se adapta a las recomendaciones expuestas en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington, D.C., 1996 y todas las revisiones posteriores.

10 Se ajustaron los controles del entorno para mantener una temperatura de 16-26°C (70 ± 8°F) con una humedad relativa de 30-70. Se mantuvo un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas.

15 Aclimatación:

Una vez que se recibieron los animales, se permitió que se aclimataran al entorno de laboratorio durante 24 horas antes del comienzo del estudio. Se observó a los ratones para comprobar si mostraban signos de enfermedad, consumo inusual de alimento y/o agua u otros signos generales de mal estado. En el momento de la recepción de los animales, se observó clínicamente a los animales y parecían estar sanos.

Diseño experimental:

25 En este estudio se usaron ratones desnudos atímicos hembra (CrI:NU/NU-nuBR) a las 6-8 semanas de edad. Se inyectaron a un total de 115 ratones por vía subcutánea en el lateral derecho del tórax  $5 \pm 10^6$  células de carcinoma de colon humano SW-480. Cuando los tumores alcanzaron un intervalo de tamaño objetivo de aproximadamente  $150 \pm 75$  mg, se seleccionaron aleatoriamente 90 ratones portadores de tumores y se distribuyeron a uno de nueve grupos. Se administró el compuesto de prueba y vehículo por vía intraperitoneal (i.p.), se administró cisplatino por vía intravenosa (i.v.). Se registraron las mediciones tumorales dos veces a la semana usando calibradores manuales. Se monitorizó a los ratones diariamente para buscar signos de toxicidad y morbilidad. A la terminación del estudio, se sacrificó a los animales mediante sobredosis de dióxido de carbono y se realizó la autopsia para la recogida de tejidos.

35 En este estudio se usó un total de nueve (9) grupos. Cada grupo contenía diez (10) ratones portadores de tumores. Los grupos 1 y 2 contenían ratones control negativo no tratados y tratados con vehículo, respectivamente. Los grupos 3, 4 y 5 contenían ratones que recibieron una de tres concentraciones diferentes del heterodímero D6. Los grupos 6, 7 y 8 contenían ratones que recibieron una de tres concentraciones diferentes de un péptido anti-angiogénico diferente. El grupo 9 contenían ratones que recibieron cisplatino, un compuesto quimioterápico convencional como control positivo.

40 En la tabla 12 se facilitan los niveles de dosis para cada grupo. La dosificación comenzó el mismo día en que los animales se clasificaron aleatoriamente en grupos (día de estudio 7). Se retiró cada dosis del vial de dosis usando una técnica aséptica para cada animal y se limpió el sitio de inyección con un hisopo humedecido en alcohol antes de la administración de la dosis. Se administraron las dosis con una jeringa de 1,0 ml y una jeringa de calibre 27 x 1/2" para cada ratón.

Tabla 12. Grupos de tratamiento del estudio

Grupo	Compuesto de prueba	Concentración mg/kg	Número de animales
1	No tratado	-	10
2	Vehículo	0	10
3	D6	0,05	10
4	D6	0,5	10
5	D6	5,0	10
9	Cisplatino	6,0	10

50 Los ratones tratados con compuesto de prueba y vehículo recibieron inyecciones diarias por vía intraperitoneal (i.p.) durante 15 días. Se administró cisplatino cada dos días laborables para un total de cinco (5) dosis a través de una vía intravenosa.

Se realizaron observaciones clínicas de cada animal y se registraron al menos una vez al día para indicar la toxicidad, morbilidad y mortalidad. La morbilidad incluyó signos de enfermedad tales como, pero sin limitarse a,

demacración, deshidratación, letargia, postura encorvada, aspecto descuidado, disnea y tinción de orina o fecal.

Mediciones tumorales:

- 5 Según el protocolo, se tomaron mediciones tumorales dos veces a la semana a lo largo de todo el estudio midiendo la longitud y la anchura de los tumores con calibradores calibrados. Las mediciones se produjeron con una separación mínima de 3-4 días, excepto cuando se sacrificó a los animales y se tomaron mediciones; esto dio como resultado en ocasiones un intervalo de menos de 3 días. Se calcularon los pesos tumorales usando la siguiente fórmula:  $mg = (L \times W^2)/2$ . Se sacrificó a los animales o bien cuando el peso tumoral medio era  $\geq 1000$  mg por grupo
- 10 en dos (2) mediciones consecutivas, o bien si los tumores llegaban a ulcerarse, estando afectada la capacidad del animal para deambular o para obtener comida y agua.

Sacrificio no programado y muertes inesperadas:

- 15 1. Sacrificio no programado:

Ninguno de los animales requirió sacrificio no programado mientras que estaba en el estudio

- 20 2. Muertes inesperadas:

Ninguno de los animales murió mientras que estaba en el estudio.

Autopsia:

- 25 1. Orden de sacrificio y autopsia:

Se realizó la autopsia de todos los ratones en los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 (50 en total) cuando los tumores alcanzaron un tamaño objetivo medio del grupo  $\geq 1000$  mg en dos (2) mediciones consecutivas dentro de un grupo. Se realizó la autopsia de los animales en Charles River Laboratories Health Monitoring Laboratory (HM), Wilmington, MA. Se sacrificó a todos los animales el día de estudio 22, cuando les quedaba poco tiempo para recibir el régimen de tratamiento completo de 28 días con los artículos de prueba puesto que el tamaño tumoral medio era  $\geq 1000$  mg en los grupos 3-8 tratados con el artículo de prueba. Todos los animales se sacrificaron de manera compasiva mediante inhalación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

- 35 Recogida de tejidos:

Se diseccionaron los tumores libres del tejido circundante y la piel que recubre. Adicionalmente se recogieron los riñones. Se anotó cualquier anomalía observada en las superficies renales.

- 40 Se obtuvieron bloques congelados de los tumores y los riñones de cada animal. Se tomó un corte representativo del tejido (tumor, riñones). Los cortes de riñón incluyeron la corteza y la médula. Se colocaron los cortes de tejido en el fondo de un molde de congelación de plástico marcado. Se embebió el tejido con medio OCT. Se sumergieron los bloques en isopentano enfriado con nieve carbónica hasta la congelación. Se examinaron brevemente los bloques para determinar la calidad, y se almacenaron en nieve carbónica.

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

Resultados:

- 50 A. Mediciones y observaciones en vida:

1. Exposición resumen de observaciones clínicas, morbilidad y mortalidad:

- 55 Todos los animales parecían sanos y estaban dentro de los límites normales a lo largo de todo el estudio y el compuesto de prueba (D6) no mostró ningún signo de toxicidad a las dosis usadas en este estudio.

- 60 Se sacrificó a los animales en el día de estudio 22. Todos los ratones, excepto los ratones del grupo 9, se sacrificaron antes de completar la administración del compuesto de prueba, porque el tamaño tumoral medio era  $\geq 1000$  mg en los grupos 1-8. Los animales tratados con cisplatino, grupo 9, se sacrificaron en el día de estudio 22 cuando el peso tumoral medio era de 995 mg. No murieron animales mientras estaban en el estudio.

Resumen de palpación de masas

- 65 A lo largo de todo el estudio, se detectaron masas palpables en todos los ratones, creciendo los tumores progresivamente durante la duración del estudio. Tal como se esperaba, los tumores en los ratones control negativo

no tratados y tratados con vehículo (grupos 1 y 2) crecieron lo más rápido, alcanzando un tamaño tumoral medio de 1000 mg en o antes del día de estudio 20. Además, los animales tratados con cisplatino (grupo 9) desarrollaron tumores que crecieron lo más lento alcanzando un tamaño tumoral medio de 995 mg a la terminación del estudio (día 22).

5 En general, excepto en los ratones del grupo 3, todos los ratones tratados con compuestos de prueba dieron como resultado un crecimiento tumoral más lento. Los animales en el grupo 3, que se trataron con la dosis baja de D6 (0,05 mg/kg) tuvieron tumores que crecieron a aproximadamente la misma velocidad que los tumores en los animales no tratados y tratados con vehículo en los grupos 1 y 2. Los animales tratados con dosis superiores de D6 (grupos 4 y 5) tuvieron tumores que crecieron más lento; alcanzando un tamaño tumoral medio de 1000 mg en el día de estudio 21. Cuando se comparó con los ratones control de los grupos 1 y 2, el tratamiento con el compuesto de prueba dio como resultado un retraso de crecimiento tumoral de aproximadamente 1 día.

### 15 Conclusiones

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

20 A lo largo de todo el estudio se observaron masas palpables en todos los grupos. Además, todos los animales estaban sanos y dentro de los límites normales a lo largo de todo el estudio. Además, el compuesto de prueba (D6) no pareció afectar adversamente a los animales. Por tanto, estos datos sugerirían que los animales tratados con D6 tenían tumores que crecieron lentamente (aproximadamente 1 día más lento a lo largo del período de prueba de 22 días que los controles). Además, puesto que el compuesto de prueba no mostró ningún efecto tóxico significativo, también podían usarse concentraciones superiores del compuesto de prueba con regresión tumoral potencialmente mejor.

### 25 **Ejemplo 30**

30 El siguiente ejemplo describe la preparación de un agente de contraste por ultrasonidos conjugado con un heterodímero de unión a KDR de la invención y la capacidad del agente de contraste conjugado con el heterodímero para localizar células que expresan KDR *in vitro* y tejido angiogénico *in vivo*.

#### Preparación de microburbujas derivatizadas para conjugación de péptidos

35 Se solubilizaron 200 mg de DSPC (diesteoroilfosfatidilcolina), 275 mg de DPPG.Na (sal sódica de diesteoroilfosfatidilglicerol) y 25 mg de N-MPB-PE a 60°C en 50 ml de hexano/isopropanol (42/8). Se evaporó el disolvente a vacío, y entonces se añadió PEG-4000 (35,046 g) a los lípidos y se solubilizó la mezcla en 106,92 g de alcohol t-butílico a 60°C, en un baño de agua. Se llenó la disolución en viales con 1,5 ml de disolución. Se congelaron rápidamente las muestras a -45°C y se liofilizaron. Se sustituyó el aire en el espacio de cabeza por una mezcla de C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>/aire (50/50) y se taparon y se prensaron los viales. Se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 10 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) por vial, produciendo una suspensión de microburbujas estabilizadas con fosfolípidos.

#### Conjugación de péptidos

45 Se conjugó D23 (un constructo dimérico de secuencias derivadas de P6 y P12) con una preparación de microburbujas tal como se describió anteriormente, según la siguiente metodología. Se disolvió el péptido tioacetilado (200 µg) en 20 µl de DMSO y luego se diluyó en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se mezcló esta disolución con las microburbujas funcionalizadas con N-MPB dispersadas en 18 ml de PBS-EDTA 10 mM, pH 7,5 y se añadieron 2 ml de disolución de desacetilación (fosfato de sodio 50 mM, EDTA 25 mM, hidroxilamina-HCl 0,5 M, pH 7,5). Se llenó el espacio de cabeza con C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>/aire (50/50) y se incubó la mezcla durante 2,5 horas a temperatura ambiente con agitación suave (agitador rotatorio), en la oscuridad. Se lavaron las burbujas conjugadas mediante centrifugación. De manera similar, se conjugaron por separado los péptidos monoméricos que constituían D23 con dos preparaciones de microburbujas diferentes según la metodología descrita anteriormente.

#### Ensayo *in vitro* en células transfectadas

55 Se evaluó la capacidad de las microburbujas estabilizadas con fosfolípidos conjugadas con los constructos heteromultiméricos de la invención para unirse a células que expresan KDR usando células 293H transfectadas para expresar KDR.

#### Transfección de células 293H en cubreobjetos Thermanox®:

65 Se transfectaron células 293H con ADN de KDR tal como se expuso en el ejemplo 6. Se incubaron las células transfectadas con una suspensión de microburbujas conjugadas con péptido preparadas tal como se describió anteriormente. Para la incubación con las células transfectadas, se llena una pequeña tapa de plástico con una

suspensión que contiene de 1 a  $3 \cdot 10^8$  microburbujas conjugadas con péptido y se coloca la tapa cubierta con un cubreobjetos Thermanox® invertido de manera que las células transfectadas estén en contacto con las microburbujas conjugadas. Tras aproximadamente 20 min a TA, se levanta el cubreobjetos con pinzas, se aclara tres veces en PBS y se examina al microscopio para evaluar la unión de las microburbujas conjugadas.

5

#### Determinación del % de superficie cubierta por microvesículas

Se obtuvieron imágenes con una cámara digital DC300F (Leica) y se determinó el porcentaje de superficie cubierta por microburbujas unidas en la zona tomada como imagen usando el software QWin (Leica Microsystem AG, Basilea, Suiza). La tabla 13 muestra los resultados de la afinidad de unión (expresados como % de cobertura de la superficie tomada como imagen) de las microvesículas dirigidas de la invención a células transfectadas con KDR, en comparación con la unión de las mismas microvesículas dirigidas a células transfectadas de manera simulada.

10

Tabla 13

Microburbujas conjugadas preparadas tal como se describió anteriormente		% de superficie cubierta	
Código de péptido	Id de lote	KDR	Simulado
Derivado de P6	BG1979T02	3,5%	0,9%
Derivado de P12	BG1980T02	16,8%	1,0%
D23 (dímero)	BG2002T02	22,9%	3,3%
Deriv. de D6 / Deriv. de P12	BG1958T02	12,9%	0,8%

15

Cuando se unen por separado la secuencia derivada de P-6 y la secuencia derivada de P12 a microburbujas estabilizadas con fosfolípidos como monómeros, las preparaciones resultantes logran la unión de las burbujas a células transfectadas con KDR *in vitro* en un grado diferente (el 3,5% y el 16,8%). Cuando se somete a prueba una preparación de microburbujas estabilizada con fosfolípidos que resulta de la adición de cantidades iguales de cada uno de estos monómeros peptídicos (pero la misma carga de péptido total) en el mismo sistema, se logra una unión del 12,9%. La unión es un poco mayor que el promedio de los dos, pero como se logra con dos secuencias que se unen a sitios diferentes en la diana será más resistente a la competencia en uno u otro de los sitios en la diana. Sin embargo, para D23, el dímero, la unión aumenta hasta el 22,9% (con la misma carga de péptido). Estos resultados indican que los heteromultímeros de la invención permiten la unión aumentada y la resistencia aumentada a la competencia.

20

25

#### Modelos animales *in vivo*

30

Se usó un modelo conocido de tejido angiogénico (el modelo de rata Mat B III) para examinar la capacidad de las microburbujas estabilizadas con fosfolípidos conjugadas con un heteromultímero de la invención para localizar y proporcionar imágenes de tejido angiogénico.

35

Animales: Se usaron ratas hembra Fisher 344 (Charles River Laboratories, Francia) que pesaban de 120 a 160 g para la implantación de tumores MATBIII. Se usaron ratas macho OFA (Charles River Laboratories, Francia) que pesaban de 100 a 150 g para la inyección de Matrigel.

#### Anestesia

40

Se anestesió a las ratas con una inyección intramuscular (1 ml/kg) de mezcla de Ketamino®/xilazina (Veterinaria AG/Sigma) (50/10 mg/ml) antes de la implantación de células MatBIII o Matrigel. Para los experimentos de obtención de imágenes, se anestesió a los animales con la misma mezcla, más inyección subcutánea de uretano al 50% (1 g/kg).

45

#### Modelo de tumor MATBIII de rata

50

Se obtuvo un adenocarcinoma mamario de rata, denominado 13762 Mat B III, de ATCC (CRL-1666) y se hizo crecer en medio 5a de McCoy + FCS al 10%, glutamina al 1% y pen/estrep al 1% (Invitrogen, n.º de cat. 15290-018). Se recogieron las células en suspensión y se lavaron en medio de crecimiento, se contaron, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS o medio de crecimiento a  $1 \cdot 10^7$  células por ml. Para la inducción tumoral: se inyectaron  $1 \cdot 10^6$  células en 0,1 ml en el pániculo adiposo mamario de las ratas hembra Fisher 344 anestesiadas. Los tumores crecieron habitualmente hasta un diámetro de 5-8 mm en el plazo de 8 días.

Obtención de imágenes por ultrasonidos *in vivo*

5 Se realizó la obtención de imágenes de tumores usando un aparato de sistema de obtención de imágenes por ultrasonidos ATL HDI 5000 equipado con una sonda lineal L7-4. Se usó la inversión de impulsos en modo B a baja potencia acústica ( $MI=0,05$ ) para realizar un seguimiento de la acumulación de microburbujas conjugadas con péptido en el receptor KDR expresado en el endotelio de los neovasos. Para los experimentos de control, se inyectó un bolo intravenoso de microburbujas no conjugadas o microburbujas conjugadas con un péptido no específico. Se fijó la sonda lineal en la piel directamente en línea con los tumores implantados y se realizó un seguimiento de la  
10 acumulación de las burbujas dirigidas durante treinta minutos.

Se administró una perfusión de SonoVue® antes de inyectar la suspensión de burbujas de prueba. Esto permite evaluar el estado de vascularización y se toma la intensidad de vídeo obtenida tras la inyección de SonoVue® como referencia interna.  
15

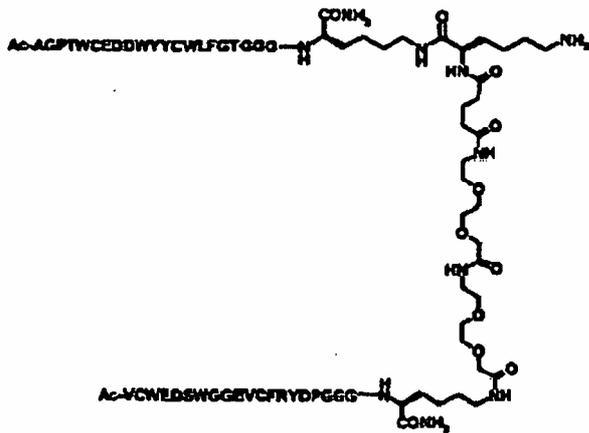
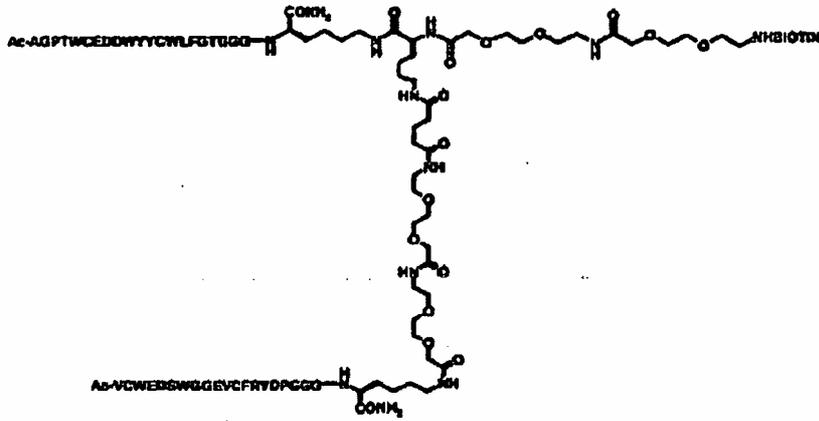
Se registró un fotograma de nivel inicial y luego se detuvo la insonación durante la inyección de las microburbujas. En diversos puntos de tiempo tras la inyección (1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos) se reactivó la insonación y se grabaron 2 fotogramas de un segundo en una cinta de vídeo.

20 Se capturaron fotogramas de los experimentos de obtención de imágenes de tumores y se analizaron con el software de captura de vídeo e Image-Pro Plus 2.0, respectivamente. Se seleccionó la misma área de interés (AOI) rectangular que incluía toda el área de sección del tumor en imágenes en diferentes puntos de tiempo (1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos). En cada punto de tiempo, se calculó la suma de píxeles de vídeo dentro del AOI tras la resta de la AOI de nivel inicial. Los resultados se expresan como el porcentaje de la señal obtenida con SonoVue®, que se considera como el 100%. De manera similar, también se analizó una segunda AOI situada fuera del tumor, y que  
25 representa el agente de contraste que circula libremente.

La figura 37 muestra la captación y retención de contraste de burbujas en el tumor hasta 30 minutos tras la inyección para suspensiones de microburbujas estabilizadas con fosfolípidos conjugadas con un constructo heteromultimérico de la invención preparado tal como se describió anteriormente (D23). En contraposición, las mismas burbujas sólo mostraron visualización/contraste de burbujas transitorio (no más de 10 minutos) en la AOI situada fuera del sitio tumoral.  
30

REIVINDICACIONES

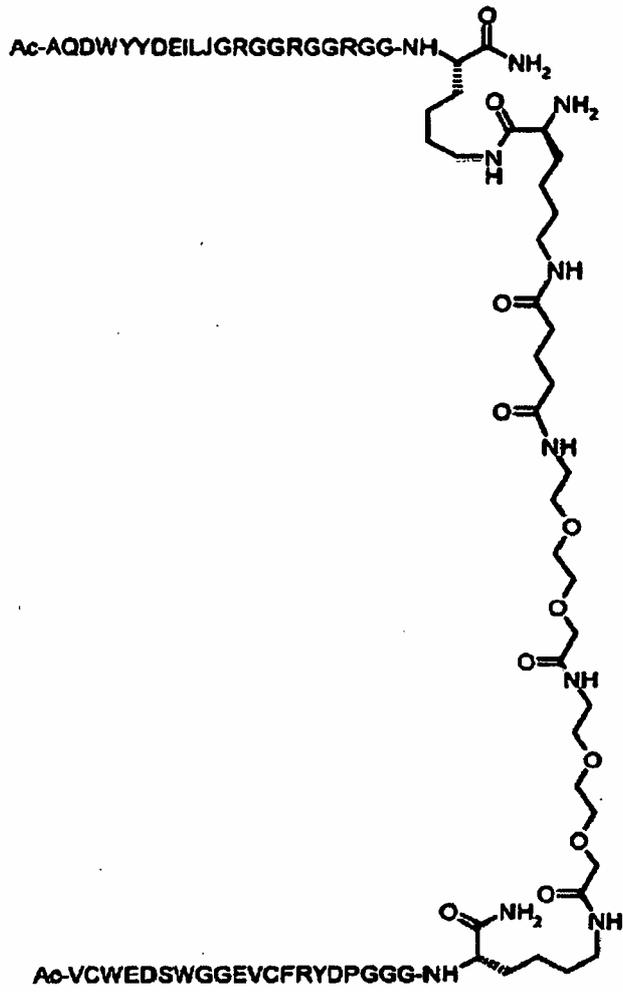
1. Compuesto multivalente que comprende dos polipéptidos que tienen especificidad por epítomos diferentes en un receptor proteína-tirosina cinasa seleccionado del grupo que consiste en KDR y cMet, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en



D5

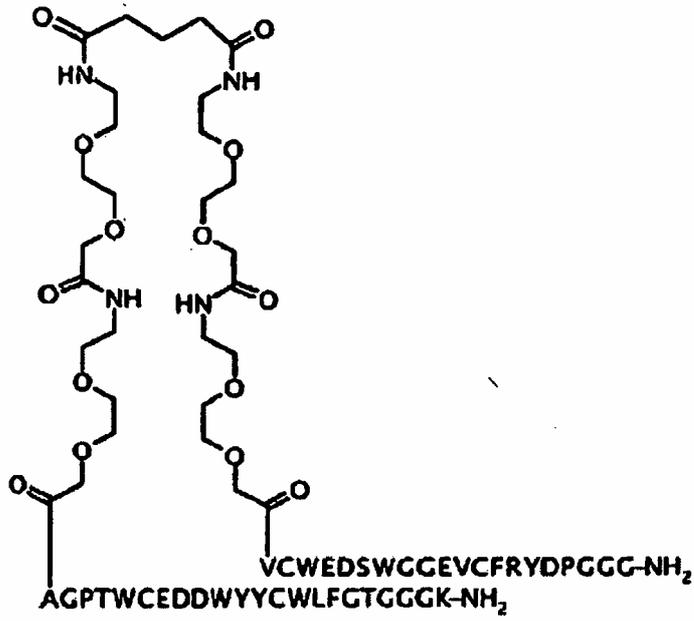




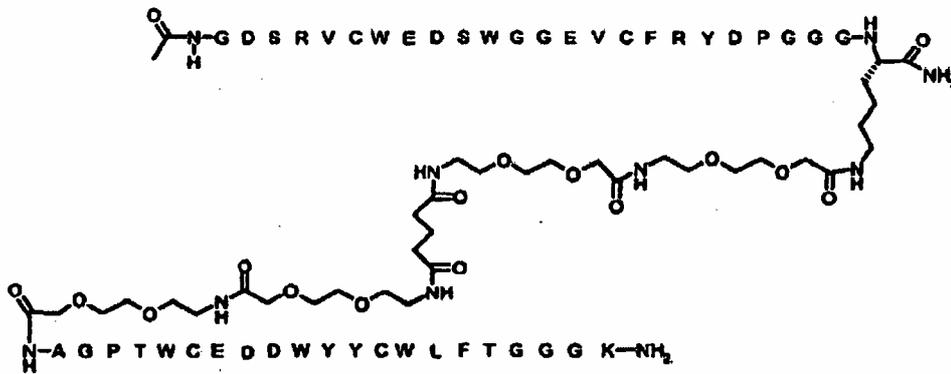


D17





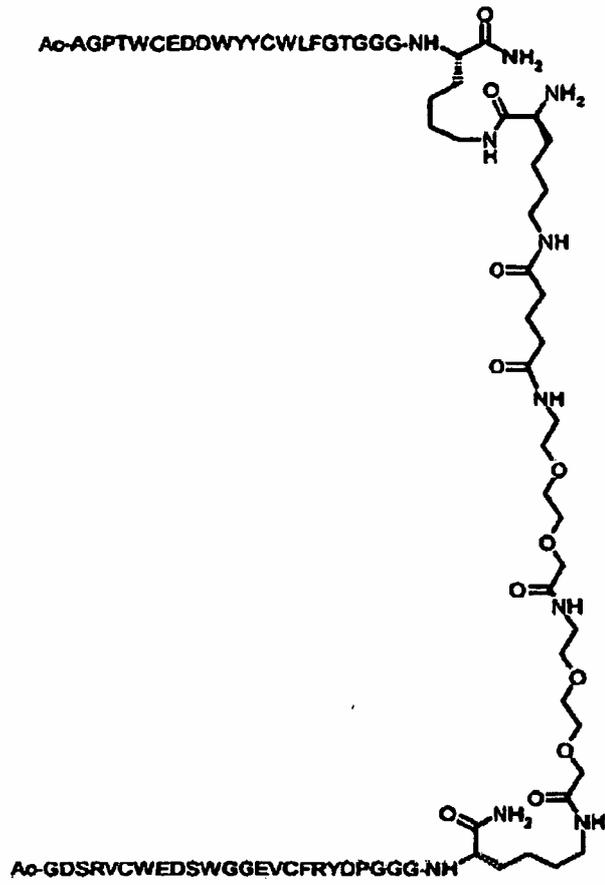
D20



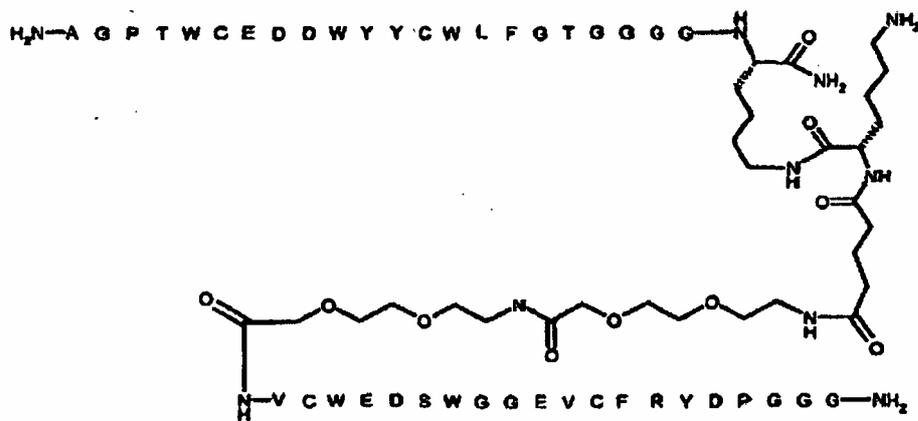
D22



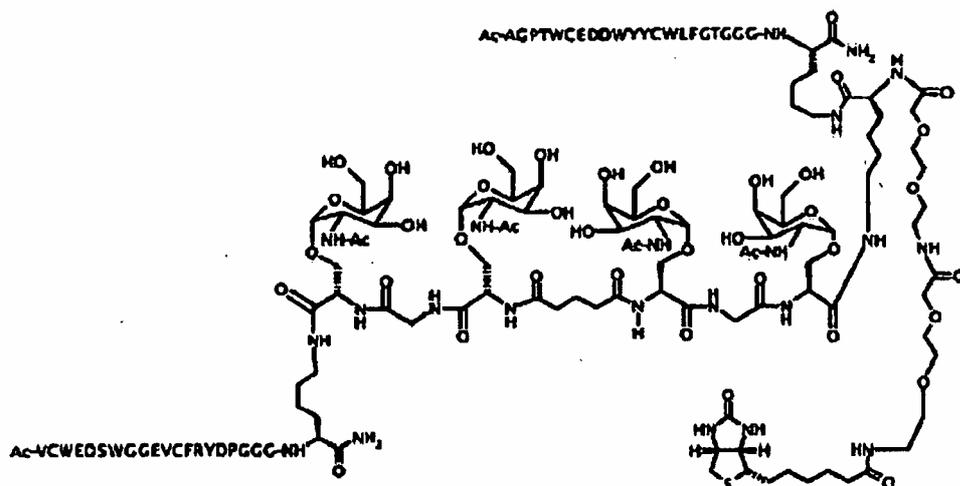




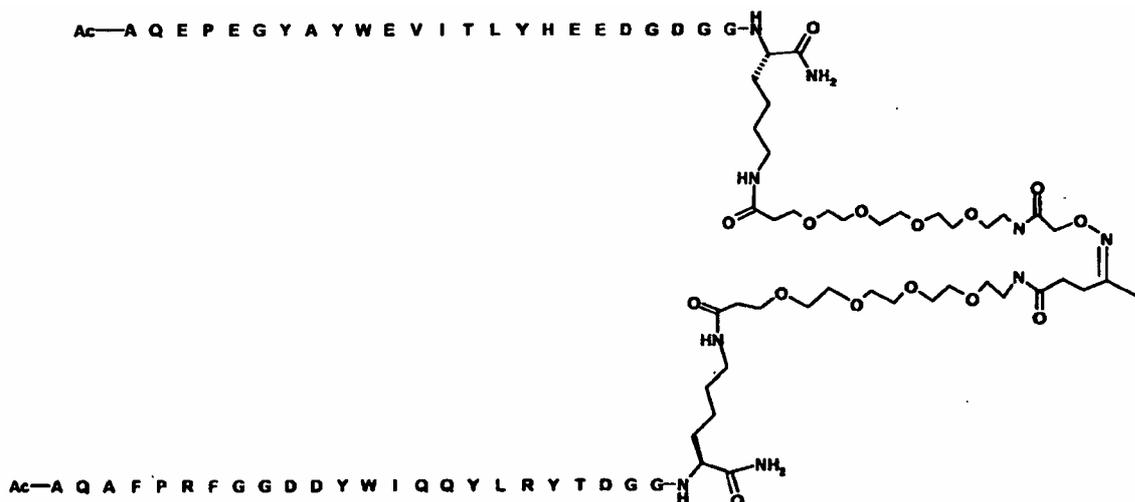
D25



D26



D27



D31

5 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que los polipéptidos tienen especificidad por epítomos diferentes en KDR y el compuesto se selecciona del grupo que consiste en D1, D5, D6, D7, D9, D17, D19, D20, D22, D23, D24, D25, D26, D27, D31.

10 3. Compuesto según la reivindicación 1, que comprende además al menos un grupo de marcaje, comprendiendo preferiblemente el grupo de marcaje

un grupo detectable mediante obtención de imágenes por resonancia magnética, obtención de imágenes por ultrasonidos, obtención de imágenes óptica, obtención de imágenes por sonoluminiscencia, obtención de imágenes por fotoacústica u obtención imágenes nuclear, o un agente de contraste por ultrasonidos, un fotomarcador o una molécula bioluminiscente

o

20 un agente terapéutico, comprendiendo preferiblemente el agente terapéutico un agente bioactivo, un agente citotóxico, un fármaco, un agente quimioterápico o un agente radioterápico.

4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que el grupo de marcaje o agente terapéutico comprende uno o más quelantes complejados con un ión de metal paramagnético, partículas superparamagnéticas, un agente de contraste por ultrasonidos, uno o más fotomarcadores o uno o más quelantes complejados con un radionúclido.

25 5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que el radionúclido es  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,

<sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>47</sup>Sc, <sup>51</sup>Cr, <sup>167</sup>Tm, <sup>141</sup>Ce, <sup>111</sup>In, <sup>168</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb, <sup>140</sup>La, <sup>90</sup>Y, <sup>88</sup>Y, <sup>153</sup>Sm, <sup>166</sup>Ho, <sup>185</sup>Dy, <sup>168</sup>Dy, <sup>62</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>97</sup>Ru, <sup>103</sup>Ru, <sup>188</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>203</sup>Pb, <sup>211</sup>Bi, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>214</sup>Bi, <sup>105</sup>Rh, <sup>109</sup>Pd, <sup>117m</sup>Sn, <sup>149</sup>Pm, <sup>161</sup>Tb, <sup>177</sup>Lu, <sup>198</sup>Au o <sup>199</sup>Au.

6. Compuesto según la reivindicación 3, en el que el grupo de marcaje comprende

5 un grupo detectable mediante obtención de imágenes óptica y el parámetro óptico detectado se selecciona del grupo que consiste en radiación transmitida, absorción, emisión fluorescente o fosforescente, reflexión de luz, cambios en la absorbancia, amplitud o máximos, y radiación dispersada de manera elástica,

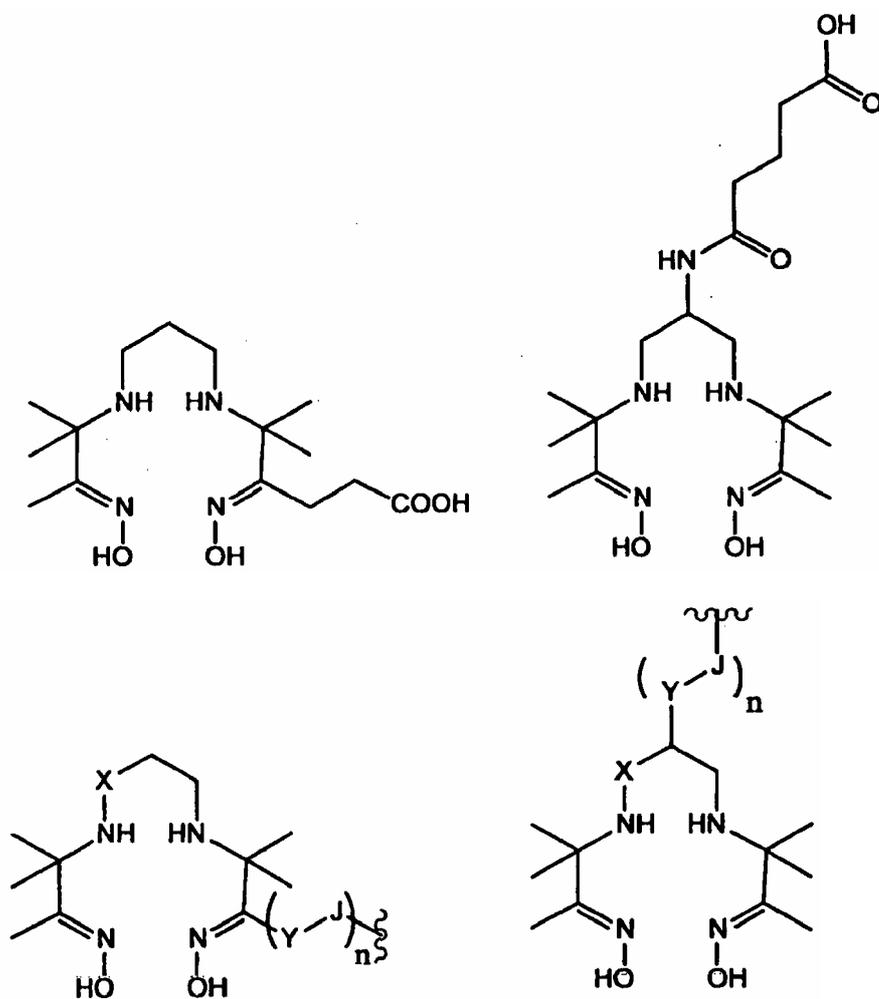
10 o

un fotomarcador comprende un colorante óptico, opcionalmente un fluoróforo o cromóforo orgánico.

7. Compuesto según la reivindicación 3, que comprende además un ligador entre el compuesto multivalente y el grupo de marcaje o agente terapéutico, comprendiendo preferiblemente el ligador una cadena de alquilo sustituida, una cadena de alquilo no sustituida, un derivado de polietilenglicol, un espaciador de aminoácido, un azúcar, un espaciador alifático, un espaciador aromático, una molécula lipídica, o combinación de los mismos.

8. Compuesto según la reivindicación 5, en el que el quelante se selecciona del grupo que consiste en:

20



25 en los que X es CH<sub>2</sub> u O;

Y es alquilo ramificado o no ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilo, ariloxilo, arilamino, arilaminoacilo o aralquilo que comprende grupos alquilo ramificados o no ramificados C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, grupos hidroxilo o polihidroxialquilo o grupos polialcoxialquilo o polihidroxil-polialcoxialquilo ramificados o no ramificados C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>;

30

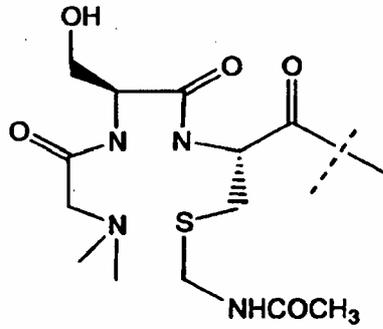
J es C(=O)-, OC(=O)-, SO<sub>2</sub>-, NC(=O)-, NC(=S)-, N(Y), NC(=NCH<sub>3</sub>)-, NC(=NH)-, N=N-, una homopoliamida o una heteropoliamida derivada de aminoácidos sintéticos o que se producen de manera natural;

y n es 1-100;

y el quelante se compleja opcionalmente con  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{188}\text{Re}$  o  $^{188}\text{Re}$

5

el quelante tiene la siguiente estructura:

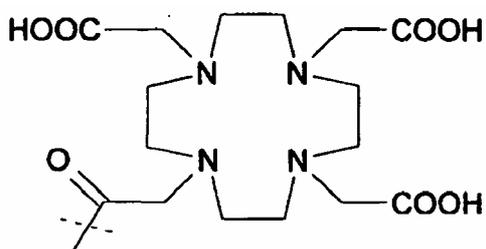
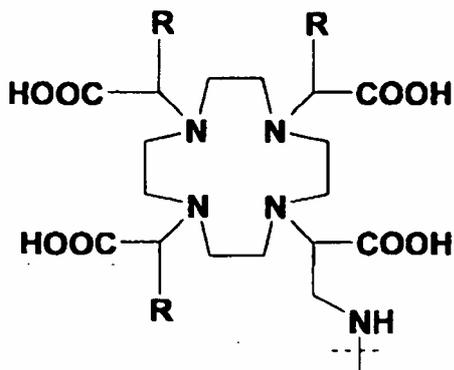
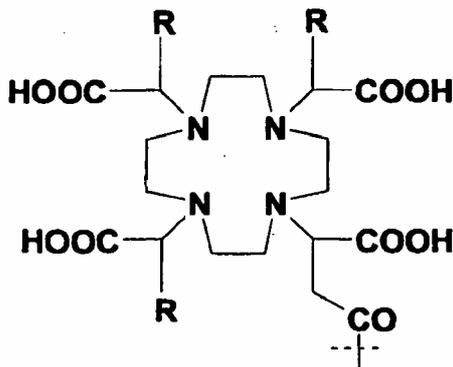


10 y el quelante se compleja opcionalmente con  $^{99m}\text{Tc}$

o

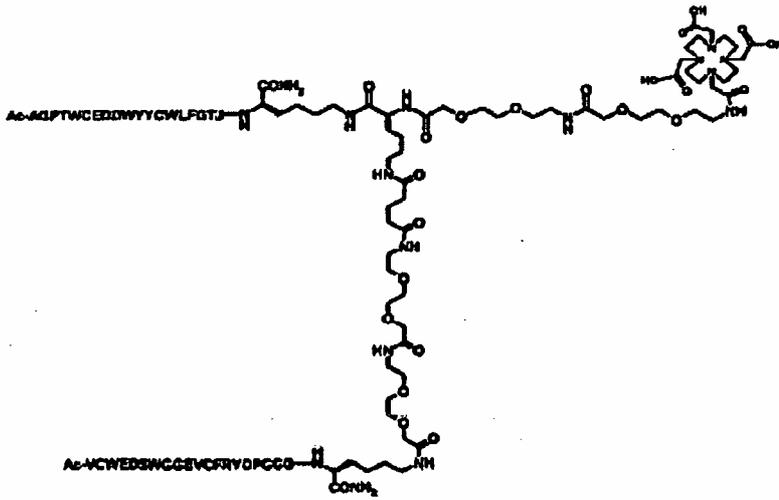
el quelante se selecciona del grupo que consiste en:

15

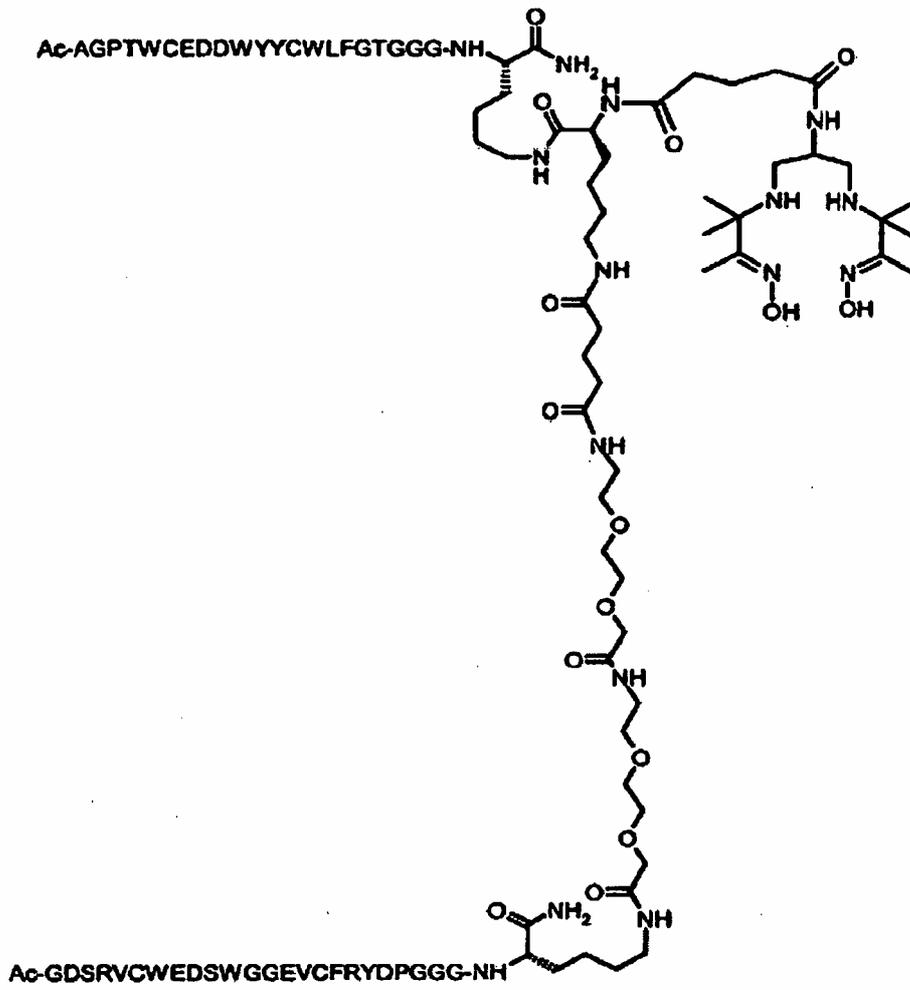


20

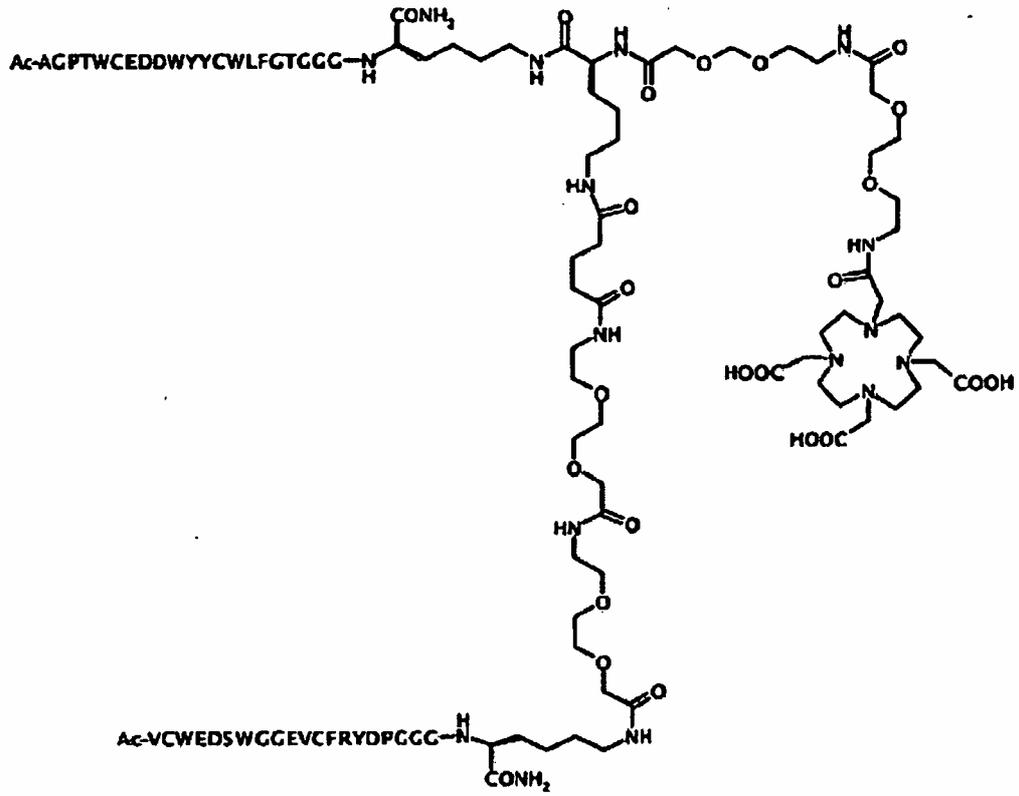




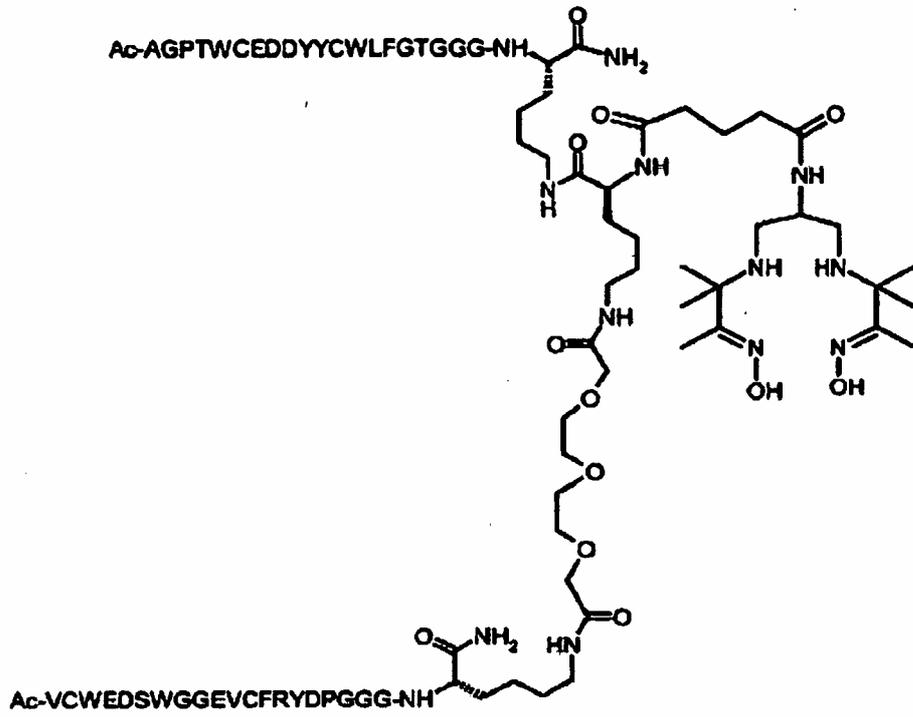
D4



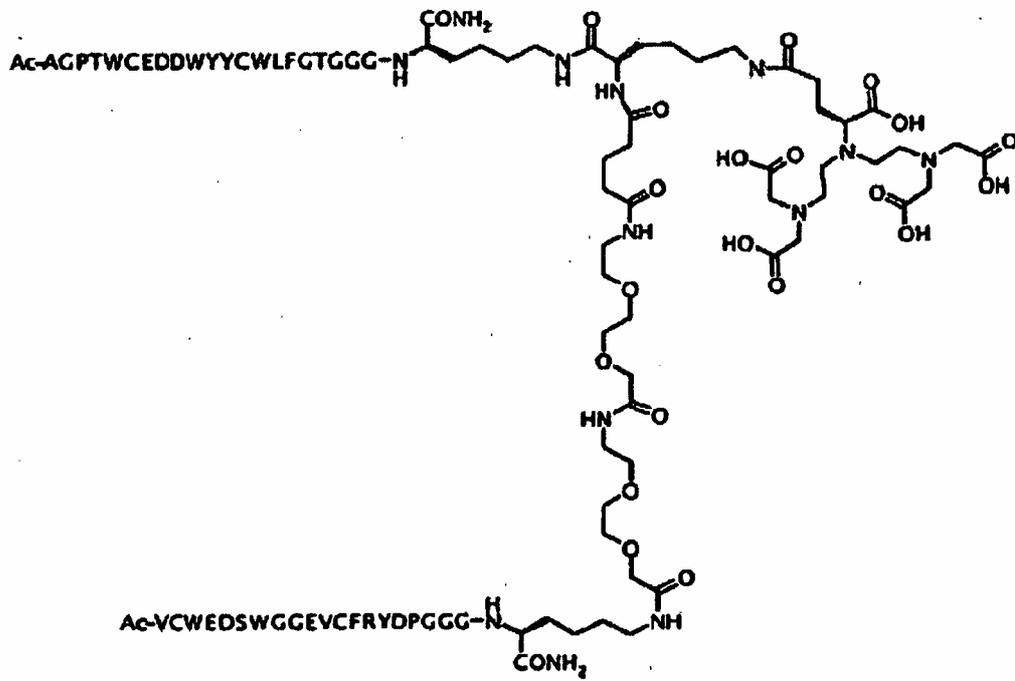
D10



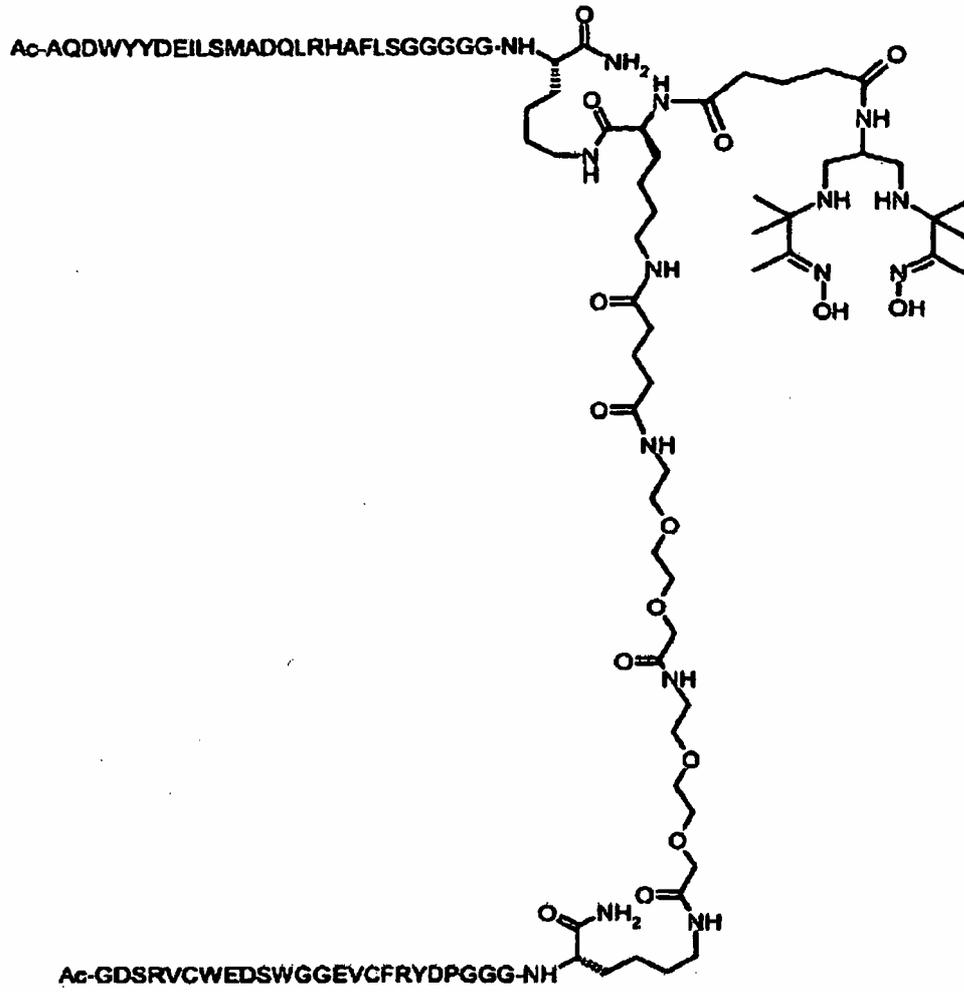
D11



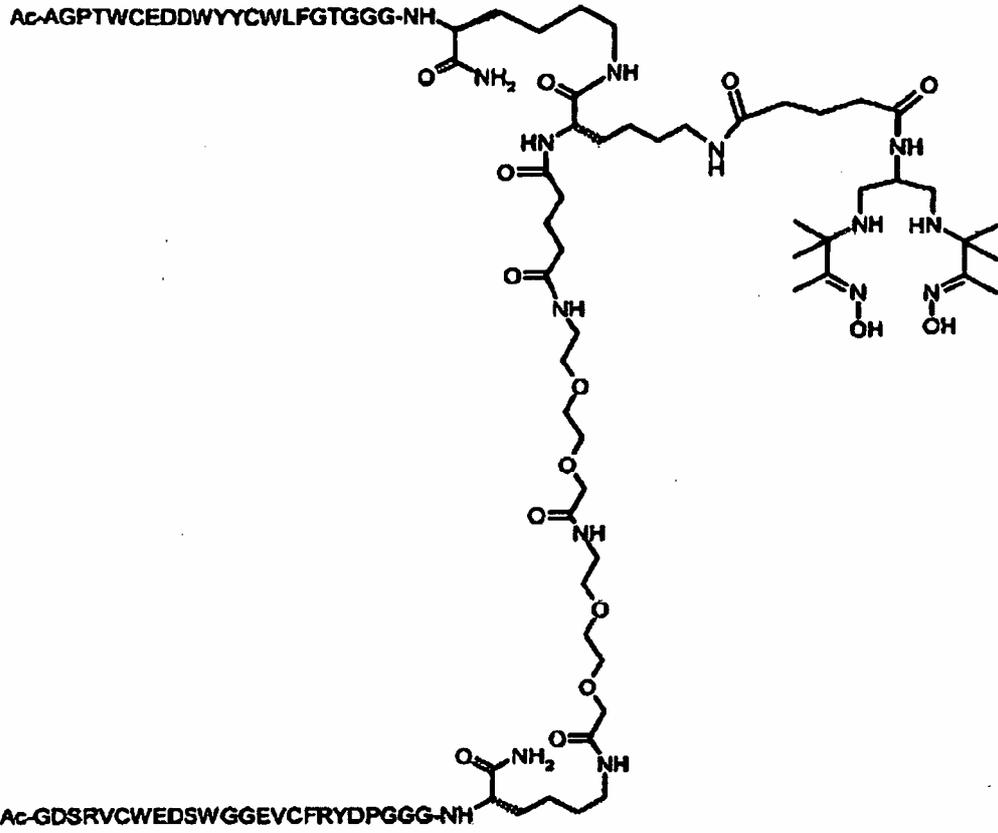
D12



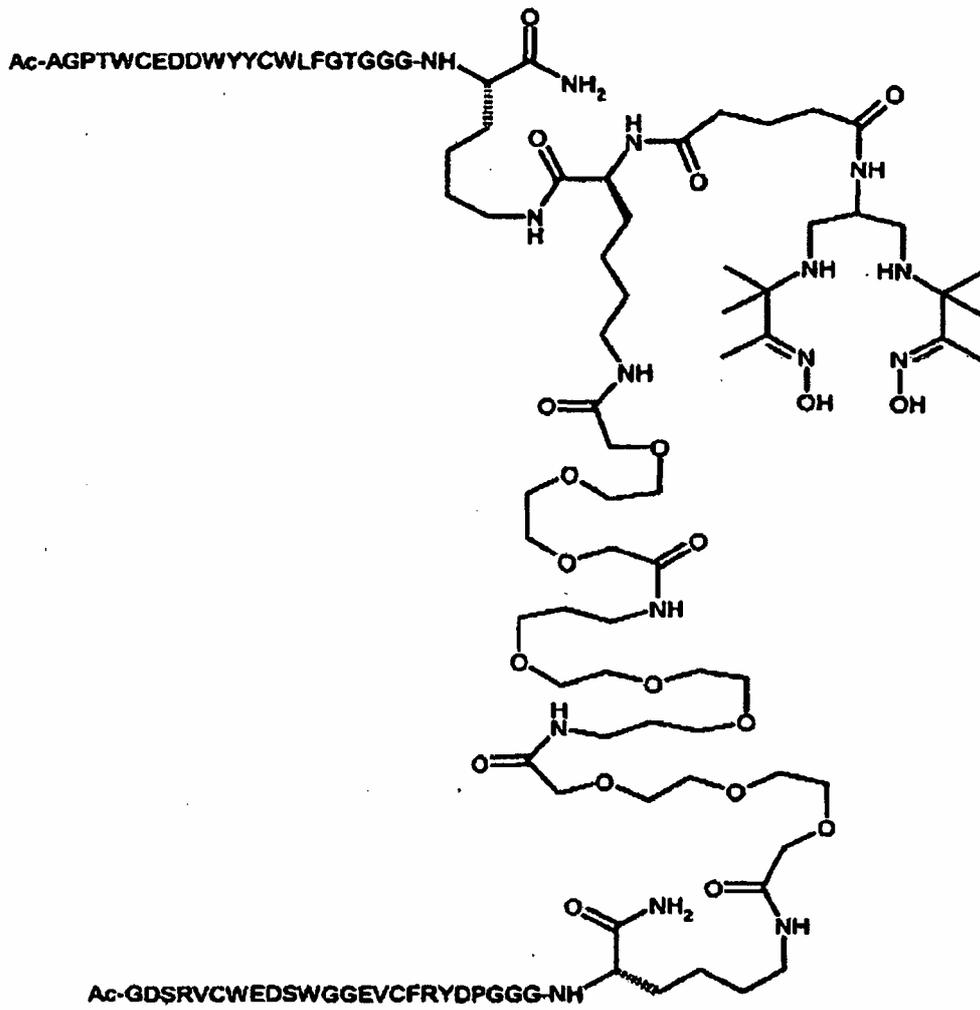
D13



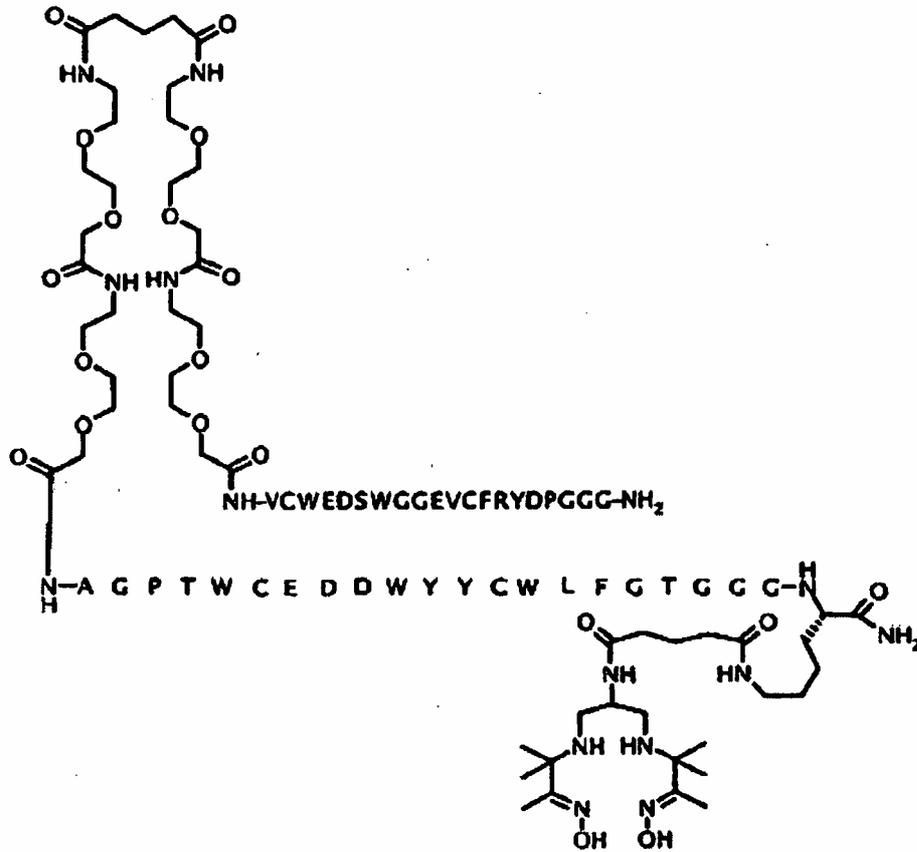
D14



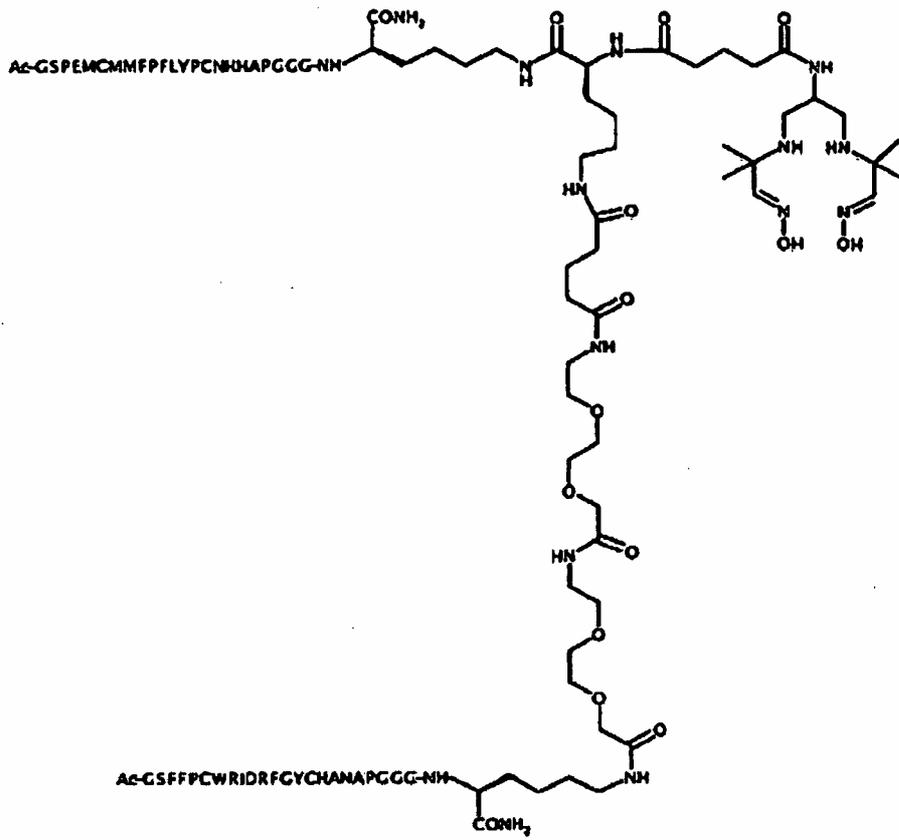
D15



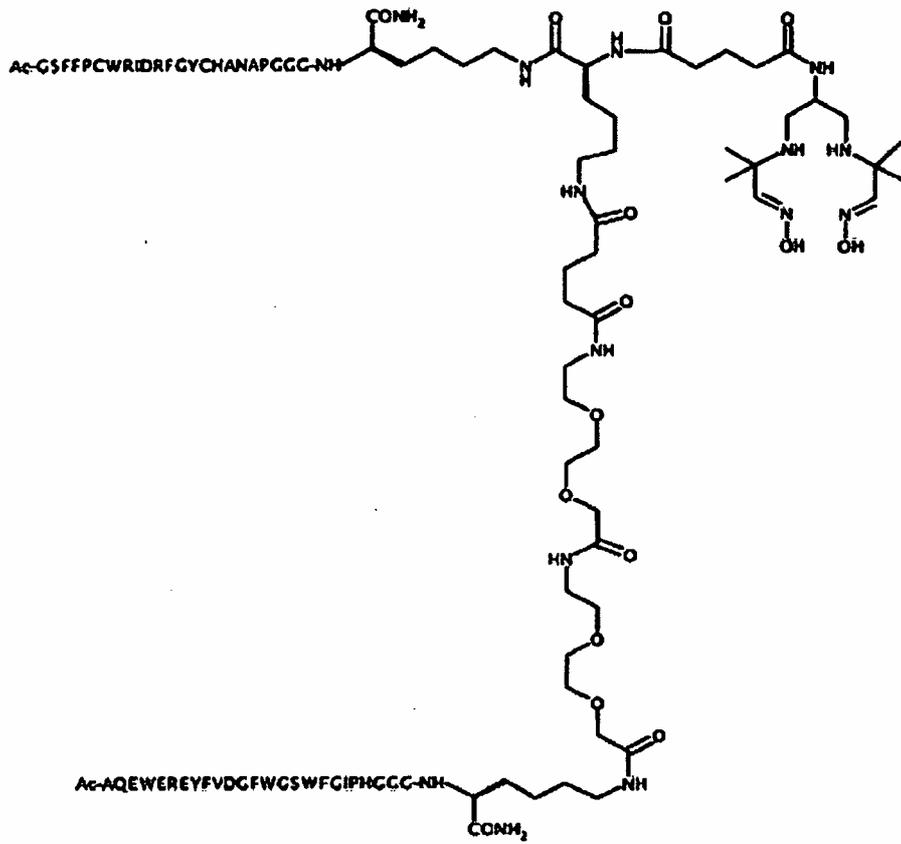
D16



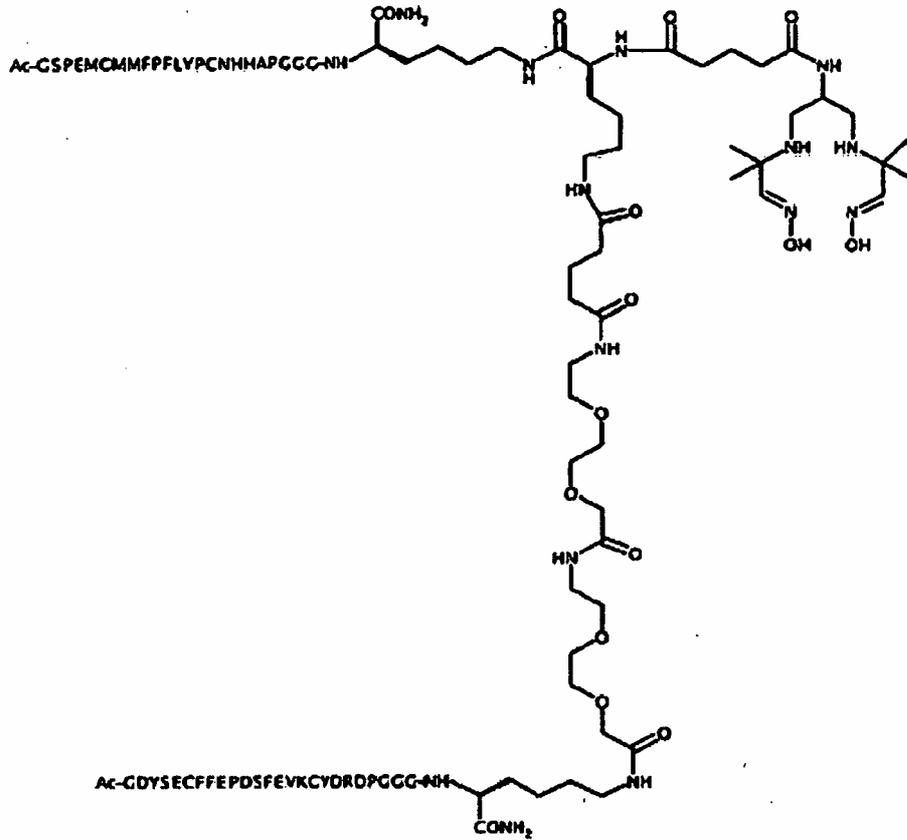
D21



D28



D29



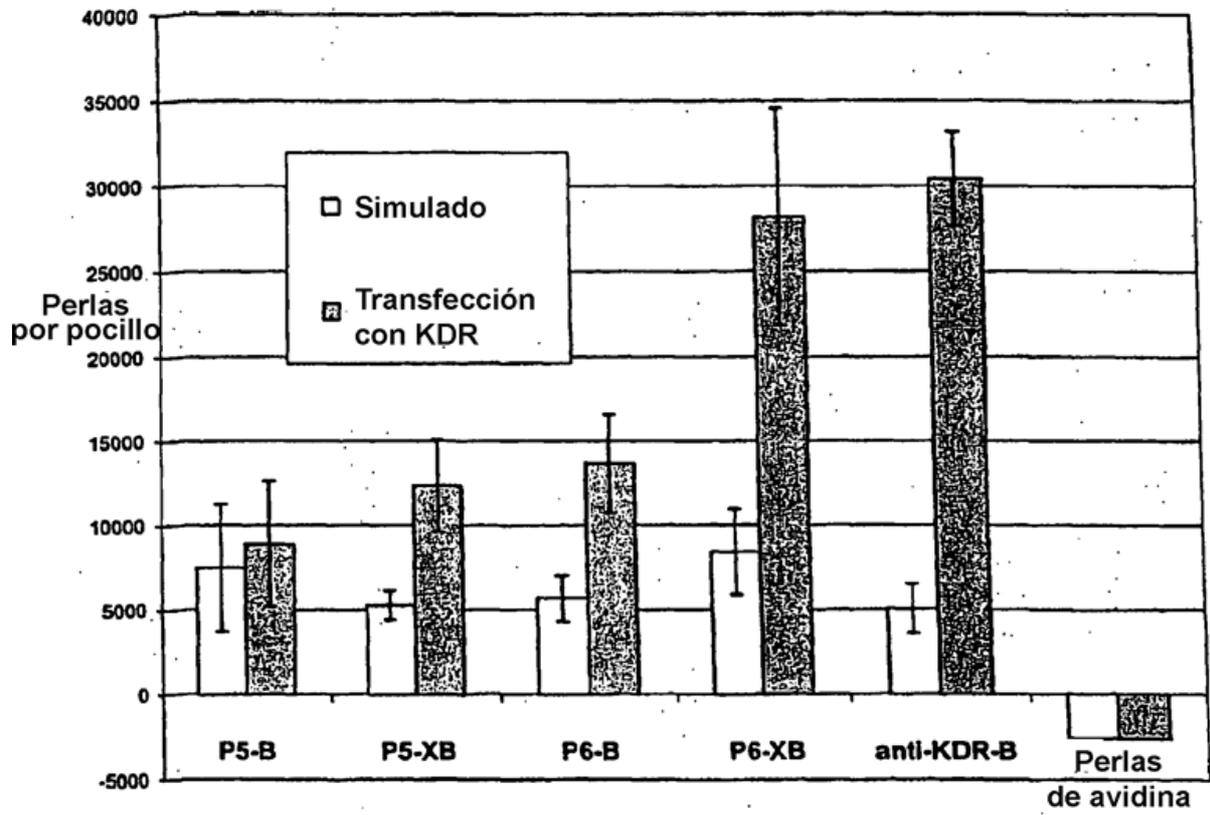
**D30**

15. Compuesto según la reivindicación 14, en el que

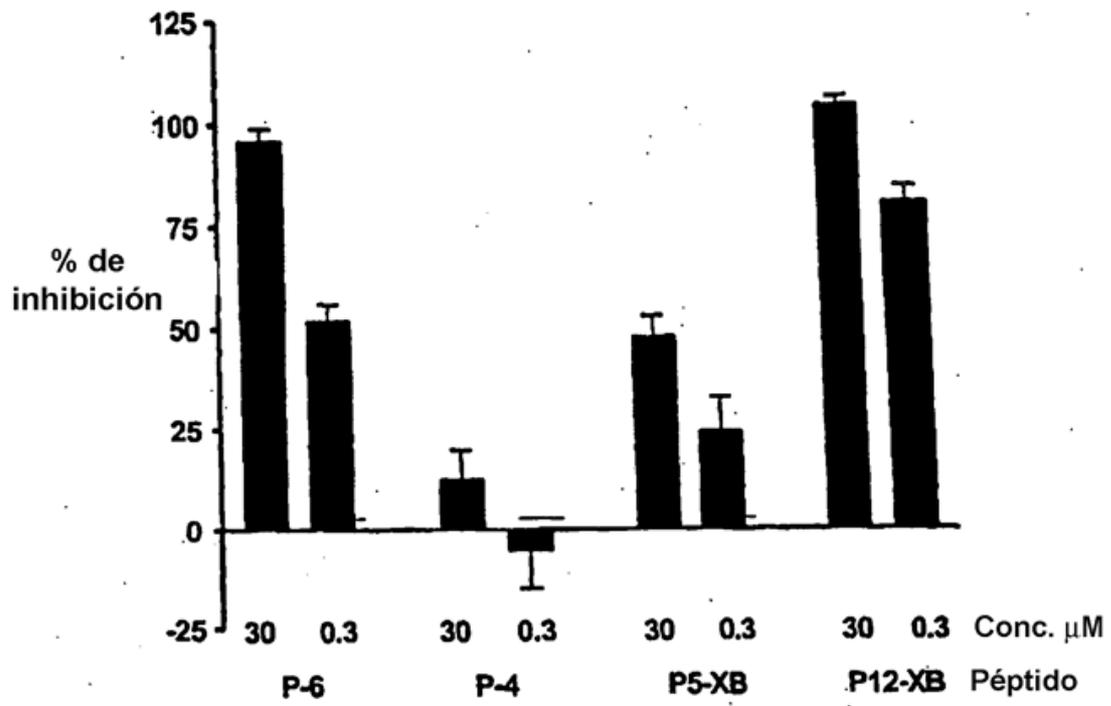
5 los polipéptidos tienen especificidad por epítopos diferentes en KDR y el compuesto se selecciona del grupo que consiste en D4, D10, D11, D12, D13, D14, D15, D16 y D21

o

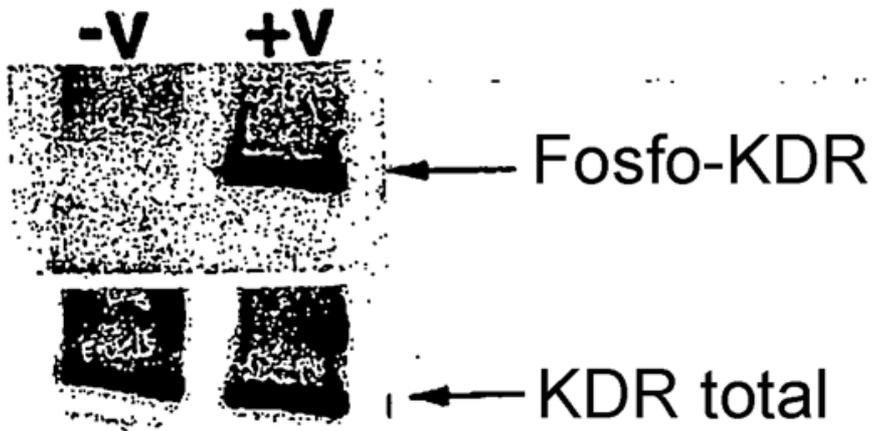
10 los polipéptidos tienen especificidad por epítopos diferentes en cMet y el compuesto se selecciona de D28, D29, D30.



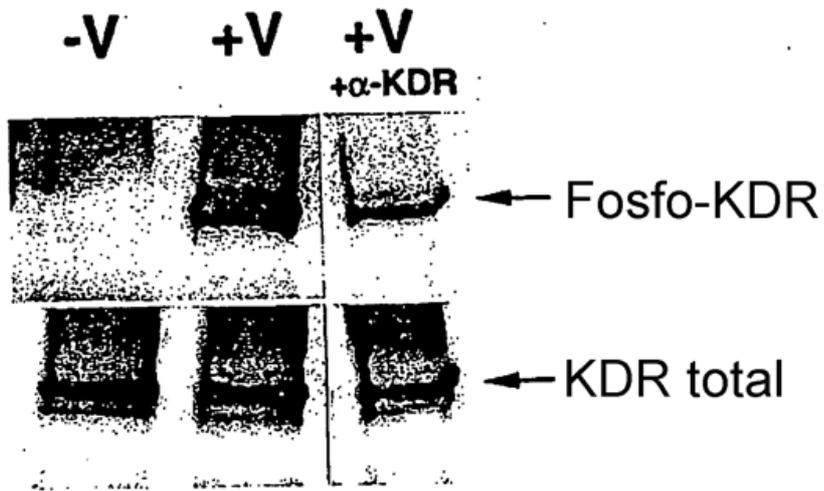
**FIG. 1**



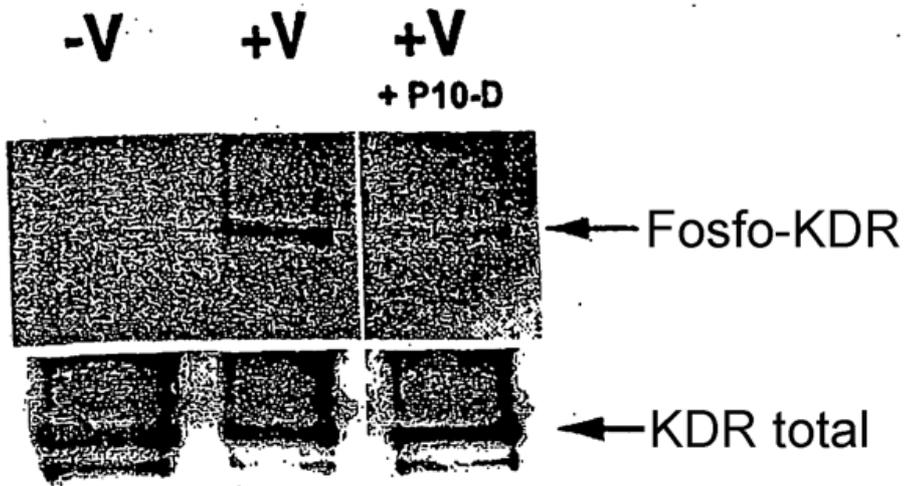
**FIG. 2**



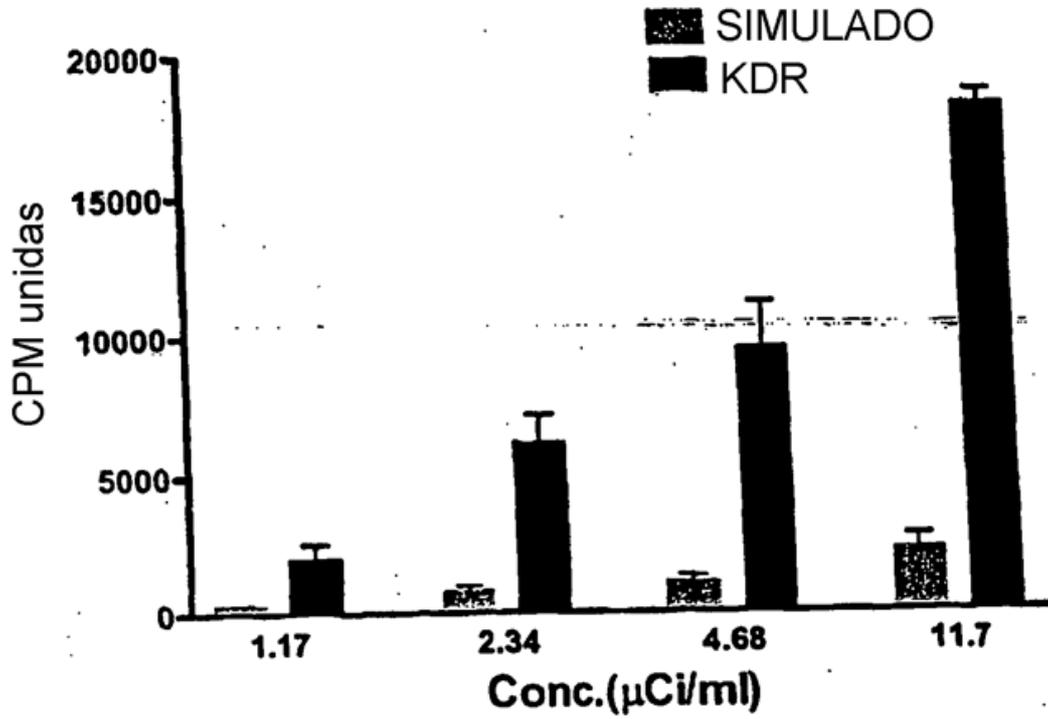
**FIG. 3**



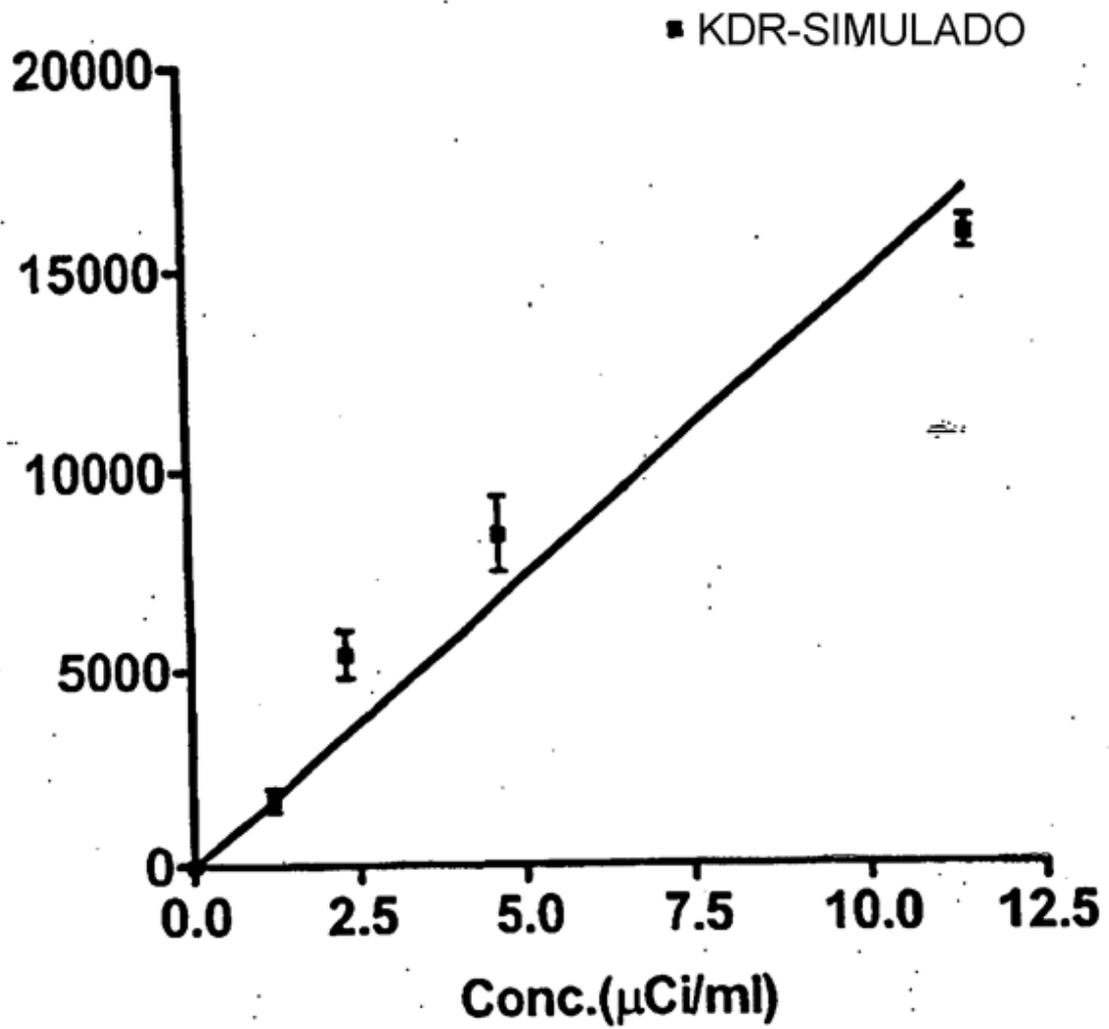
**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**

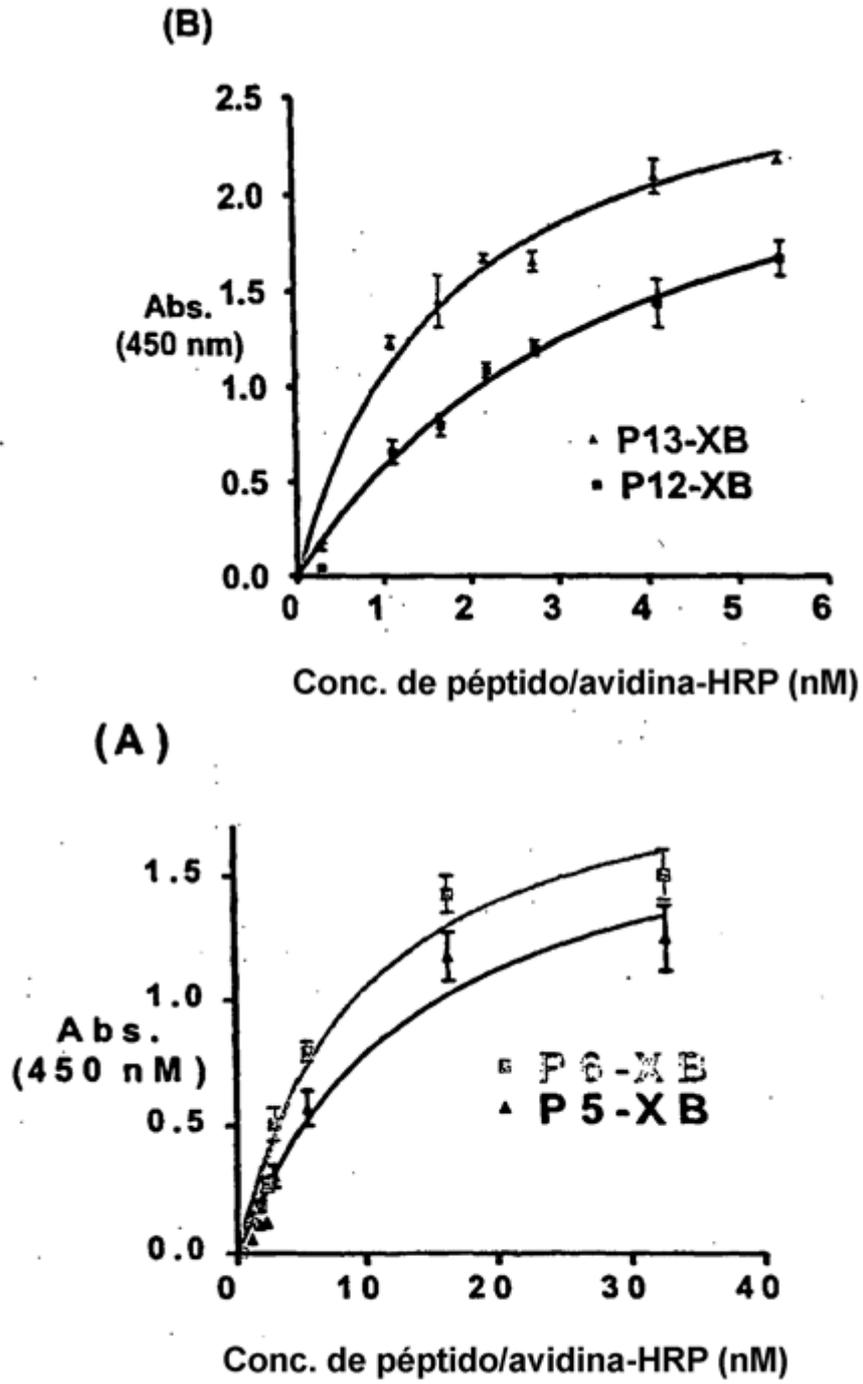
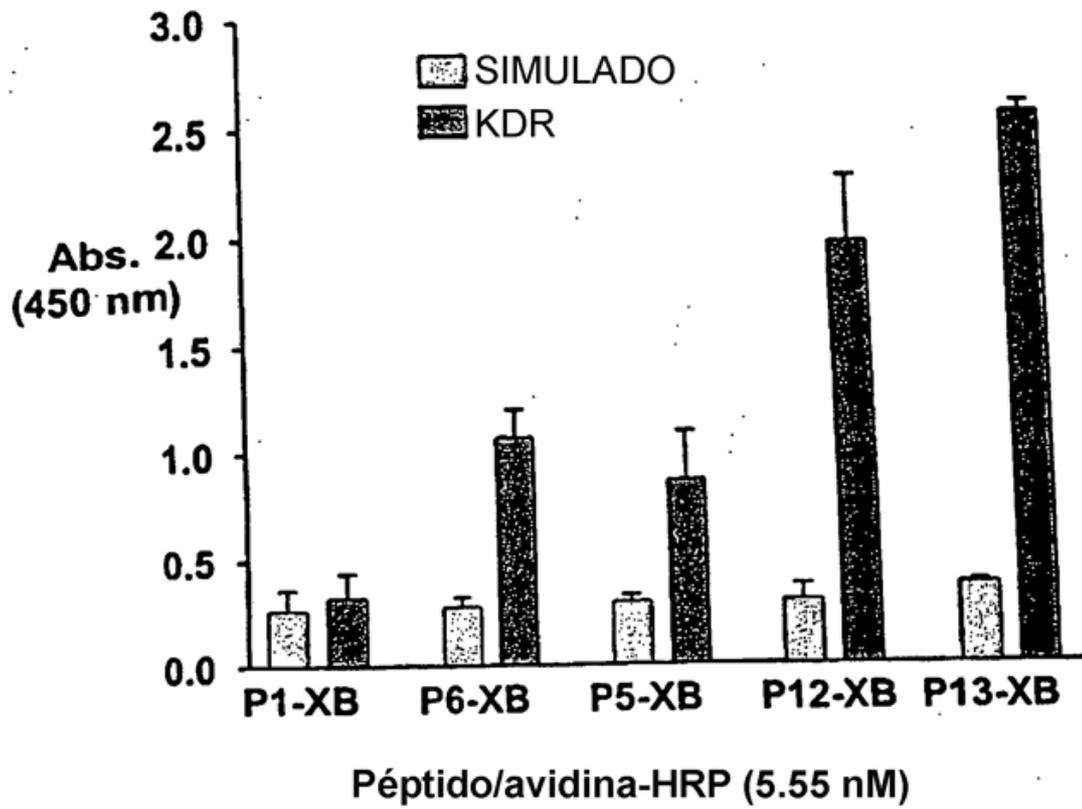
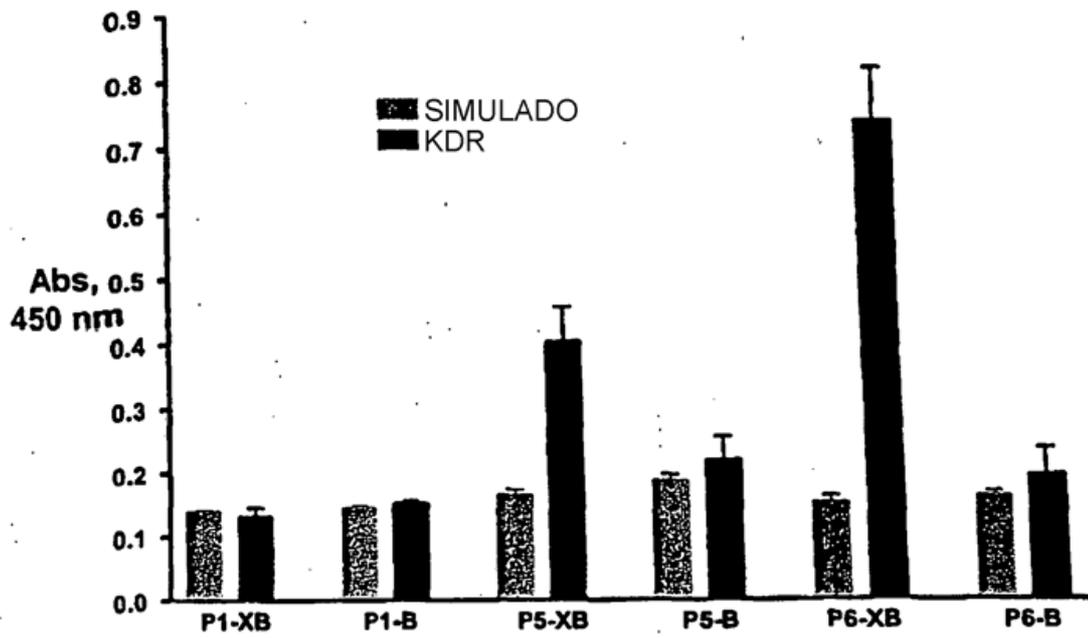


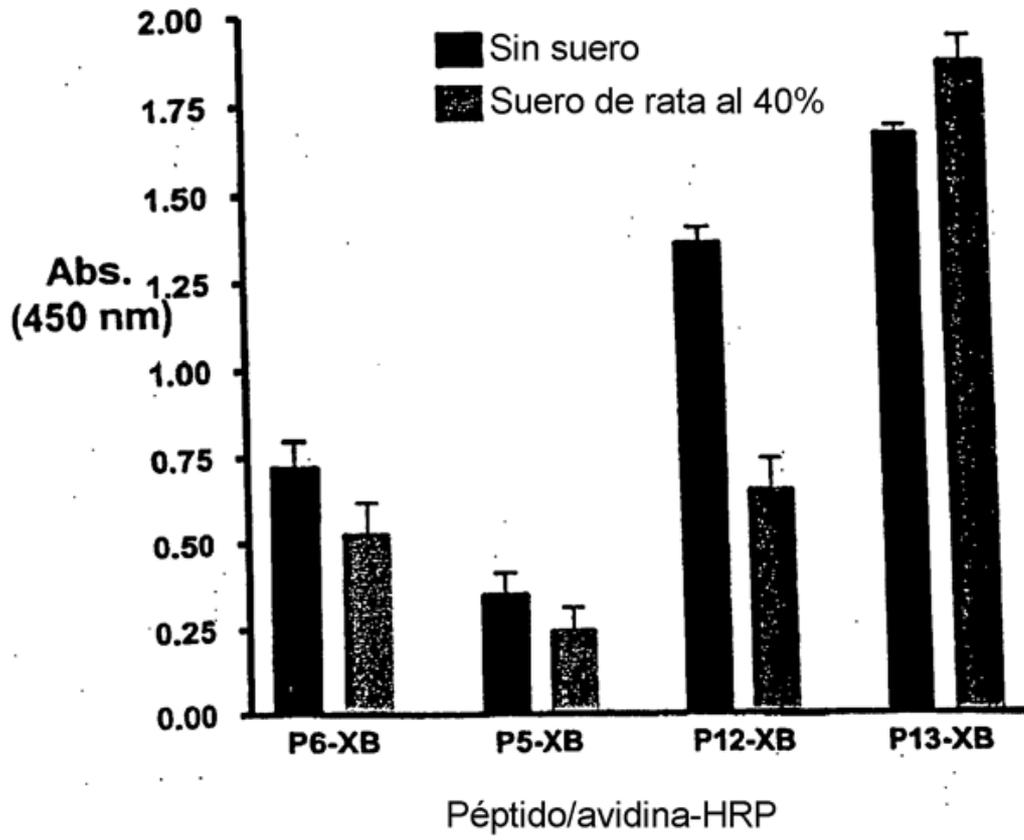
FIG. 8



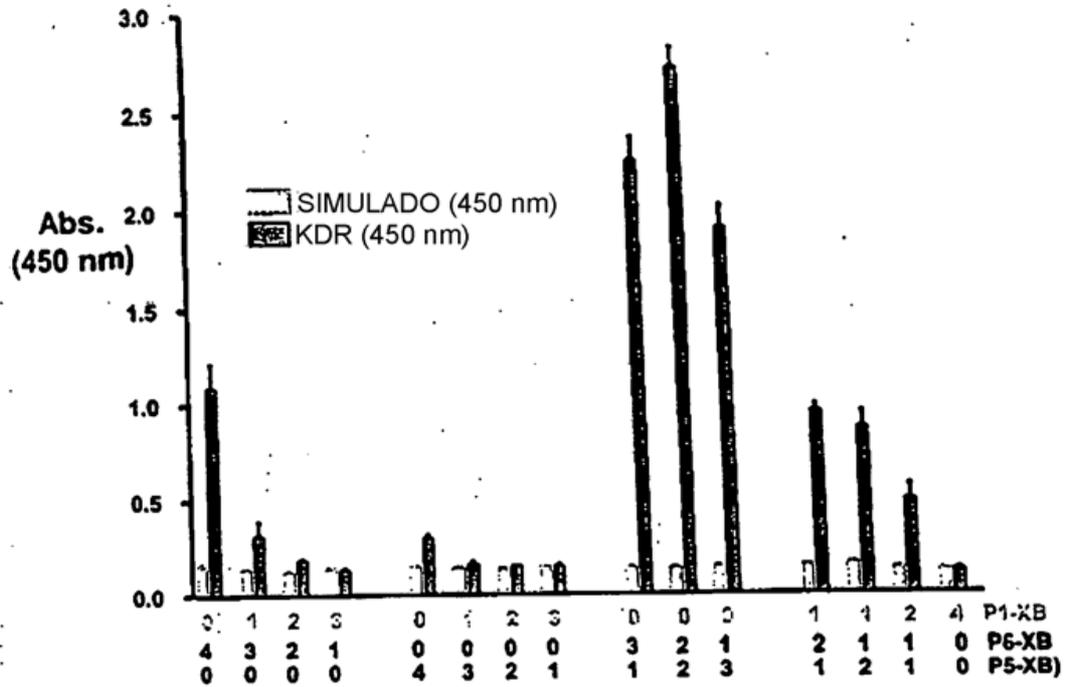
**FIG. 9**



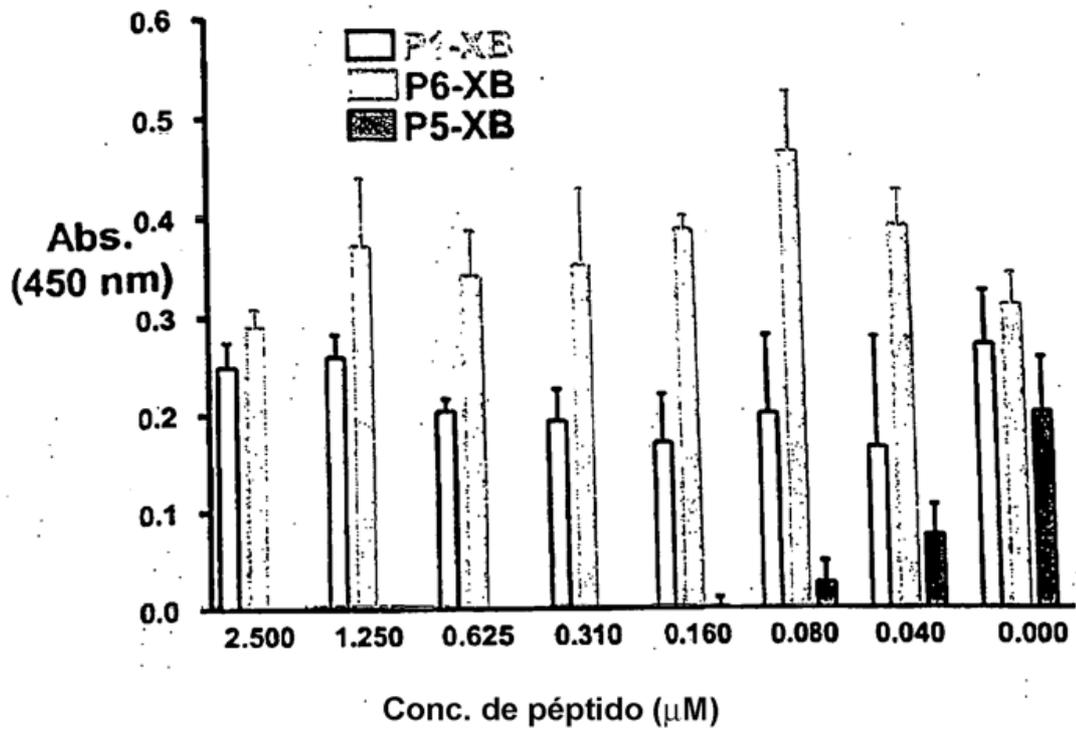
**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**



**FIG. 13**

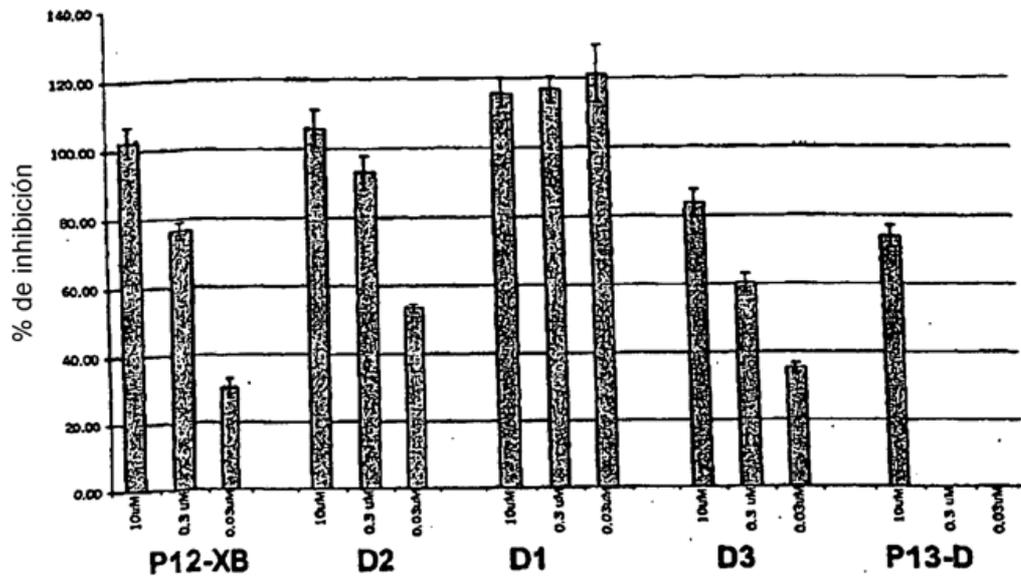
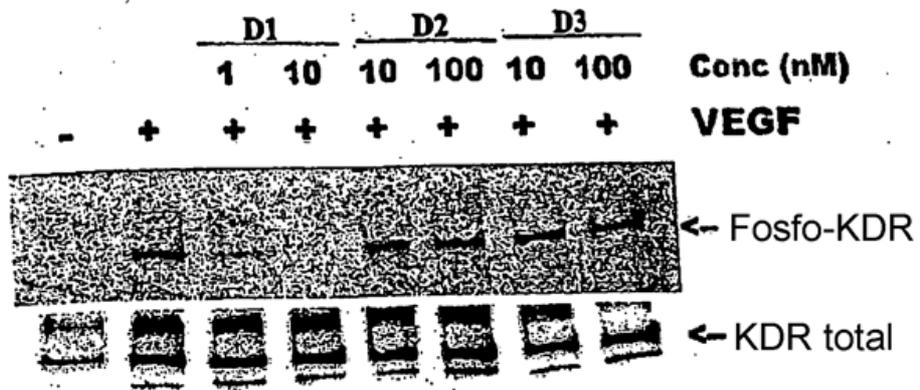
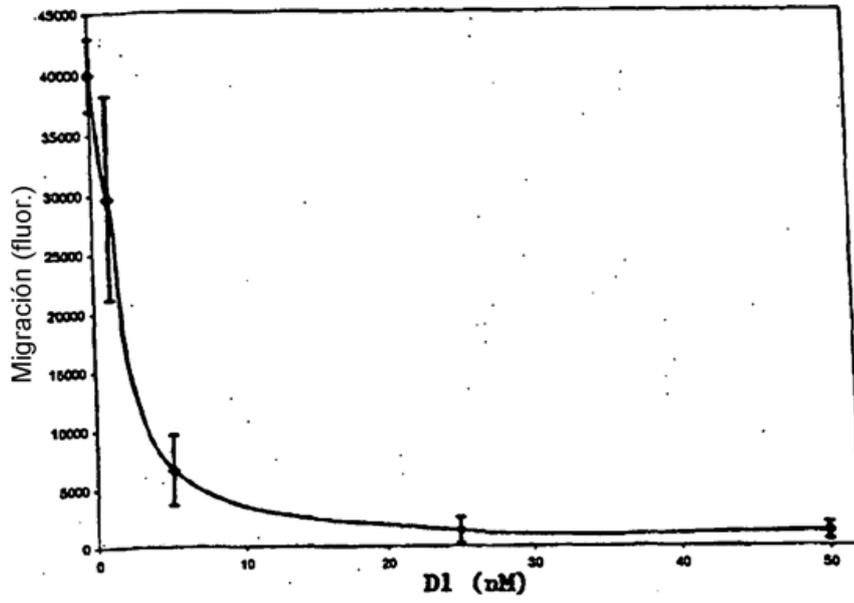


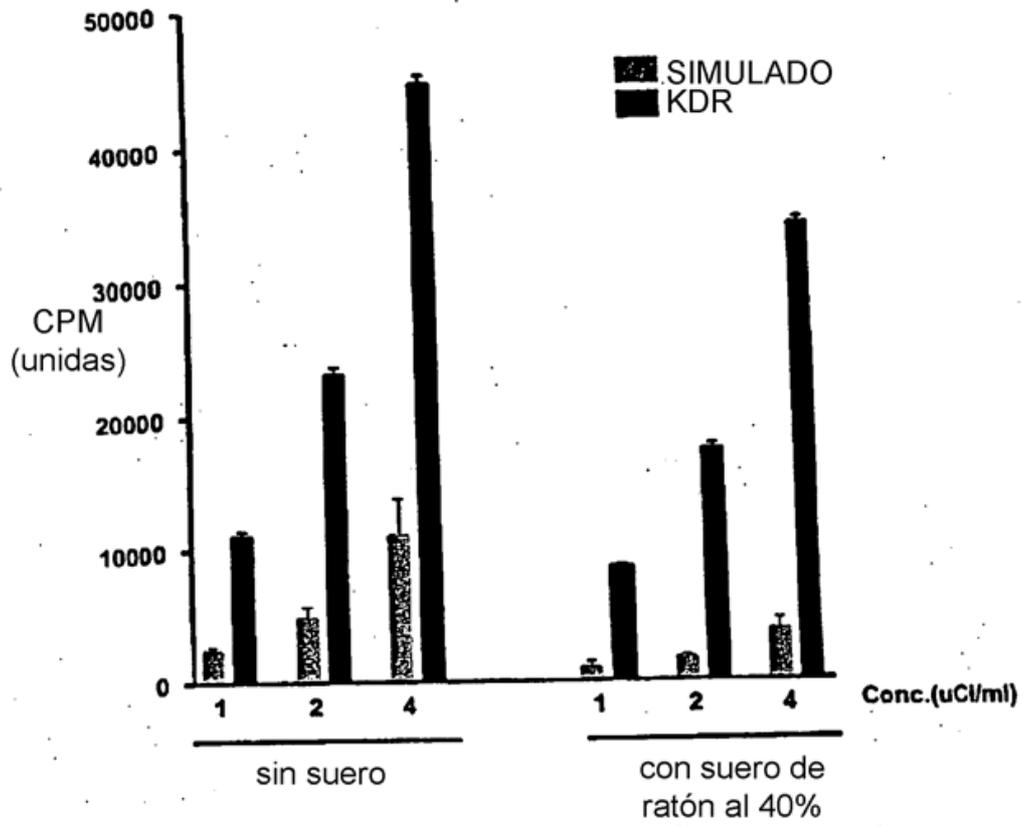
FIG. 14



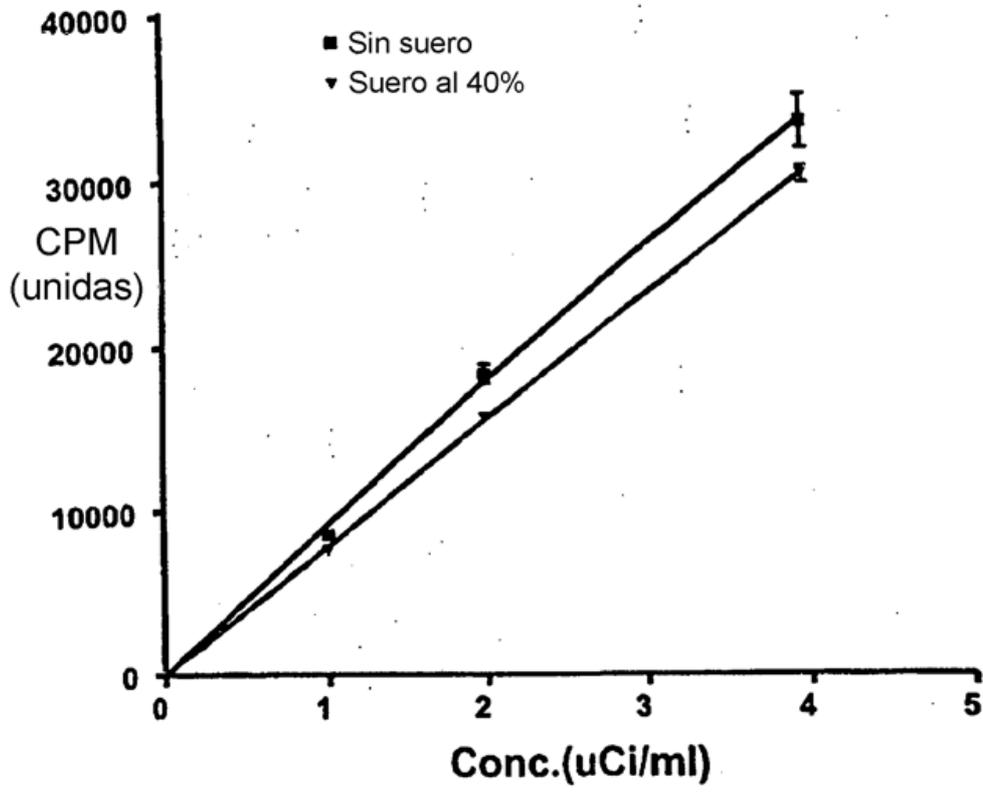
**FIG. 15**



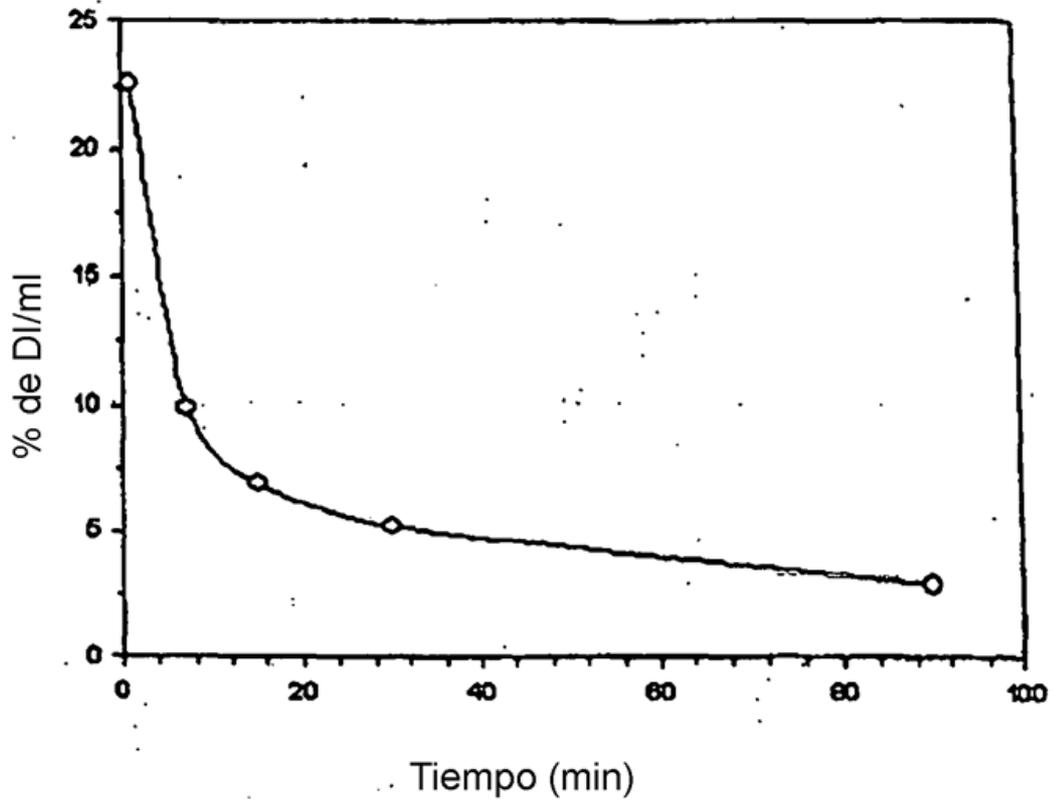
**FIG. 16**



**FIG. 17**

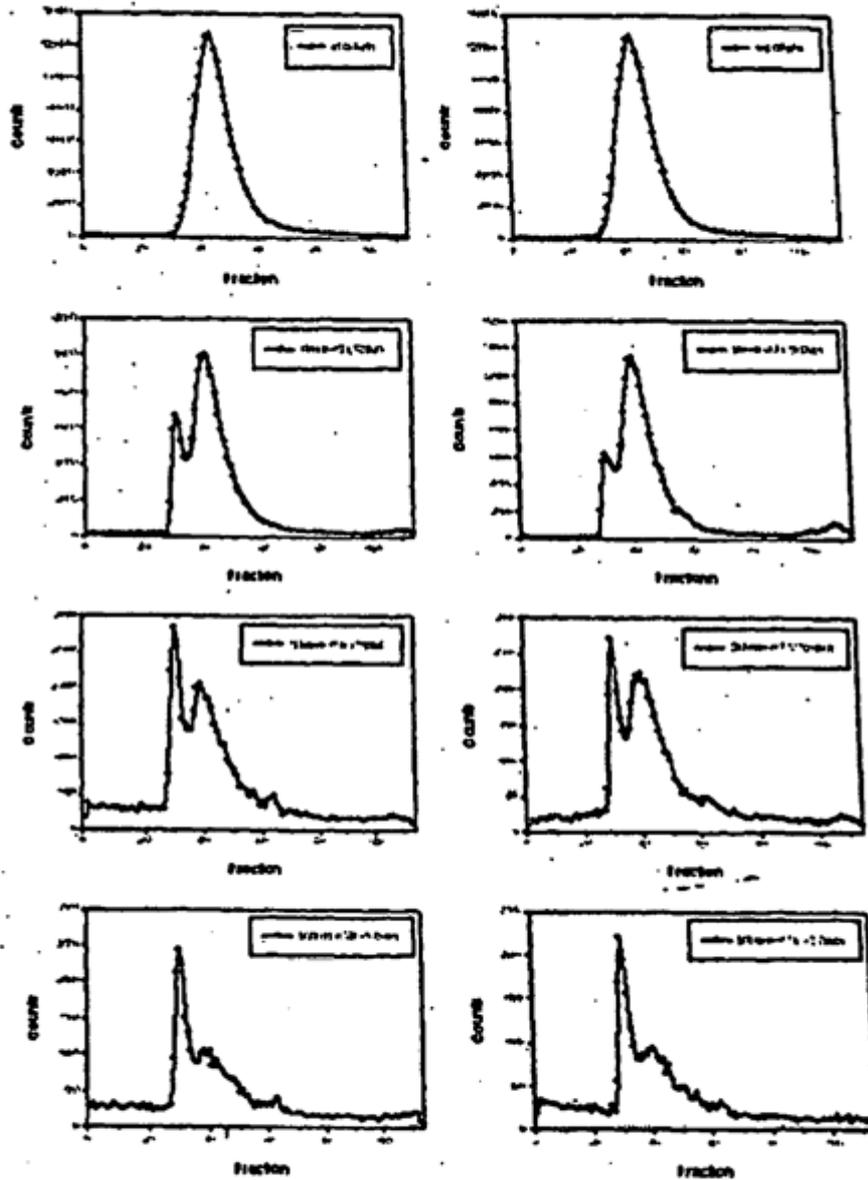


**FIG. 18**

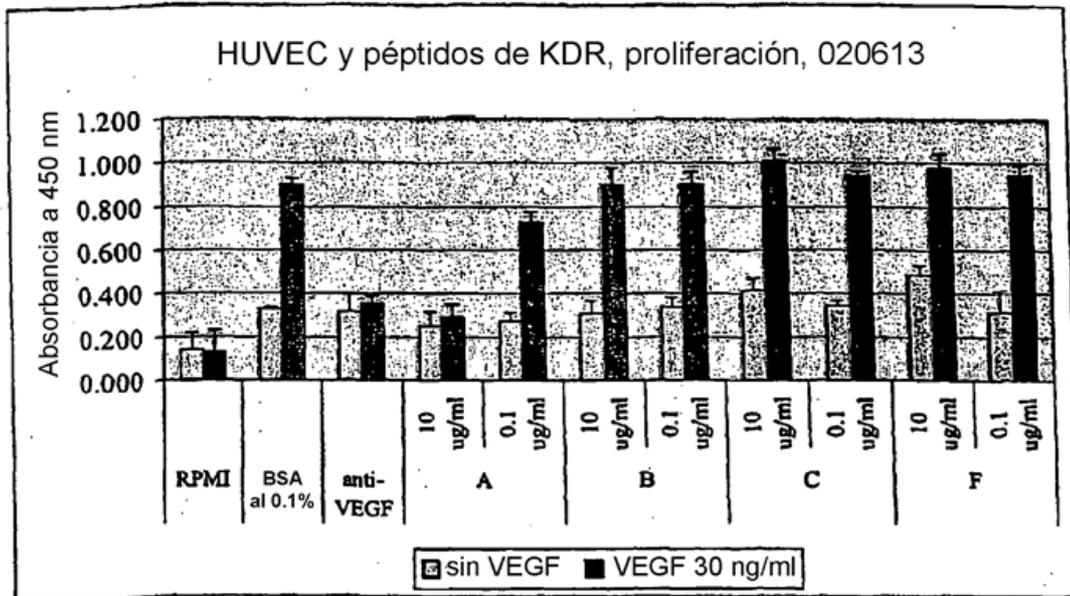


**FIG. 19**

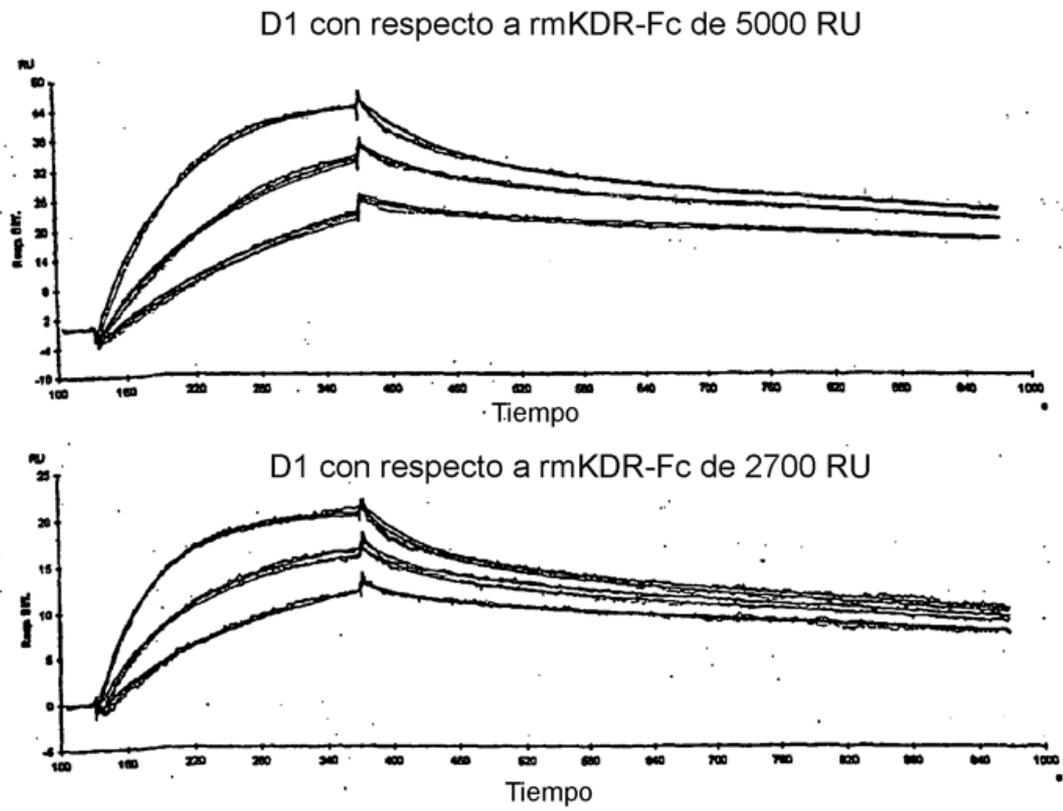
Cromatogramas de SEC de  $^{125}\text{I}$ -D6 en plasma de ratón



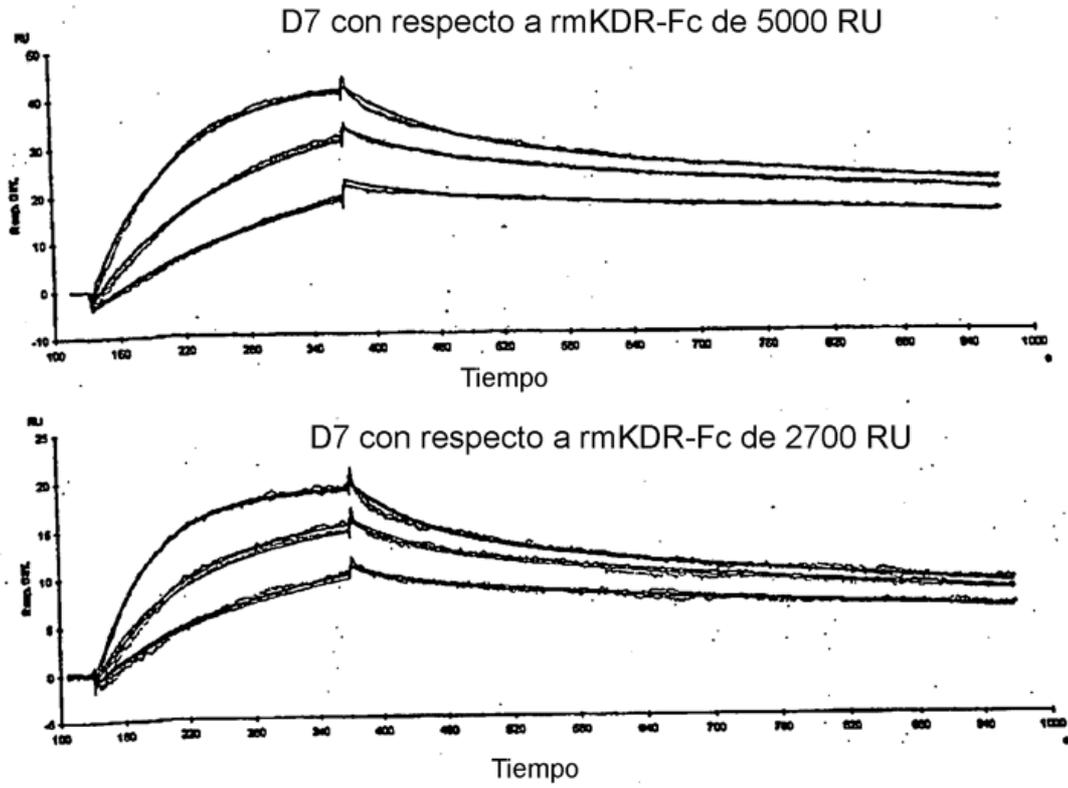
**FIG. 20**



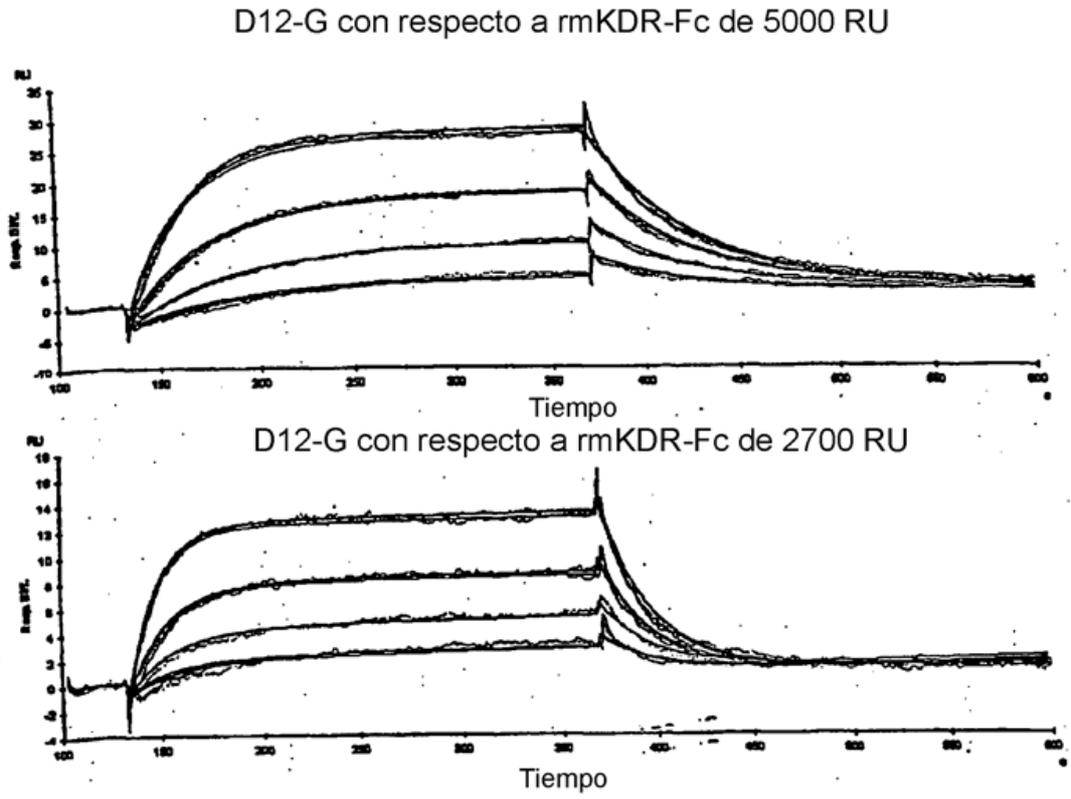
**FIG. 21**



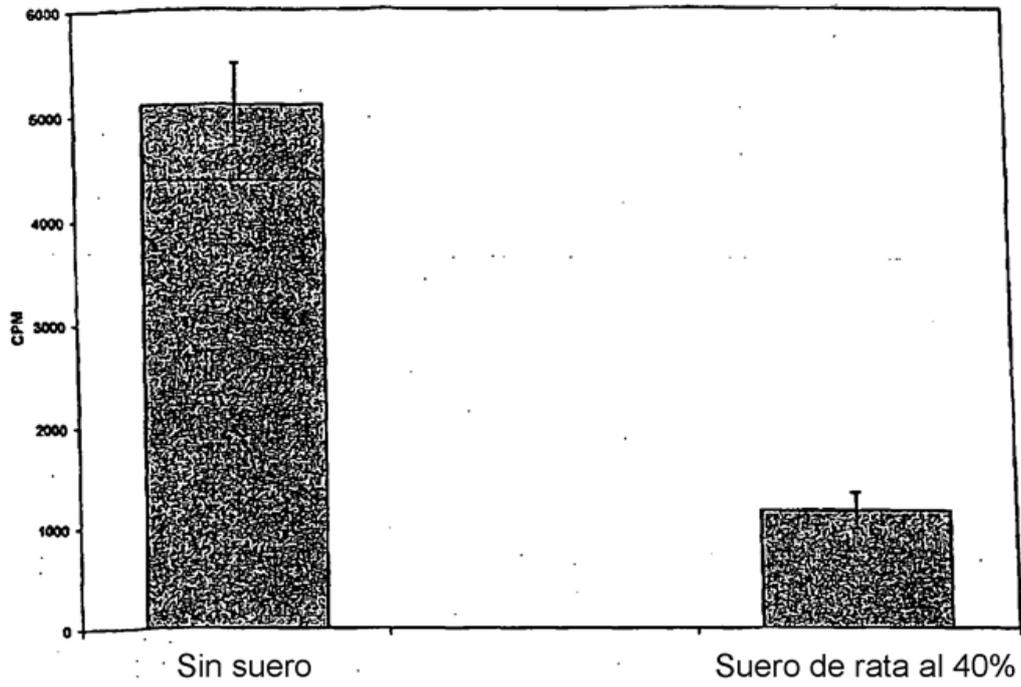
**FIG. 22**



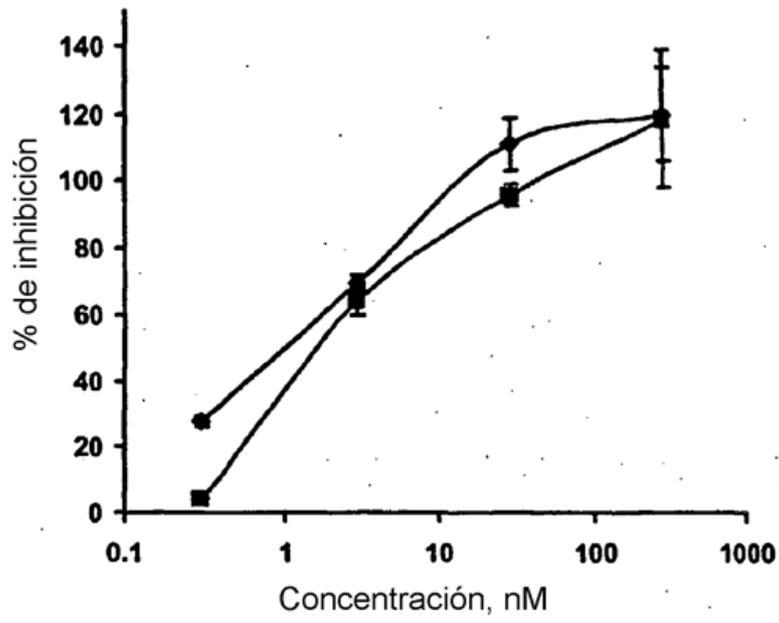
**FIG. 23**



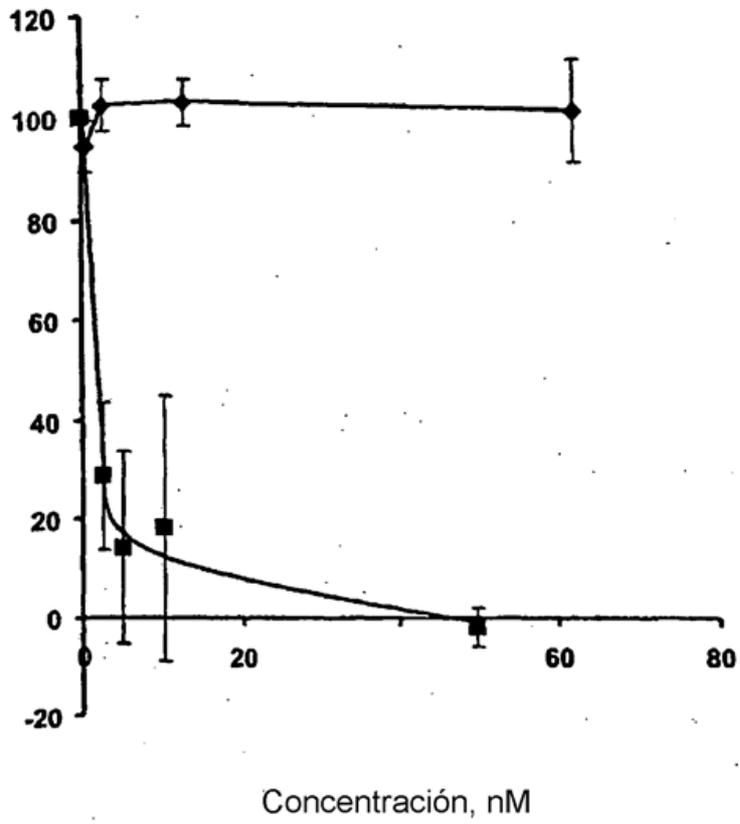
**FIG. 24**



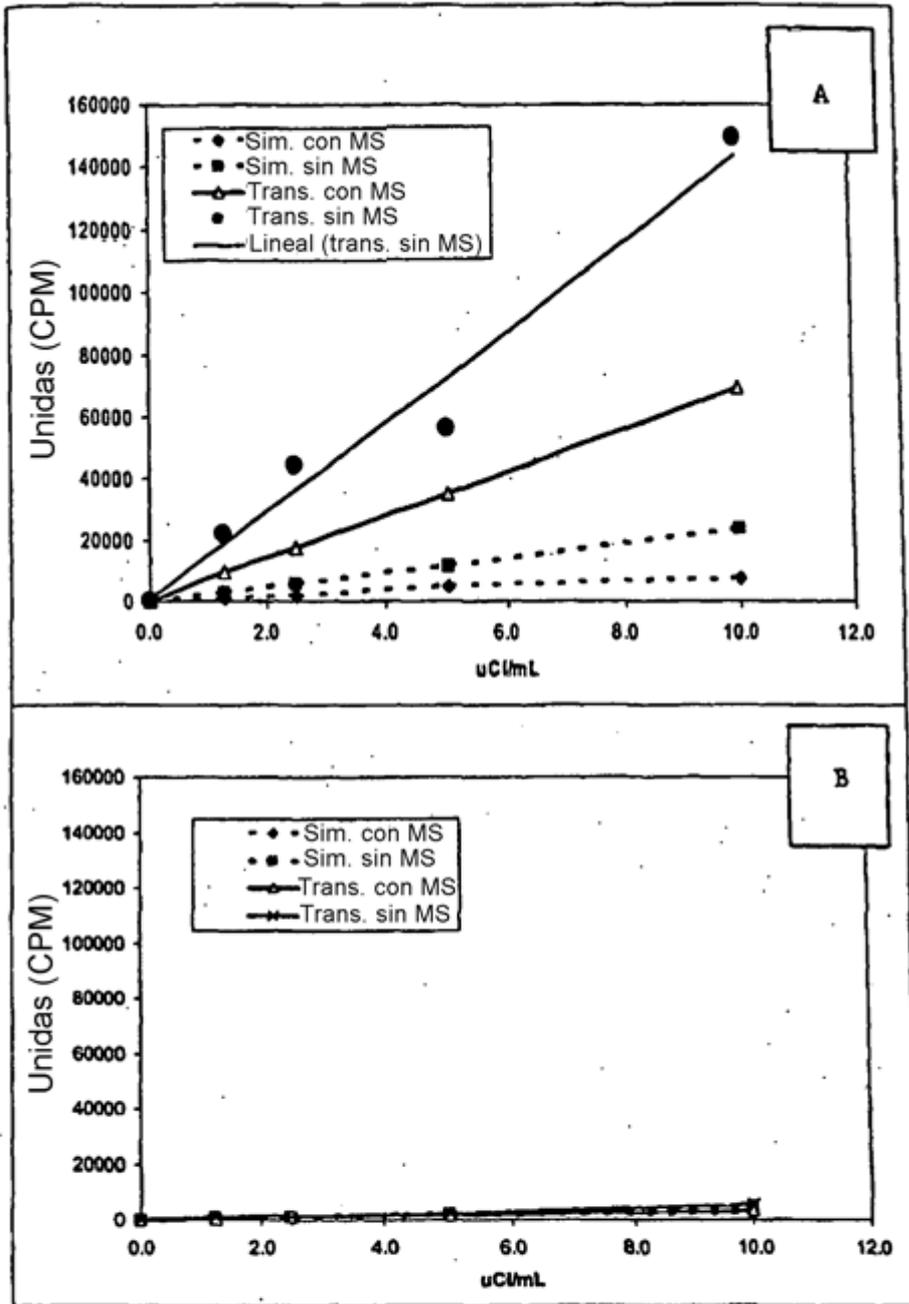
**FIG 25**



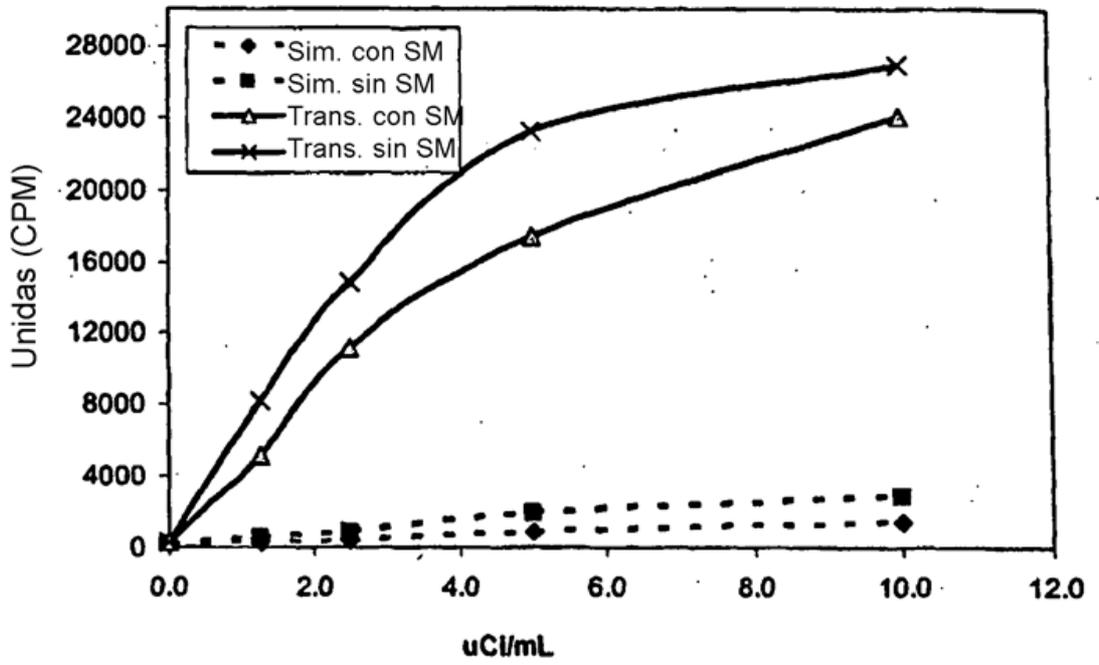
**FIG. 26**



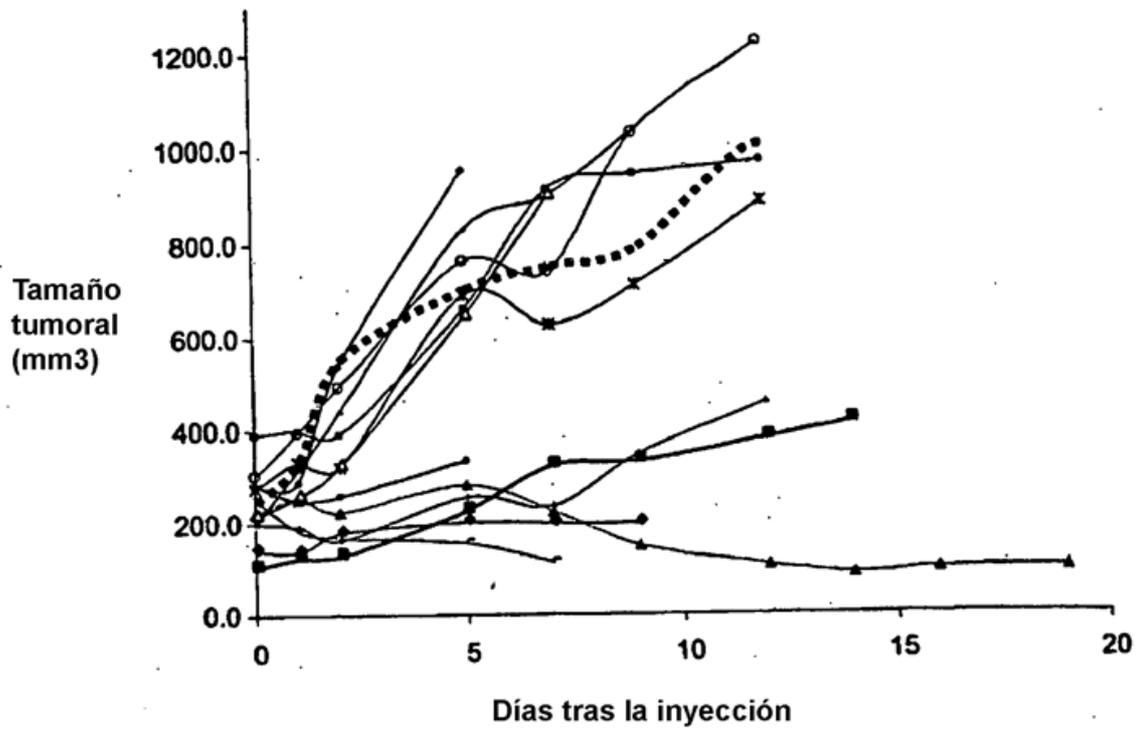
**FIG. 27**



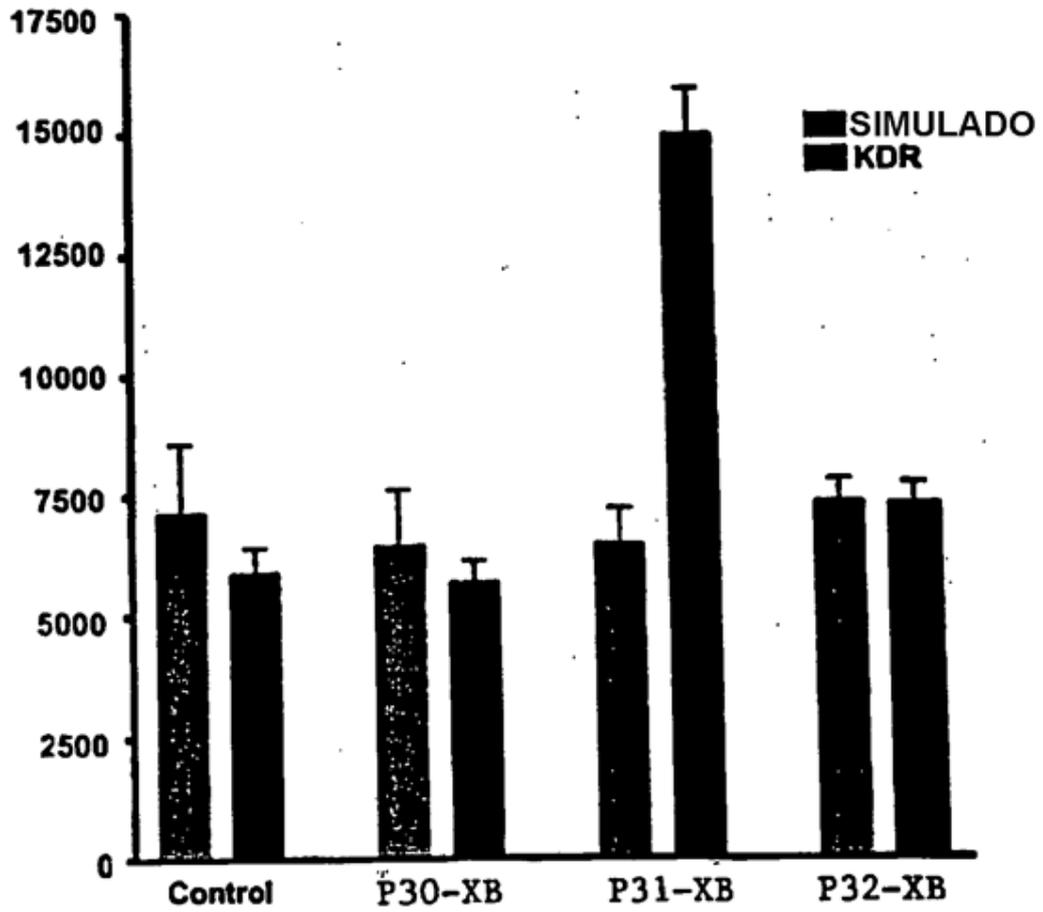
**FIG. 28**



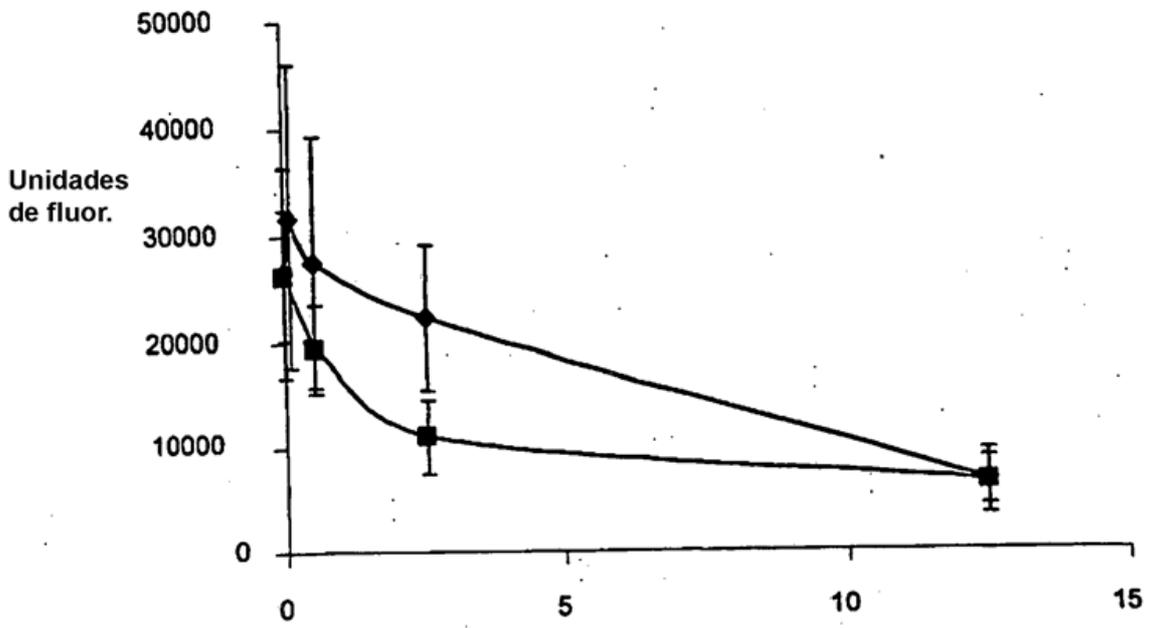
**FIG. 29**



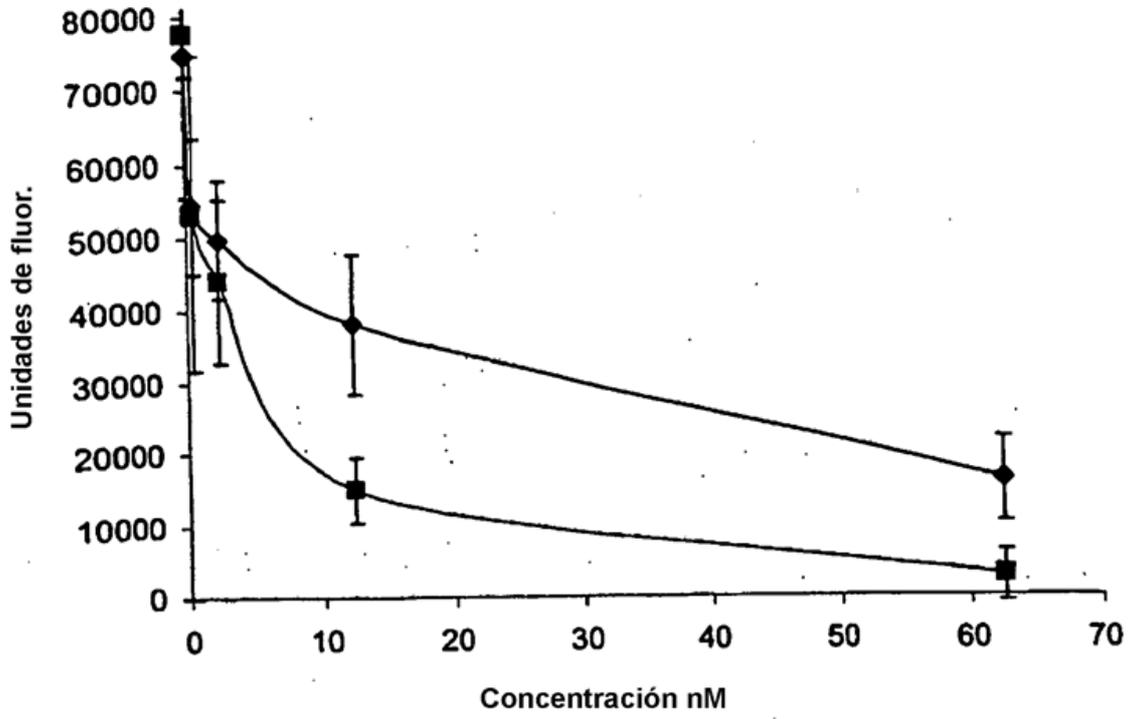
**FIG. 30**



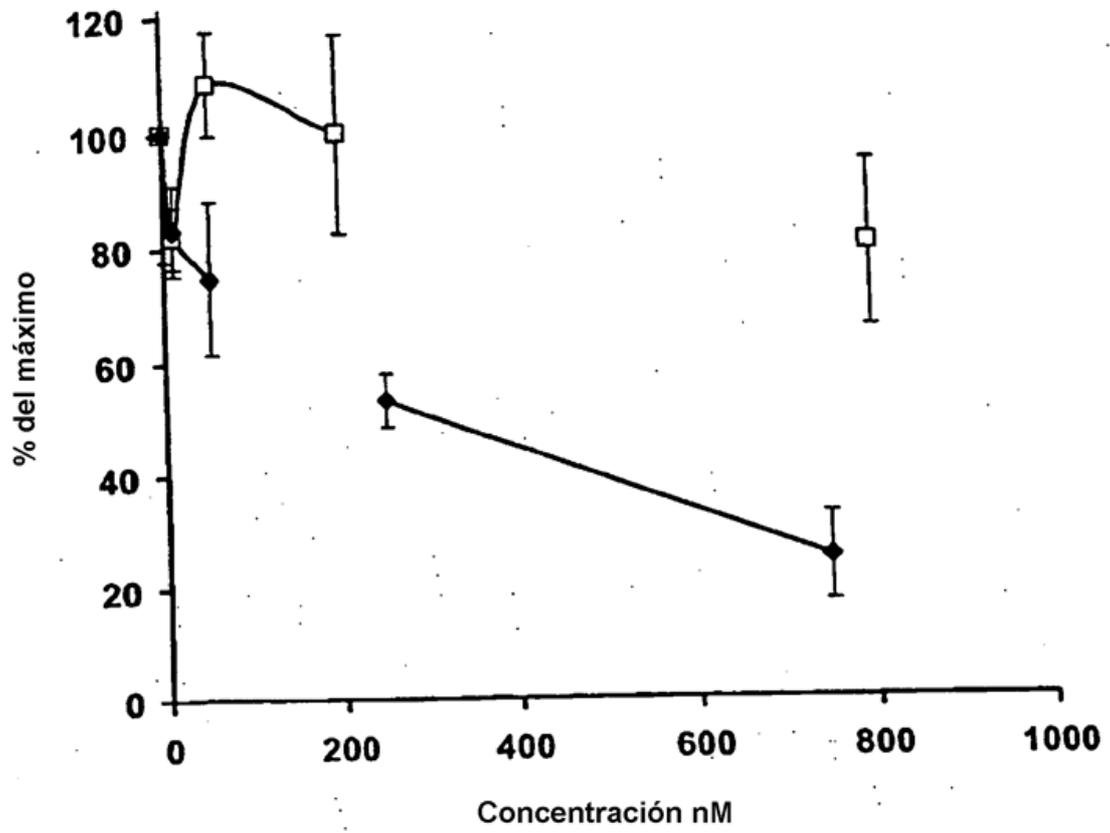
**FIG. 31**



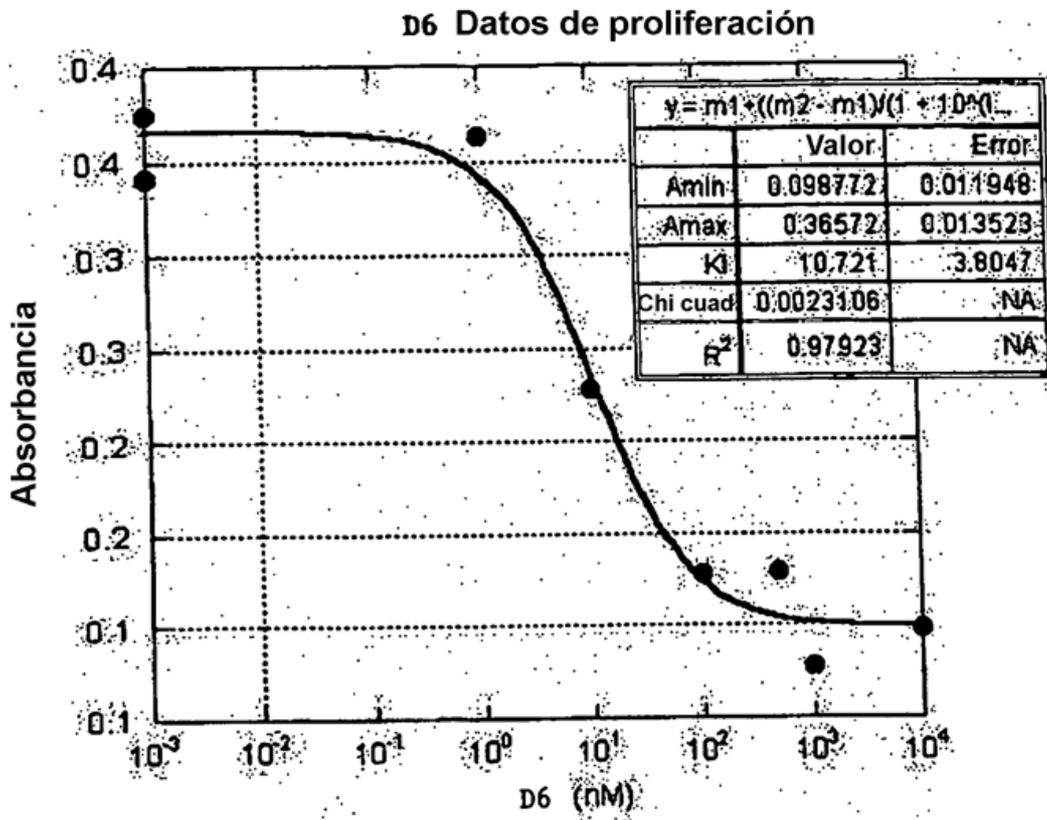
**FIG. 32**



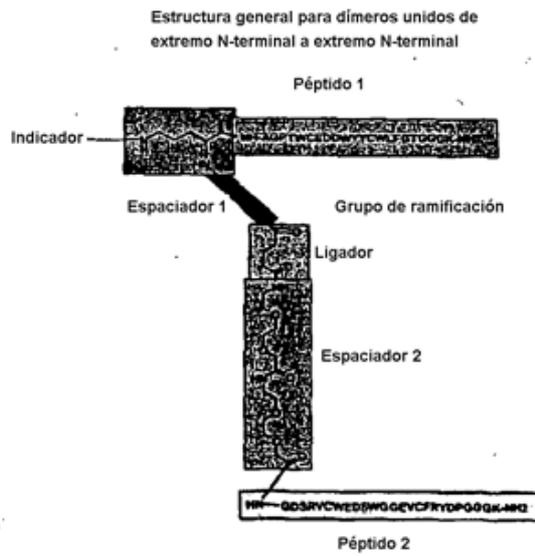
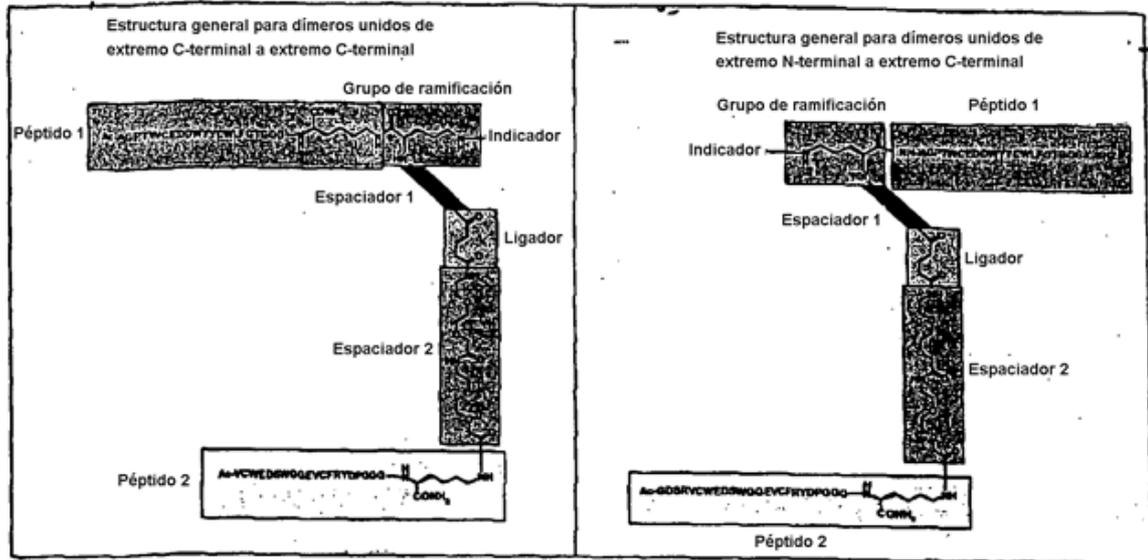
**FIG. 33**



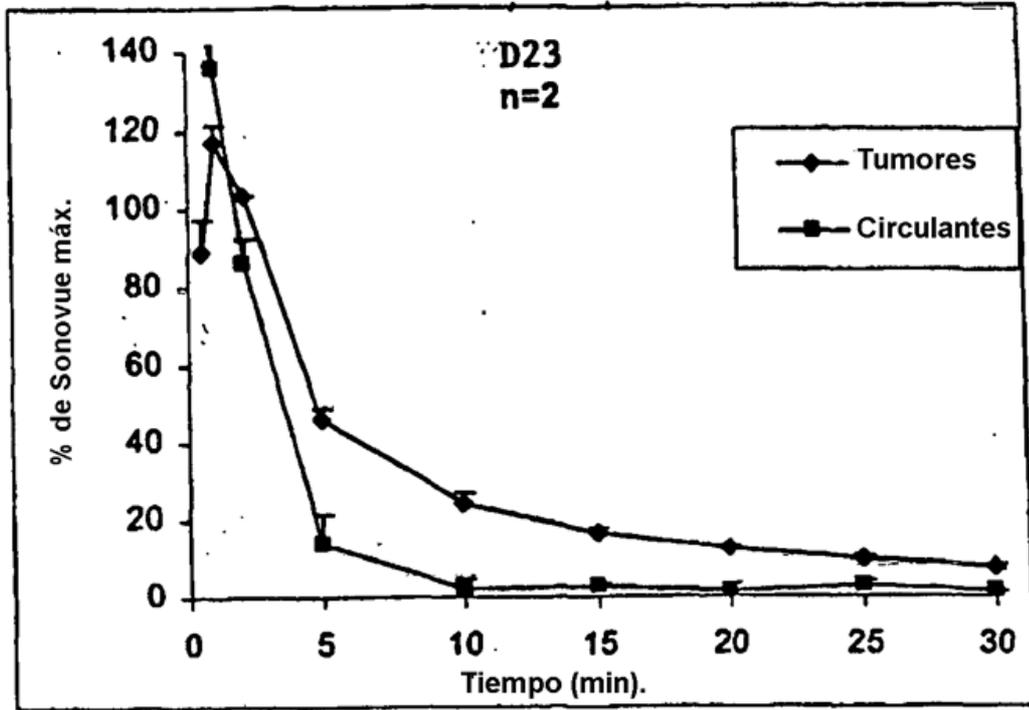
**FIG. 34**



**FIG. 35**



**FIG. 36**



**FIG. 37**