

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 377**

51 Int. Cl.:

C07K 5/10 (2006.01)

C07K 7/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2009 PCT/IL2009/000995**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010 WO10046900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2009 E 09774982 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2358737**

54 Título: **Peptidomiméticos que contienen RGD y sus usos**

30 Prioridad:

23.10.2008 US 107952 P

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

27.07.2017

73 Titular/es:

**STEBA BIOTECH S.A. (100.0%)
7 Place du Théâtre
2613 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**EREN, DORON;
YECHEZKEL, TAMAR;
SALITRA, YOSEPH y
KOUДИNOVA, NATALIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP, .

ES 2 627 377 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

Peptidomiméticos que contienen RGD y sus usos

Campo técnico

La presente invención se refiere a nuevos peptidomiméticos cíclicos que contienen arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) y sus usos, por ejemplo, en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Abreviaturas: **AcOH**, ácido acético; **Alloc**, Aliloxicarbonilo; **Bfeida**, Bacteriofoburo; **BTA**, (BPeide taurina amida), 3¹-oxo-15-metoxi carbonilmetil-rhodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil)amida; **BTC**, Carbonato de bis (triclorometilo); **Dab**, Ácido diaminobutírico; **Dap**, Ácido diaminopropiónico; **DCM**, Diclorometano; **Dde**, 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo; **DIC**, Diisopropilcarbodiimida; **DIEA**, Diisopropiletilamina; **DMBA**, Ácido dimetilbarbitúrico; **DMF**, N,N-dimetilformamida; **DMSO**, dimetilsulfóxido; **DOTA**, Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético; **DTPA**, Ácido dietilentriaminopentaacético; **Et₂O**, éter dietílico; **FITC**, Isotiocianato de fluoresceína; **Fmoc**, Fluorenilmetoxicarbonilo; **GABA**, Ácido γ -aminobutírico; **HATU**, Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-iel)-1,1,3,3-tetrametil-uronio; **HOAt**, 1-hidroxi-7-azabenzotriazol; **HOBt**, N-hidroxibenzotriazol; **Lys**, Lisina; **MeOH**, Metanol; **Nal**, Naftilalanina; **Orn**, Ornitina; **Pbf**, 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurano-5-sulfonilo; **PyBOP**, Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio; **RP-HPLC**, Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa; **TA**, temperatura ambiente; **TFA**, ácido trifluoroacético, **TFE**, Trifluoroetanol; **TIS**, Trisopropilsilano.

Técnica anterior

El motivo arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp; RGD) de componentes de la matriz extracelular (ECM) tales como fibronectina (Pierschbacher y Ruoslahti, 1984) y vitronectina se une a las integrinas (Ruoslahti y Pierschbacher, 1987; D'Souza SE *et al.*, 1991; Joshi *et al.*, 1993; Koivunen *et al.*, 1994). La adhesión mediada por las integrinas conduce a eventos de señalización intracelular que regulan la supervivencia, proliferación y migración celular. Se conocen aproximadamente 25 integrinas, y al menos ocho de ellas se unen al motivo RGD como la secuencia de reconocimiento primaria en sus ligandos.

Los datos obtenidos por los métodos de presentación en fagos (Pasqualini y Ruoslahti, 1996) para detectar a los péptidos que contienen RGD han mostrado su unión selectiva al revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos tumorales (Ruoslahti, 1996; Pasqualini *et al.*, 1997).

Debido a que la expresión de las integrinas es alta en las células endoteliales (ECs) activadas, pero más restringida en quiescentes, se han propuesto pequeños péptidos sintéticos que contienen RGD como antagonistas que afectan al crecimiento de las células endoteliales y tumorales vasculares. Los péptidos RGD también retardan la transmisión de señales, afectan la migración celular e inducen a la regresión o la apoptosis de las células tumorales (Su *et al.*, 2002). Los RGD-análogos se utilizan en la visualización de tumores (Haubner *Et al.*, 2001), enfoques anti-angiogénesis (Kawaguchi *et al.*, 2001; Pasqualini *et al.*, 2000), y en el reconocimiento tumoral de radionucleótidos (van Hagen *et al.*, 2000) y fármacos quimioterapéuticos (Arap *et al.*, 1998; Zitzmann *et al.*, 2002).

Las integrinas también se expresan en células cancerosas y juegan un papel importante en la invasión, metástasis, proliferación y apoptosis de las células cancerosas. La invasión metastásica de las células tumorales en órganos preferidos puede representar fenómenos de localización celular que dependen de la interacción adhesiva entre las células tumorales y los marcadores endoteliales específicos de órganos (Ruoslahti y Rajotte, 2000). Al unirse a la integrina de las células endoteliales o tumorales, los péptidos RGD son capaces de modular *in vivo* el tráfico celular mediante la inhibición de uniones de células tumorales-ECM y células tumorales-EC, que son obligatorias para los procesos metastásicos. Varios estudios han indicado que los compuestos que contienen RGD pueden interferir con los procesos metastásicos de las células tumorales *in vitro* (Goligorsky *et al.*, 1998; Romanov y Goligorsky 1999) y *in vivo* (Saiki *et al.*, 1989; Hardan *et al.*, 1993).

Los péptidos que son específicos para las integrinas individuales son de considerable interés y de posible significación médica. La integrina $\alpha_v\beta_3$ fue la primera integrina que se demostró que estaba asociada con la angiogénesis tumoral. Los péptidos RGD que bloquean específicamente la integrina $\alpha_v\beta_3$ son prometedores como inhibidores de la angiogénesis tumoral y retiniana, de la osteoporosis y en la administración selectiva de fármacos a la vasculatura tumoral (Assa-Munt *et al.*, 2001). El acoplamiento del fármaco anticancerígeno doxorubicina o un péptido proapoptótico a un péptido RGD de unión a la integrina $\alpha_v\beta_3$ produce compuestos que son más activos y menos tóxicos que los fármacos no modificados cuando se prueban frente a tumores de xenoinjerto en ratones (Ruoslahti, 2000; Arap *et al.*, 1998; Arap *et al.*, 2002; Ellerby *et al.*, 1999). En consecuencia, se ha invertido una gran cantidad de trabajo en el diseño y producción de péptidos y peptidomiméticos que se unen a las integrinas (Haubner *et al.*, 1996; Locardi *et al.*, 1999; Alondra *et al.*, 1999; Raboisson *et al.*, 2006; Belvisi *et al.*, 2005; Dijkgraaf *et al.*, 2006; Banfi *et al.*, 2007; documento de EE.UU. 5.849.692).

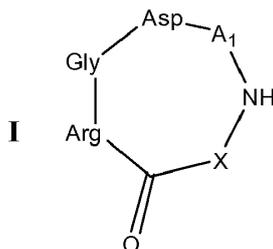
El documento de EE.UU. 6.576.239, y los documentos EP 0927045 y WO 98/010795 describen un conjugado que comprende un péptido orientado tumoral que comprende la secuencia de aminoácidos RGD o NGR, estando dicho péptido unido a un resto terapéutico o diagnóstico, siempre que dicho resto no sea una partícula fágica. El resto

terapéutico puede ser un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico para el cáncer tal como doxorrubicina. El conjugado se aloja selectivamente en la vasculatura angiogénica bajo la administración *in vivo*. El péptido orientado tumoral puede ser un péptido lineal o cíclico de hasta 20 ó 30 aminoácidos o de 50-100 aminoácidos de longitud. Un péptido preferido es el nonapéptido cíclico CDCRGDCFC o H-Cys*-Asp-Cys*-**Arg-Gly-Asp**-Cys*-Phe-Cys*-NH₂.

- 5 El documento WO 2008/023378 describe un conjugado de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y un fotosensibilizador seleccionado de una porfirina, una clorofila o una bactericlorofila.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un peptidomimético cíclico que contiene RGD de la fórmula general I:



10

en donde

el resto de arginina está unido por su grupo α -amino a la cadena principal C=O;

X es -NH-R-, -O-R-, o -S-R-, en donde R es un radical hidrocarbilo derivado de etano, eteno o ciclopropano; y

- 15 A₁ es un resto de aminoácido que lleva un grupo amino en su cadena lateral, unido por su grupo carboxilo al esqueleto NH y por su grupo amino de cadena lateral al grupo α -carboxilo del residuo de ácido aspártico, dicho aminoácido se selecciona de ácido diaminopropiónico (Dap), ornitina (Orn) o lisina (Lys).

- En otro aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado del peptidomimético cíclico que contiene RGD definido anteriormente y un resto de una carga útil seleccionada de una sonda fluorescente, un fotosensibilizador, un agente quelante o un agente citotóxico, unido al grupo α -amino del residuo aminoácido A₁ en el peptidomimético, opcionalmente a través de un espaciador.
- 20

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de un peptidomimético cíclico que contiene RGD y un resto de carga útil como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para diversos fines, por ejemplo, (i) con fines diagnósticos, en particular, para la visualización de órganos y tejidos y para el diagnóstico de tumores, cuando la carga útil es una sonda fluorescente; (ii) para terapia fotodinámica (PDT), en particular, para PDT de tumores o tejidos no neoplásicos, cuando la carga útil es un fotosensibilizador; (iii) para radiodiagnóstico por imágenes o radioterapia, cuando la carga útil es un agente quelante; y (iv) para quimioterapia dirigida, cuando la carga útil es un agente citotóxico.
- 30

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de un peptidomimético cíclico que contiene RGD y un resto de carga útil como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con fines diagnósticos, terapia fotodinámica (PDT), radiodiagnóstico por imágenes o radioterapia, o quimioterapia dirigida.

35 Breve descripción de los dibujos

- Las **Figs. 1A - 1C** muestran los patrones de acumulación de los conjugados **1**, **4** y **41** (Referencia) (**1A**, **1B** y **1C**, respectivamente) en un tumor principal primario ortotópico MDA-MB-231-RFP de mama humana en la almohadilla mamaria de ratones desnudos CD-1. Los ratones fueron tratados como se describe en Materiales y Métodos, y la fluorescencia tanto de las células tumorales como del conjugado se monitorizaron desde el día 1 hasta el 7 utilizando el sistema Xenograph IVIS[®] (escala de color en unidades de fotón/s/cm²/estereorradián). El panel superior muestra las señales fluorescentes generadas por el tumor (imagen de fluorescencia roja) y el panel inferior muestra la señal fluorescente generada por el conjugado (imagen de fluorescencia de infrarrojo cercano). La coincidencia de las señales generadas por el tumor y por el conjugado sugiere la acumulación del conjugado en los tumores.
- 40

- Las **Figs. 2A-2C** muestran la acumulación de los conjugados **1**, **4** y **41** (Referencia) (**2A**, **2B** y **2C**, respectivamente) en el área necrótica de un tumor de cáncer de mama. Los ratones se trataron como se

describe en Materiales y Métodos, y la fluorescencia se monitorizó seis días después de la inyección usando el sistema Xenograph IVIS[®] (escala de color en unidades de fotón/s/cm²/estereorradián). Como se muestra, la zona necrótica en la parte central del tumor suprime la fluorescencia roja (panel izquierdo) pero muestra la acumulación del conjugado (panel derecho).

5 Las **Figs. 3A-3C** muestran la acumulación de conjugados **1**, **4** y **41** (Referencia) (**3A**, **3B** y **3C**, respectivamente) en un tumor de cáncer de próstata LNCaP en comparación con un tumor de ovario MLS. Los ratones se trataron como se describe en Materiales y Métodos, y la acumulación del conjugado en el tumor implantado se monitorizó en ciertos momentos (8, 11, 14, 24 y 48 horas para el conjugado **1**; 8,14, 24 y 48 h para el conjugado **4**; y 8, 12 y 24 h para el conjugado **41**) después de la inyección usando el sistema Xenograph IVIS[®]. Los perfiles de acumulación de los conjugados en los tumores de próstata (panel superior) y ovárico (panel inferior) fueron casi los mismos, en los que en ambos casos, el nivel de fluorescencia más alto se observó a 8-11 (conjugado **1**), 8-14 (conjugado **4**) o 8-12 (conjugado **41** (Referencia)) horas después de la inyección y el conjugado permaneció en el tumor hasta 48 horas en el caso de los conjugados **1** y **4**, o 24 horas en el caso del conjugado **41** (Referencia). La flecha en la parte superior izquierda muestra el lugar del tumor de próstata. La imagen de la derecha en cada panel muestra los órganos excitados 14 horas después de la inyección, donde el alto nivel de fluorescencia observado en el hígado y el riñón sugiere la eliminación del conjugado a través de estos órganos.

Modos para realizar la invención

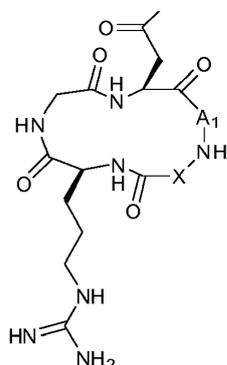
20 En un aspecto, la presente invención proporciona nuevos peptidomiméticos cíclicos que contienen arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp; RGD), que son ligandos de la integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, como se ha definido anteriormente.

25 Las expresiones "peptidomimético cíclico que contiene RGD", "peptidomimético cíclico" y "ligando de integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ " utilizado en este documento se refiere indistintamente a un compuesto cíclico no peptídico que contiene la secuencia RGD, también denominada motivo RGD, que imita a los péptidos que tienen el motivo RGD. El peptidomimético cíclico de la presente invención puede ser cualquier compuesto cíclico que tenga la fórmula general I, como se definió anteriormente.

30 Como se muestra en detalle en el **Esquema 1** en lo sucesivo en este documento, el peptidomimético cíclico que contiene RGD de fórmula general I es un compuesto cíclico que contiene el motivo RGD, en el cual un residuo de un aminoácido que tiene un grupo amino de cadena lateral (A_1) está unido por enlaces amida, a través de su grupo amino de cadena lateral al grupo α -carboxilo del residuo de ácido aspártico en el motivo RGD por un lado, y a través de su grupo carboxilo a una cadena principal NH en el otro lado, y dicho NH está unido al grupo α -amino del residuo de arginina en el motivo RGD a través de varias unidades de puente posibles.

El término "hidrocarbilenos" se refiere a un radical divalente que contiene solamente átomos de carbono e hidrógeno que pueden ser saturados o insaturados, cíclicos o acíclicos, que pueden derivarse de etano, eteno o ciclopropano.

Esquema 1: Estructuras detalladas del peptidomimético cíclico de fórmula general I



35 En el grupo NHR, R es un hidrocarbilenos como se ha definido anteriormente.

El término "aminoácido" se refiere tanto a aminoácidos naturales como a no naturales en sus estereoisómeros L y D, e incluye aminoácidos que tienen un grupo amino de cadena lateral, más particularmente lisina (Lys), ácido diaminopropiónico (Dap) y ornitina (Orn).

40 En una realización, el peptidomimético cíclico que contiene RGD de la presente invención es un compuesto cíclico de la fórmula general I, en la que X es -NH-R-, es decir, se forma un resto de urea con el grupo α -amino del residuo de arginina, y R es un hidrocarbilenos derivado de etano, eteno o ciclopropano.

En otra realización, el peptidomimético cíclico que contiene RGD de la presente invención es un compuesto cíclico de la fórmula general I, en la que X es -OR-, es decir, se forma un resto carbamato con el grupo α -amino del residuo de arginina y R es un hidrocarbilenos derivado de etano, eteno o ciclopropano.

- 5 En otra realización más, el peptidomimético cíclico que contiene RGD de la presente invención es un compuesto cíclico de la fórmula general I, en la que X es -S- o -SR-, es decir, se forma un resto carbamotio con el grupo α -amino del resto de arginina, y R es un hidrocarbilenos derivado de etano, eteno o ciclopropano.

Los peptidomiméticos cíclicos que contienen RGD de la presente invención se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en Materiales y Métodos a continuación.

- 10 En ciertas realizaciones preferidas, el peptidomimético cíclico que contiene RGD de la presente invención es un compuesto cíclico de la fórmula general I, en la que X es -NH-R-, R es un hidrocarbilenos derivado de etano y A₁ es Dap, Orn o Lys.

En otras realizaciones preferidas, el peptidomimético cíclico que contiene RGD de la presente invención es un compuesto cíclico de la fórmula general I, en la que X es -NH-R-, R es un hidrocarbilenos derivado de ciclopropano y A₁ es Orn.

- 15 En otras realizaciones preferidas, el peptidomimético cíclico que contiene RGD de la presente invención es un compuesto cíclico de la fórmula general I, en la que X es -O-R-, R es un hidrocarbilenos derivado de etano y A₁ es Dap o Lys.

- 20 Los ligandos de integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ de la presente invención se acumulan en tumores que expresan $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ tales como carcinoma de ovario, cáncer de colon, mama y próstata, y por lo tanto pueden usarse tanto en métodos diagnósticos como terapéuticos por conjugación con varios restos de "carga útil".

En otro aspecto, la presente invención se refiere así a un conjugado de un peptidomimético cíclico que contiene RGD definido anteriormente, es decir, un peptidomimético cíclico de la fórmula general I y un resto de una carga útil seleccionado de una sonda fluorescente, un fotosensibilizador, un agente quelatante o un agente citotóxico, unido al grupo α -amino del residuo de aminoácido A₁ en el peptidomimético opcionalmente a través de un espaciador.

- 25 En una realización, el resto de carga útil del conjugado está unido directamente al residuo de aminoácido A₁ del peptidomimético cíclico.

En otra realización, el resto de carga útil está unido al residuo de aminoácido A₁ del peptidomimético cíclico a través de un espaciador.

- 30 El espaciador que se une el resto de carga útil con el residuo de aminoácido A₁ en el peptidomimético cíclico de la presente invención puede seleccionarse entre un resto de un aminoácido natural o no natural, un resto de un péptido pequeño que tiene no más de 8 aminoácidos, un resto de diamina, un resto hidrocarbilenos C₁-C₂₅, o un polímero soluble.

- 35 En una realización, el espaciador es un resto de un aminoácido natural o no natural tal como Gly, β -alanina (β -Ala), Phe, D-Phe, 1-naftilalanina (1-Nal), D-1-Naftilalanina (D-1-Nal), ácido γ -aminobutírico (GABA) y ácido 3-(aminometil) benzoico. Estos espaciadores están unidos a través de su grupo α -carboxilo al grupo α -amino de A₁ y vía su grupo α -amino a un grupo carboxilo de la carga útil.

En otra realización, el espaciador es un resto de un péptido pequeño que no tiene más de ocho aminoácidos. Estos espaciadores están unidos a través de su grupo carboxilo C-terminal al grupo α -amino de A₁ y por su grupo amino N-terminal a un grupo carboxilo de la carga útil.

- 40 En una realización adicional, el espaciador es un resto diamina de fórmula general -HN-R'-NH-, en la que R' está ausente o es un radical divalente que contiene solamente átomos de carbono e hidrógeno que pueden ser saturados o insaturados, lineales o ramificados, cíclico o acíclico, o aromático, que puede derivarse de un grupo alcano C₁-C₁₂, un alqueno C₂-C₁₂, un alquino C₂-C₁₂, cicloalcano C₃-C₁₀, un cicloalqueno C₃-C₁₀, un hidrocarburo C₆-C₁₄ aromático mono- o policíclico, o un hidrocarburo C₆-C₁₄ aromático mono- o policíclico sustituido con uno o dos hidrocarburos alquilo C₁-C₂, alqueno C₂ o alquino C₂. Ejemplos de diaminas de las que pueden derivarse tales residuos incluyen hidrazina, 1,2-etilendiamina, 1,3-propilendiamina, 1,4-diaminobutano, 1,5-diaminopentano, 1,6-diaminohexano, 1,7-diaminoheptano, 1,8-diaminooctano, 1,9-diaminononano, 1,10-diaminododecano, 1,11-diaminoundecano, 1,12-diaminododecano, *p*-fenilendiamina, ciclopentano 1,3-diamina, ciclohexano 1,4-diamina, cicloheptano 1,4-diamina, ciclooctano 1,5-diamina, naftaleno 2,6-diamina y 9H-fluoren-3-6-diamina.

- 50 En otra realización más, el espaciador es un hidrocarbilenos C₁-C₂₅, preferiblemente un alqueno o fenileno C₁-C₁₀, sustituido por dos grupos funcionales finales a través de los cuales el espaciador se une al α -amino del aminoácido A₁ del peptidomimético cíclico por un lado, y al resto de carga útil por otro lado. Dichos grupos funcionales finales pueden seleccionarse entre OH, COOH, SO₃H, COSH o NH₂, formando así un grupo éter, éster, amida, urea, tioamida o sulfonamida.

En otra realización más, el espaciador es un polímero soluble tal como polietilenglicol (PEG) lineal o ramificado, copolímeros del mismo, poliláctida (PLA) o sus copolímeros, poliésteres que tienen grupos funcionales adecuados basados en PLA, poliglicolida (PGA), policaprolactona (PCL), o sus copolímeros, o poliamidas basadas en polimetacrilamida o sus copolímeros, teniendo dichos polímeros grupos funcionales adecuados para la unión al residuo aminoácido A_1 del peptidomimético cíclico y al resto de carga útil, siendo dichos grupos funcionales, por ejemplo, grupos hidroxilo, amino, carboxilo, mercapto, ácido sulfónico.

El ejemplo 1 a continuación describe la síntesis de varios conjugados, identificados en este documento por los números arábigos **1-36** en negrita, en la que diferentes ligandos de integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ de la fórmula general I están enlazados ya sea directamente o por medio de un espaciador a una sonda fluorescente, en particular BTA, FITC o dansilo; un derivado de bacterioclorofila, en particular, Pd-BTA; o un agente quelante, en particular, DTPA o DOTA. La lista de conjugados preparados, así como sus características estructurales, se resume en la **Tabla 1**. El Ejemplo de Referencia 2 describe la síntesis de varios conjugados, identificados en este documento por los números arábigos **41-48** (Referencia) en negrita, en la que diferentes ligandos de integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ de la fórmula general II están unidos directamente a un resto de la sonda fluorescente BTA como carga útil del modelo. La lista de conjugados preparados, así como sus características estructurales, se resume en la **Tabla 2**. Las estructuras químicas de los diversos restos de carga útil utilizados, cuando están unidos a un peptidomimético cíclico, se representan en el **Esquema 2**.

Los conjugados **1-36** se ensayaron para detectar la unión a células de carcinoma de ovario humano MLS, usando tanto el ensayo de unión a integrina *in vitro* como el modelo de carcinoma ovárico *in vivo*. Algunos de estos conjugados se ensayaron para detectar la unión a células de carcinoma de colon humano HT29, tanto *in vivo* como *in vitro*, y los conjugados **1** y **4** se ensayaron adicionalmente para la unión a células de cáncer de próstata LNCaP, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los conjugados **41-48** (Referencia) se ensayaron para la unión a células de carcinoma de ovario humano MLS, usando el ensayo de unión a integrina *in vitro*, y los conjugados activos se ensayaron usando un modelo de carcinoma de ovario *in vivo* también. Los conjugados **41** (Referencia) y **42** (Referencia) se ensayaron para la unión a células de carcinoma de colon humano HT29, ambas *in vivo* como *in vitro*, y el conjugado **41** (Referencia) se ensayó adicionalmente para detectar la unión a células de cáncer de próstata LNCaP, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Cuando se investigó la actividad biológica de diferentes conjugados basados en peptidomiméticos cíclicos que contienen RGD de fórmula general I, se encontró que ciertas características estructurales del peptidomimético cíclico, es decir, el tamaño del anillo del compuesto cíclico y el tamaño y la estructura del resto de diamina presente en algunos de los compuestos cíclicos, así como el espaciador que se une al compuesto cíclico y el resto de carga útil, pueden afectar a la actividad biológica del conjugado como se describe a continuación.

El Ejemplo 3 a continuación muestra la actividad biológica de varios conjugados sonda fluorescentes que comprenden peptidomiméticos cíclicos de fórmula general I con diferentes tamaños de anillo. El tamaño de anillo del peptidomimético cíclico se alteró cambiando dos parámetros estructurales del compuesto cíclico, en particular, (i) el residuo de aminoácido enlazado a través de su grupo carboxilo α o cadena lateral a la cadena principal NH y a través de su grupo amino α - o de cadena lateral al grupo α -carboxilo del residuo de ácido aspártico, es decir, A_1 en la fórmula general I; y (ii) el radical que puentea el carbonilo de la cadena principal y el NH de la cadena principal, es decir, el radical X en la fórmula general I. Los restos de aminoácidos específicos A_1 usados fueron restos de Dap, Dab (Referencia), Orn o Lys, que tenían de una a cuatro unidades metileno en la cadena lateral, respectivamente; y los diferentes radicales X utilizados fueron -NH- (Referencia), -NH(CH₂)₂₋₄- y -NH(CH₂)₆-, que, junto con la cadena principal NH, forman un resto de hidrazina o una cierta alquildiamina. Como se muestra particularmente, la actividad biológica de los conjugados ensayados aumentó con el aumento del tamaño del anillo del peptidomimético cíclico de 16 átomos a 19-20 átomos; sin embargo, disminuyó con el aumento del tamaño del anillo. Estos resultados indican que mientras que el enlace de urea que se une al grupo α -amino del residuo de arginina y el radical X hace que el compuesto cíclico sea más rígido, un anillo más grande con hasta 19-20 átomos es más flexible para adoptar la conformación deseada para unirse a la Integrina. Por otra parte, en los casos en los que el tamaño del anillo del peptidomimético cíclico es superior a 20 átomos, el compuesto cíclico probablemente no puede adoptar la conformación deseada para la unión a la integrina.

El Ejemplo 4 muestra la actividad biológica de diversos conjugados de BTA que comprenden peptidomiméticos cíclicos de fórmula general I que tienen diferentes restos diamina unidos por enlaces amida al grupo carboxilo α - o de cadena lateral del residuo de aminoácido A_1 y, a través de la cadena principal C=O, al grupo α -amino del residuo de arginina. Los conjugados específicos probados fueron tales en los que el residuo de aminoácido A_1 es Orn, el resto BTA está directamente unido al extremo N-terminal del anillo peptidomimético, y el radical designado X es un radical de la fórmula -NH(CH₂)₂₋₄-, 1,3-dimetilbenzeno-1,3-diilo o piperidina-1,4-diilo. Como se muestra particularmente, la actividad biológica de los conjugados, en los que un residuo alquildiamina está unido a A_1 y a la cadena principal C=O, disminuyó con el aumento de la longitud de la cadena de alquilo. Además, en los casos en los que el radical designado X se derivó de *m*-xileno o piperidina, no se midió ninguna actividad biológica, lo que indica que los anillos peptidomiméticos en dichos conjugados son rígidos y adoptan una conformación indeseable para la interacción con la integrina.

El Ejemplo 5 muestra la actividad biológica de varios conjugados de sondas fluorescentes que comprenden peptidomiméticos cíclicos de la fórmula general I que tienen diferentes espaciadores que enlazan el N-terminal del peptidomimético cíclico y el resto de sonda fluorescente. Los espaciadores específicos utilizados eran restos de diferentes aminoácidos naturales o no naturales, en particular Gly, β -Ala, Phe, D-Phe, 1-Nal, D-1-Nal, GABA y ácido 3- (aminometil)benzoico, o restos de diferentes diaminas, en particular, 1,2-etilendiamina y 1,4-diaminobutano. Como se muestra, los conjugados de BTA en los que el resto de sonda fluorescente está directamente unido al peptidomimético cíclico mostraron una alta actividad biológica, probablemente porque el resto de BTA no interfiere con la unión del compuesto cíclico a la integrina. Contrariamente a esto, los conjugados en los que se usaron los restos Gly o β -Ala como espaciadores, que tenían una mayor distancia entre el peptidomimético cíclico y el resto BTA, mostraron menor actividad, probablemente debido al volumen del resto BTA. Curiosamente, cuando la distancia entre el peptidomimético cíclico y el resto BTA se incrementó adicionalmente utilizando un resto GABA como espaciador, la actividad biológica del conjugado fue mayor que la de los conjugados en los que se usaron los restos Gly o β -Ala como espaciadores, indicando posiblemente que GABA era lo suficientemente largo para dar más libertad al peptidomimético cíclico que se unía a la integrina; y sin embargo, no era demasiado largo para causar el plegado del resto BTA sobre el anillo peptidomimético. En los casos de FITC y dansilo, que son más pequeños que BTA, se utilizaron, la distancia entre el fragmento de la sonda fluorescente y el N-terminal del peptidomimético cíclico no tuvo influencia sobre la actividad biológica del conjugado. Como se muestra adicionalmente, los conjugados BTA en los que los restos Phe, 1-Nal, D-Phe o D-1-Nal se usaron como espaciadores fueron más activos que el correspondiente conjugado en el que se usó un resto Gly, probablemente debido a la cadena lateral aromática de fenilalanina o naftilalanina, que proporciona interacción con una bolsa hidrofóbica de la integrina. Hay que señalar que la actividad biológica del conjugado en el que se usó un resto D-Phe como separador fue mayor que la de los conjugados en los que se usaron restos Phe o 1-Nal, lo que indica que la configuración D puede ajustarse a la bolsa hidrofóbica de la integrina mejor que la configuración L. D-1-Nal es menos reactivo que D-Phe, indicando que el anillo de fenilo encaja mejor en la bolsa hidrofóbica que el naftilo. Debe observarse que los conjugados **32** y **33**, en los que se usaron residuos de 1,2-etilendiamina o 1,4-diaminobutano, respectivamente, como espaciadores y se formó un enlace de urea entre el peptidomimético cíclico y el espaciador, tuvieron actividad biológica similar a la de los conjugados **10** y **11**, indicando que el enlace urea tenía casi la misma actividad que el enlace amida y que no influía en la conformación del peptidomimético. La fuerte actividad biológica del conjugado **33**, comparado con la del conjugado **32**, puede deberse a la distancia de las cuatro unidades de metileno entre el anillo peptidomimético y el resto de carga útil, lo que da más libertad al anillo peptidomimético para interactuar con el sitio de unión de la integrina.

Por otro lado, el Ejemplo 6 muestra que los conjugados de BTA que comprenden peptidomiméticos cíclicos de fórmula general I en la que se forma un resto de urea con el α -amino del residuo de arginina tenían una actividad biológica similar a la de los conjugados correspondientes en los que se forma un carbamato, lo que indica que la naturaleza del resto formado con el alfa-amino del resto de arginina no tenía ningún efecto sobre la actividad biológica del conjugado.

El Ejemplo 7 describe la síntesis de cuatro conjugados de derivados de bacterioclorofila no metalados identificados en este documento por los números arábigos **37-40**, consistente en diferentes ligandos de integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ de fórmula general I unidos directamente a un resto derivado de BTA en el que la taurina fue reemplazada por un nucleófilo diferente. Como se muestra, la actividad biológica de estos conjugados, medida usando un ensayo de unión de integrina *in vitro*, fue similar, lo que indicaba que, en estos casos, el grupo amino no tenía efecto sobre la actividad biológica y que su comportamiento era casi el mismo que el del sulfonato en la taurina.

Cuando se investigó la actividad biológica de diferentes conjugados basados en peptidomiméticos cíclicos que contienen RGD de fórmula general II, se encontró que ciertas características estructurales del peptidomimético cíclico, es decir, el tamaño del anillo del compuesto cíclico y las características del residuo de aminoácido A_2 , podía afectar a la actividad biológica del conjugado como se describe a continuación.

Los Ejemplos de Referencia 8-9 a continuación muestran la actividad biológica de diversos conjugados de BTA que comprenden peptidomiméticos cíclicos de fórmula general II con diferentes tamaños de anillo. El tamaño de anillo del peptidomimético cíclico se alteró cambiando dos parámetros estructurales del compuesto cíclico, en particular, (i) el residuo de aminoácido unido al grupo α -carboxilo del residuo de ácido aspártico y al grupo carboxilo de A_2 , es decir el residuo de aminoácido A_3 ; y (ii) el residuo de aminoácido enlazado a través de su grupo α -amino a la cadena principal C=O y a través de su grupo α -carboxilo al resto de aminoácido A_3 , es decir, el residuo de aminoácido A_2 . Con el fin de estudiar el efecto de A_3 sobre la actividad del conjugado, se ensayaron los conjugados de BTA que tenían los mismos residuos de aminoácidos A_1 y A_2 pero con diferente residuo de aminoácido A_3 , en particular, Dap, Dab, Orn y Lys, que tenían de una a cuatro unidades de metileno en la cadena lateral, respectivamente. De manera similar, para estudiar el efecto de A_2 sobre la actividad del conjugado, se ensayaron los conjugados de BTA que tenían los mismos residuos de aminoácidos A_1 y A_3 pero con diferente residuo de aminoácido A_2 , en particular, Phe, Val, D-Phe, Gly y Asp. Como se muestra en el Ejemplo 8, la actividad biológica de los conjugados probados disminuyó con el aumento del tamaño del anillo del peptidomimético cíclico de 20 átomos a 23 átomos, lo que indicó que el tamaño óptimo del anillo era de 20 átomos y que tamaños de anillo mayores no encajaban en el sitio de unión de la integrina. El Ejemplo 9 muestra que la actividad biológica de conjugados con un residuo aminoácido A_2 hidrofóbico era mayor que la de los conjugados que son más polares, posiblemente debido a las interacciones

hidrófobas con la bolsa hidrofóbica en el sitio de unión de la integrina, y sugiere además que la configuración D no encajaba completamente con la bolsa hidrófoba.

5 El Ejemplo 10 muestra el nivel de unión competitiva de ciertos conjugados de la presente invención frente a la integrina $\alpha_v\beta_5$, utilizando un ensayo *in vitro*, y demuestra específicamente que los conjugados **1, 4, 7, 28 y 41** (Referencia), que tienen cuantitativamente la misma unión *in vitro*, son más activos que los conjugados **5 y 11**.

10 El Ejemplo 11 describe un estudio en el que se monitorizaron patrones de acumulación de los conjugados **1, 4 y 41** (Referencia) en tumores de cáncer de mama grandes desde el día 1 hasta el 7 después de la inyección. Como se muestra, estos conjugados se acumulaban en el área necrótica del tumor, lo que indicaba que los conjugados de la presente invención pueden utilizarse para usos diagnósticos puesto que la detección de núcleos necróticos es un marcador de pronóstico importante en varios tipos de cáncer, por ejemplo, el cáncer de mama, y la detección de márgenes tumorales es esencial para la eliminación total del tumor.

15 El Ejemplo 12 describe un estudio en el que se monitorizaron patrones de acumulación de los conjugados **1, 4, y 41** (Referencia) en células de cáncer de próstata que expresaban la integrina $\alpha_v\beta_3$ hasta 2 días después de la inyección. Como se muestra, el nivel de fluorescencia más alto se observó en el área del tumor de las 8 a las 11-14 horas después de la inyección, y el conjugado permaneció en el tumor hasta 48 horas en los casos de los conjugados **1 y 4**, y hasta 24 horas en el caso del conjugado **41** (Referencia). Como se muestra adicionalmente, los perfiles de acumulación de estos conjugados en tumores de próstata y de ovario eran casi iguales.

20 El Ejemplo 13 describe un estudio de toxicidad de los conjugados **1, 4 y 41** (Referencia), que muestra que 5 días después de la inyección de dichos conjugados, a una dosis de 50 mg/kg, no se observaba evidencia de necrosis o inflamación en el hígado o en el riñón, lo que sugiere que estos conjugados no fueron tóxicos en la dosis ensayada.

A la vista de todo lo anterior, en una realización, el resto de carga útil del conjugado de la presente invención es un resto de una sonda fluorescente tal como BTA, FITC, dansilo, rodamina, eosina y eritrosina.

25 En realizaciones preferidas, el conjugado de la presente invención es un conjugado del peptidomimético cíclico que contiene RGD de la fórmula general I y un resto de una sonda fluorescente, en el que dicha sonda fluorescente es BTA, enlazada directamente con A_1 , X es -NH-R-, R es un hidrocarbilenio derivado de etano, y A_1 es Dap, Orn, o Lys (los conjugados identificados en la presente invención como **1, 4 y 5**, respectivamente).

30 En otras realizaciones preferidas, el conjugado de la presente invención es un conjugado del peptidomimético cíclico que contiene RGD de la fórmula general I y un resto de una sonda fluorescente, en el que dicha sonda fluorescente es dansilo, unida directamente a A_1 , X es -NH-R-, R es un hidrocarbilenio derivado de etano, y A_1 es Dap, Orn o Lys (los conjugados identificados en la presente invención como **19, 18 y 16**, respectivamente).

En otras realizaciones preferidas, el conjugado de la presente invención es un conjugado del peptidomimético cíclico que contiene RGD de fórmula general I y un resto de una sonda fluorescente, en el que dicha sonda fluorescente es BTA, enlazada directamente con A_1 , X es -O-R-, R es un hidrocarbilenio derivado de etano, y A_1 es Dap o Lys (los conjugados identificados en la presente invención como **7 y 8**, respectivamente).

35 En todavía otras realizaciones preferidas, el conjugado de la presente invención es un conjugado del peptidomimético cíclico que contiene RGD de la fórmula general I y un resto de una sonda fluorescente, en el que dicha sonda fluorescente es BTA, unida mediante un espaciador a A_1 , X es -NH-R-, R es un hidrocarbilenio derivado de etano, A_1 es Dap, y el espaciador es un resto de GABA o D-Phe, o un residuo de 1,4-diaminobutano (los conjugados identificados en la presente invención como **11, 28 y 33**, respectivamente).

40 En otras realizaciones aún más preferidas, el conjugado de la presente invención es un conjugado del peptidomimético cíclico que contiene RGD de fórmula general I y un resto de una sonda fluorescente, en el que dicha sonda fluorescente es FITC, unida mediante un espaciador a A_1 , X es -NH-R-, R es un hidrocarbilenio derivado de etano, y (a) A_1 es Dap, y el espaciador es un resto β -Ala (el conjugado identificado en la presente invención como **12**); o (b) A_1 es Lys, y el espaciador es un resto de β -Ala o GABA (conjugados identificados en la presente invención como **13 y 14**, respectivamente).

45 En otras realizaciones aún más preferidas, el conjugado de la presente invención es un conjugado del peptidomimético cíclico que contiene RGD de la fórmula general I y un resto de una sonda fluorescente, en el que dicha sonda fluorescente es dansilo, enlazada mediante un espaciador a A_1 , X es -NH-R-, R es un hidrocarbilenio derivado de etano, A_1 es Dap o Lys, y el espaciador es un resto Gly (los conjugados identificados en este documento como **20 y 17**, respectivamente).

55 La terapia fotodinámica (PDT) es un tratamiento no quirúrgico de tumores en el que se administran fármacos no tóxicos, llamados agentes fotosensibilizantes, junto con luz, para generar especies reactivas de oxígeno citotóxicas *in situ*, que pueden inactivar a las células. Siendo una modalidad de tratamiento binario, la PDT permite una mayor especificidad y tiene el potencial de ser más selectiva, aunque no menos destructiva, en comparación con la quimioterapia o radioterapia de uso común.

Las porfirinas se han empleado como agentes fotosensibilizantes primarios en la práctica clínica. La penetración óptima del tejido por la luz aparentemente ocurre entre 650-800 nm. El porfímero sódico (Photofrin®, Axcan Pharma Inc.) es una mezcla compleja e inseparable de monómeros, dímeros y oligómeros superiores obtenidos a partir de hematoporfirina-IX por tratamiento con ácidos que han recibido la aprobación de la FDA para el tratamiento de cánceres de esófago y de pulmón endobronquial de células no pequeñas.

Debido a su intensa absorción en regiones espectrales favorables (650-850 nm) y su degradación inmediata después del tratamiento, los derivados de clorofila y bacterioclorofila han sido identificados como excelentes sensibilizadores para PDT de tumores y tienen propiedades superiores en comparación con las porfirinas. En particular, las bacterioclorofilas son de ventaja potencial en comparación con las clorofilas, ya que muestran intensas bandas en el infrarrojo cercano, es decir, a longitudes de onda considerablemente más largas que los derivados de clorofila.

La orientación de los reactivos fotodinámicos a la destrucción de la vasculatura tumoral, en oposición a las propias células tumorales, puede ofrecer ventajas terapéuticas ya que el crecimiento y desarrollo de las células tumorales dependen críticamente del suministro continuo de oxígeno y nutrientes. Además, se espera que la orientación de la capa de células endoteliales (EC) vasculares del tumor evite la pobre penetración del estroma tumoral por las macromoléculas terapéuticas. Aunque los vasos sanguíneos tumorales pueden verse afectados por el microambiente tumoral y adquirir una "firma" asociada al tumor, no son malignos y tienen menos probabilidades de desarrollar resistencia a los fármacos. Además, cuando un agente antivascular dirigido es también activo contra las células tumorales, se pueden esperar ganancias adicionales en la eficacia. Por lo tanto, combinando propiedades antivascuales con actividades citotóxicas antitumorales en un fármaco, se puede esperar que su eficacia aumente y que la dosis citotóxica efectiva requerida pueda, por consiguiente, disminuir.

La orientación vascular selectiva puede basarse en la susceptibilidad diferencial y la consiguiente respuesta a agentes terapéuticos de los vasos sanguíneos tumorales y normales. Alternativamente, la endocitosis diferencial puede promover la captación selectiva de agentes citotóxicos u otros agentes terapéuticos. Las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $A_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$ han sido identificadas en patrones de expresión típicos de células endoteliales vasculares angiogénicas asociadas, por ejemplo, a tumores.

Se han llevado a cabo diferentes estrategias para alcanzar este objetivo. Los péptidos, peptidomiméticos o anticuerpos circulantes que se dirigen a sitios específicos en la vasculatura son atractivos como portadores de agentes terapéuticos y de diagnóstico ofreciendo ventajas teóricas respecto a dichos conjugados que reconocen directamente a las células tumorales, situadas, en su mayor parte, más allá de barreras fisiológicas tales como la pared de los vasos sanguíneos.

Chaleix *et al.* (2003) describen la síntesis de conjugados de RGD-porfirina como candidatos potenciales para la aplicación de PDT, en los que el macrociclo de porfirina no metalado está sustituido en cada una de las posiciones 10,15,20 por 4-metilfenilo o glucosiloxifenilo acetilado y en la posición 5 por un resto de un péptido que contiene RGD lineal unido al macrociclo a través de un brazo espaciador.

En otra realización, el resto de carga útil del conjugado de la presente invención es, por lo tanto, un resto de un fotosensibilizador tal como una porfirina, una clorofila o una bacterioclorofila.

Un objeto de la presente invención es proporcionar conjugados de fotosensibilizadores que dirigen específicamente al sensibilizador a la vasculatura del tumor. Existen algunas ventajas de la orientación del fotosensibilizador vascular respecto a la orientación vascular con quimioterapia convencional. En primer lugar, durante la acumulación de un fármaco convencional dirigido, a menudo es activo, a menos que sea un profármaco, mientras que el fotosensibilizador dirigido no es activo hasta que se ilumina localmente. En segundo lugar, un fármaco convencional dirigido se unirá y actuará también en dianas indeseables que presentan la dirección orientada mientras que el fotosensibilizador dirigido se activará solamente en el sitio iluminado relevante. Además, la PDT con fotosensibilizadores dirigidos a las firmas endoteliales neovasculares en el tumor puede ser notablemente selectiva en la inducción de lesiones de células endoteliales fotodinámicas.

Dado que se ha publicado que la integrina $\alpha_v\beta_3$ desempeña un papel importante en la metástasis tumoral y la angiogénesis, lo que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de las vasculaciones preexistentes durante el crecimiento tumoral, puede ser un marcador viable para el crecimiento y la diseminación del tumor. Por lo tanto, los métodos de visualización no invasiva para la monitorización visual de la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_3$ en tiempo real proporciona oportunidades para evaluar la intervención terapéutica, así como para la detección de la metástasis.

Las integrinas se unen al citoesqueleto intracelular de las células con la matriz extracelular reconociendo el motivo RGD. Los péptidos RGD interactúan con los sitios receptores de la integrina, que pueden iniciar procesos de señalización celular e influir en muchas enfermedades diferentes. Así, el sitio de unión de RGD de la integrina es una diana farmacéutica atractiva. La integrina $\alpha_v\beta_3$ tiene un sitio de unión de RGD y péptidos o peptidomiméticos que contienen la secuencia de RGD en donde se encuentran y actúan como antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$.

En los conjugados bifuncionales de la presente invención, la propiedad de orientación es proporcionada por el peptidomimético cíclico que contiene RGD mientras que el efecto de PDT es proporcionado por el fotosensibilizador. Estos conjugados deben ser capaces de dirigir el sensibilizador a los nuevos vasos de los tumores sólidos primarios y posiblemente a las metástasis respectivas con fines de diagnóstico y destrucción fotodinámica. Pueden actuar además como agentes antiangiogénicos e iniciar la destrucción apoptótica de células tumorales neo-endoteliales y expuestas a la sangre.

En las realizaciones preferidas, el resto de carga útil es una porfirina, un derivado de clorofila o bacterioclorofila que puede estar metalado o no metalado y opcionalmente sustituido en la periferia por diferentes sustituyentes tales como grupos alquilo, arilo, heteroarilo y/o funcionales. Estos grupos funcionales se pueden seleccionar de grupos cargados positivamente, grupos cargados negativamente, grupos básicos que se convierten en grupos cargados positivamente en condiciones fisiológicas y grupos ácidos que se convierten en grupos cargados negativamente bajo condiciones fisiológicas.

La expresión "grupo cargado positivamente" se refiere a un catión derivado de un grupo que contiene N o de un grupo onio que no contiene N. Dado que el endotelio tumoral se caracteriza por un número incrementado de sitios aniónicos, los grupos cargados positivamente o los grupos básicos que se convierten a grupos cargados positivamente en condiciones fisiológicas pueden mejorar la eficacia de reconocimiento de los conjugados de la presente invención.

La expresión "un grupo cargado negativamente" se refiere a un anión derivado de un ácido e incluye carboxilato (COO⁻), tiocarboxilato (COS⁻), sulfonato (SO₃⁻), y fosfonato (PO₃²⁻), y el "grupo ácido que se convierte en un grupo cargado negativamente bajo condiciones fisiológicas" incluye los grupos ácido carboxílico (-COOH), tiocarboxílico (-COSH), sulfónico (-SO₃H) y fosfónico (-PO₃H₂).

En realizaciones más preferidas, el resto de carga útil es una clorofila o, lo más preferiblemente, un derivado de bacterioclorofila que puede ser un derivado natural o sintético no natural de clorofila o bacterioclorofila, incluyendo compuestos en los que se han realizado modificaciones en el macrociclo y/o en la periferia y/o el átomo de Mg central puede estar ausente o ser sustituido por otro átomo de metal adecuado para fines diagnósticos y/o con el propósito de PDT. Ejemplos de tales metales incluyen Pd, Pt, Co, Ni, Sn, Cu, Zn, Mn, In, Eu, Fe, Au, Al, Gd, Er, Yb, Lu, Ga, Y, Rh, Ru, Si, Ge, Cr, Mo, Re, Tl y Tc e isótopos de los mismos.

En una realización particular preferida, el conjugado de la presente invención es un conjugado del peptidomimético cíclico que contiene RGD de fórmula general I y un resto de un derivado de bacterioclorofila, en el que dicho derivado de bacterioclorofila es Pd-BTA, enlazado directamente con A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano y A₁ es Dap (el conjugado identificado en este documento como **34**).

En una realización adicional, el resto de carga útil del conjugado de la presente invención es un agente quelante, es decir, un agente capaz de quelar un radionúclido tal como el tecnecio-99m (^{99m}Tc). Ejemplos de tales agentes quelantes incluyen DTPA y DOTA. Dichos conjugados pueden ser útiles como agentes de radio-visualización y agentes radioterapéuticos.

En realizaciones preferidas, el conjugado de la presente invención es un conjugado del peptidomimético cíclico que contiene RGD de fórmula general I y un resto de un agente quelante, en el que dicho agente quelante es DTPA o DOTA, enlazado directamente a A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano y A₁ es Dap (los conjugados identificados en la presente invención como **35** y **36**, respectivamente).

Dado que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos utilizados actualmente son tóxicos también para las células normales, el desarrollo de una quimioterapia dirigida, es decir, fármacos quimioterapéuticos dirigidos específicamente a células tumorales, es de gran importancia. Los conjugados de péptidos citotóxicos dirigidos son moléculas híbridas compuestas de un vehículo peptídico, que se une a receptores en células tumorales y un resto citotóxico. Este enfoque aumenta efectivamente la especificidad y la eficacia del agente citotóxico en la quimioterapia, y debería disminuir también los efectos secundarios tóxicos.

De este modo, en aún una realización adicional, el resto de carga útil del conjugado de la presente invención es un agente citotóxico.

En una realización preferida, el agente citotóxico de la presente invención es un agente quimioterapéutico de antraciclina. El agente quimioterapéutico de antraciclina puede ser cualquier agente quimioterapéutico de la familia de las antracilinas incluyendo doxorubicina (también conocida como adriamicina), daunorrubicina, epirubicina, idarubicina y mitoxantrona. En una realización más preferida, el agente quimioterapéutico de antraciclina es doxorubicina, que es una antraciclina que contiene quinina y es el agente quimioterapéutico más ampliamente prescrito y eficaz utilizado en oncología. La doxorubicina está indicada en una amplia gama de neoplasias malignas humanas, incluyendo tumores de vejiga, estómago, ovario, pulmón y tiroides y es uno de los agentes más activos disponibles para el tratamiento del cáncer de mama y otras indicaciones, incluyendo leucemias linfoblásticas agudas y mielógenas, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, tumores óseos de Ewing y osteogénicos, sarcomas de tejidos blandos y cánceres pediátricos tales como neuroblastoma y tumores de Wilms.

En otras realizaciones preferidas, el agente citotóxico es un inhibidor mitótico tal como el paclitaxel, utilizado actualmente en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón, ovario, de mama, de cabeza y cuello y formas avanzadas del sarcoma de Kaposi, así como para la prevención de la restenosis, un inhibidor de topoisomerasa I tal como la camptotecina, o un inhibidor de la topoisomerasa II tal como la elipticina.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de un peptidomimético cíclico que contiene RGD y un resto de carga útil como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En una realización, la composición farmacéutica comprende un conjugado de un peptidomimético cíclico como se ha definido anteriormente, es decir, un peptidomimético cíclico de la fórmula general I y un resto de una sonda fluorescente. En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica comprende un conjugado seleccionado del grupo de conjugados que consiste en los conjugados **1, 4, 5, 7, 8, 11-14, 16-20, 28 y 33** definidos anteriormente. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden usar con fines de diagnóstico, preferiblemente, para la visualización de órganos y tejidos, por ejemplo, en métodos de formación de imágenes dirigidas vascularmente (VTI), más preferiblemente, para el diagnóstico de tumores.

15 En otra realización, la composición farmacéutica comprende un conjugado de un peptidomimético cíclico como se ha definido anteriormente, es decir, un peptidomimético cíclico de fórmula general I y un resto de un fotosensibilizador como se ha definido anteriormente. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende un conjugado seleccionado del grupo de conjugados que consiste en los conjugados **34 y 37-40** definidos anteriormente. Tales composiciones pueden usarse en terapia fotodinámica (PDT). En una realización, la
 20 composición farmacéutica es para su uso en oncología, particularmente para PDT de tumores. Cualquier tumor sólido adecuado está abarcado por la invención, tanto tumores primarios como metástasis, de tumores seleccionados de melanoma, cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, cerebro o cabeza y cuello. En otra realización, la composición farmacéutica es para su uso en enfermedades no oncológicas, para PDT de tejido u órgano no neoplásico. En una realización, la composición farmacéutica se usa para el tratamiento de enfermedades
 25 vasculares tales como degeneración macular relacionada con la edad (AMD) o trastornos tales como la obesidad, limitando el suministro vascular al tejido adiposo e inhibiendo así su crecimiento.

30 En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende un conjugado de un peptidomimético cíclico como se ha definido anteriormente, es decir, un peptidomimético cíclico de fórmula general I y un resto de un agente capaz de quelarse a un radionúclido. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende los conjugados **35 ó 36** definidos anteriormente. Dichas composiciones, cuando se marcan con radionúclidos adecuados, pueden usarse para radiodiagnóstico por imágenes o radioterapias.

En otra realización más, la composición farmacéutica comprende un conjugado de un peptidomimético cíclico como se ha definido anteriormente, es decir, un peptidomimético cíclico de fórmula general I y un resto de un agente citotóxico como se ha definido anteriormente. Tales composiciones pueden usarse para quimioterapia dirigida.

35 La composición farmacéutica proporcionada por la presente invención puede prepararse por técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a Ed., 1995. La composición puede estar en forma sólida, semisólida o líquida y puede incluir adicionalmente cargas, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y otros ingredientes inertes y excipientes. Además, la
 40 composición farmacéutica se puede diseñar para una liberación lenta del conjugado. La composición puede administrarse por cualquier ruta adecuada, p. ej. intravenosa, oral, parenteral, rectal o transdérmica. La dosificación dependerá del estado del paciente y se determinará según se considere apropiado por el médico.

45 La vía de administración puede ser cualquier ruta, que transporte eficazmente el compuesto activo al sitio de acción apropiado o deseado, prefiriéndose la vía intravenosa. Si se utiliza un vehículo sólido para la administración oral, la preparación puede comprimirse, colocarse en una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o de gránulos o puede estar en forma de pastilla. Si se utiliza un vehículo líquido, la preparación puede estar en forma de un jarabe,
 emulsión o cápsula de gelatina blanda. Los comprimidos, grageas o cápsulas, que tienen talco y/o un vehículo o aglutinante de carbohidrato, son particularmente adecuados para la aplicación oral. Los vehículos preferidos para comprimidos, grageas o cápsulas incluyen lactosa, almidón de maíz y/o almidón de patata.

50 En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de un peptidomimético cíclico que contiene RGD y un resto de carga útil como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con fines de diagnóstico, terapia fotodinámica (PDT), radiodiagnóstico por imágenes o radioterapia, o quimioterapia dirigida.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

Materiales y métodos

(i) **Materiales.** Resina de cloruro de 2-clorotritilo, Fmoc-Asp-O-Alilo, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-β-Ala-OH, Fmoc-GABA-OH, mono Fmoc-diaminas, HOBt, PyBOP, HATU y HOAt se adquirieron en Novabiochem (EE.UU.). Fmoc-Dap(Alloc)-OH, Fmoc-Dab(Alloc)-OH y Fmoc-Lys(Alloc)-OH se adquirieron en Bachem (Suiza). Se adquirieron Fmoc-Orn(Alloc)-OH, hidrocloreto de 1-Fmoc-4-aminopiperidina y 4-(Boc-aminometil)-anilina en NeoMPS (Francia). FITC, cloruro de dansilo, DIEA, DIC, DMBA, sal sódica del ácido dietilditiocarbámico, TFE, TIS, TFA, DCM seco y MeOH se adquirieron en Sigma (EE.UU.). Tetraquis(trifenilfosfina)paladio se adquirió en Acros (Bélgica). DMF, DCM y acetonitrilo se adquirieron en J.T.Baker (EE.UU.). DTPA y DOTA se adquirieron en Macrocylics (EE.UU.).

Los espectros UV-Vis se obtuvieron usando un espectrofotómetro Shimadzu 1240UV-Vis. El análisis HPLC MS se obtuvo usando un HPLC Agilent 1100 equipado con una columna de fase inversa Pro-RP-C18 de YMC, conectada a un espectrómetro de masas de un solo cuadrado 150EX de Applied Biosystems. Se llevaron a cabo análisis de HPLC (a menos que se indique lo contrario) en condiciones estándar: gradiente de 20-95% de acetonitrilo en agua (pH = 4,5, mantenido por ácido acético) durante 30 minutos, a un caudal de 0,2 ml/min. La HPLC preparativa se realizó usando el sistema Waters Delta Prep 4000 equipado con un detector de absorbancia sintonizable UV-VIS 486 de Waters y un colector de fracciones de Waters, controlado por el programa Millenium v3.05. El caudal se ajustó a 75 ml/min, usando una columna preparativa (Vydac C18, 218TP101550, 50 x 250 mm, 10-15 μm). Los disolventes utilizados en la purificación por HPLC fueron el disolvente A (solución 50 mM de acetato de amonio en H₂O) y el disolvente B (acetonitrilo). Las placas de ELISA se leyeron en un instrumento Thermo Labsystems Multiscan Spectrum. La formación de imágenes fluorescentes se llevó a cabo utilizando un Xenogen IVIS[®] 100 Series Imaging System (Alameda, California).

(ii) **Procedimiento general para el acoplamiento de mono Fmoc-diamina a H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(^oO-Alil)-2-clorotritilo.** Se disolvió hidrocloreto de mono Fmoc-diamina (1,05 mmol) en DCM (10 ml). Se añadió DIEA (1,26 mmol) a la solución y se agitó durante 1 min seguido de la adición de BTC (0,35 mmol) y DIEA (3,15 mmol). La solución obtenida se añadió a 0,21 mmol de resina de peptidilo, se lavó previamente con DCM y se dejó reaccionar durante 1 h. Después del acoplamiento, la resina se lavó con DCM (3 x 6 ml, 1 min cada uno) y DMF (6 x 6 ml, 1 min cada uno). La terminación del acoplamiento se controló mediante un ensayo cualitativo de ninhidrina (Ensayo Kaiser).

(iii) **Procedimiento general para el acoplamiento de BTA o Pd-BTA a la peptidil-resina.** Se disolvieron BTA (0,42 mmol), PyBOP (0,42 mmol) y HOBt (0,42 mmol) en DMF (10 ml), y luego se añadió DIEA (1,89 mmol) a la solución y se agitó durante 5 min. La solución obtenida se añadió a 0,21 mmol de resina de peptidilo y se agitó durante 2 h bajo argón. Después del acoplamiento, la resina se lavó con DMF (6-8x6 ml, 1 min). La terminación del acoplamiento se controló mediante un ensayo cualitativo de ninhidrina. El acoplamiento de Pd-BTA a la resina de peptidilo cíclico se realizó en las mismas condiciones de acoplamiento que se describieron para BTA.

(iv) **Procedimiento general para el acoplamiento de FITC a la peptidil-resina.** Se añadió una solución de FITC (0,63 mmol) en DMF (5 ml) a 0,21 mmol de resina de peptidilo y se agitó durante 1,5 h. Después del acoplamiento, la resina se lavó con DMF (6x6 ml, 1 min cada uno). La terminación del acoplamiento se controló mediante un ensayo cualitativo de ninhidrina.

(v) **Procedimiento general para el acoplamiento de cloruro de dansilo a la peptidil-resina.** Se añadió una solución de cloruro de dansilo (1,05 mmol) y DIEA (1,47 mmol) en DCM (5 ml) a 0,21 mmol de resina de peptidilo, se lavó previamente con DCM y se dejó reaccionar durante 1 h. Después del acoplamiento, la resina se lavó con DCM (5 x 5 ml, 1 min) y DMF (2 x 5 ml, 1 min). La terminación del acoplamiento se controló mediante un ensayo cualitativo de ninhidrina.

(vi) **Preparación del dipéptido protegido Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH, un bloque de construcción para la síntesis de péptidos.** Se agitó una solución de Fmoc-Gly-OH (4,162 g, 14 mmol) y DIEA (9,755 g, 56 mmol) en DCM seco (100 ml) con 10 g de resina de cloruro de 2-clorotritilo (sustitución 1,4 mmol/g) durante 1 h a TA. La mezcla se transfirió a un reactor equipado con un fondo de vidrio sinterizado y la resina se lavó con 3 x 100 ml de DCM/MeOH/DIEA (17:2:1), DCM (3 x 100 ml), DMF (3 x 100 ml), DCM (2 x 100 ml), MeOH (2 x 100 ml) y DMF/DCM (1:1) (3 x 100 ml). Se eliminó el grupo Fmoc por tratamiento con piperidina al 5% en DMF/DCM (1:1) (100 ml, 10 min), seguido de piperidina al 20% en DMF (100 ml, 5 min y 2 x 15 min) y lavando la resina con DMF (7 x 100 ml). Se activó Fmoc-Arg(Pbf)-OH (18,17 g, 28 mmol) en DMF (130 ml) con DIC (4,34 ml, 28 mmol) y HOBt (4,29 g, 28 mmol) durante 15 minutos a TA y se añadió al recipiente de reacción. La mezcla se agitó durante 2 h a TA. La resina de peptidilo se lavó con DMF (5 x 100 ml), DCM (3 x 100 ml), MeOH (2 x 100 ml) y DCM (3 x 100 ml) y se secó al vacío durante 3 h. El dipéptido protegido se escindió de la resina por agitación con una solución de AcOH/TFE/DCM (1:1:3) (250 ml) durante 1 hora a TA. La resina se filtró y se lavó con la misma solución (3 x 50 ml). Los filtrados combinados se mezclaron con n-hexano para separar el AcOH como un azeótropo y se evaporaron para dar un residuo oleoso, el cual se solidificó tras tratamiento con éter frío (1 l). La filtración y el lavado con éter frío (150 ml)

proporcionó un polvo blanco (8,64 g, 87,5%) con homogeneidad de aproximadamente 99% (HPLC). $C_{36}H_{43}N_5O_8$. EM (CL - EM) calculado $m/z = 705,84$; encontrado: 706,30 (M + H). El producto se usó sin purificación adicional.

5 **(vii) Procedimiento general para la escisión del conjugado peptídico a partir de la resina.** Después de la conjugación, la resina de peptidilo se lavó con DMF (5 x 3 ml) y DCM (5 x 3 ml) y después se secó a presión reducida durante 3 h. El conjugado de péptido se escindió de la resina usando un cóctel de escisión de TFA/tioanisol/ H_2O /TIS (85:5:5:5) (6 ml) durante 5 minutos a 0°C y luego durante 1 hora a TA. La resina se filtró y se lavó con el mismo cóctel de escisión (4 ml). Los filtrados combinados se evaporaron mediante una corriente de N_2 a aproximadamente la mitad del volumen, y el péptido se precipitó por la adición de éter frío (25 ml). La centrifugación y decantación de la capa de éter y el tratamiento adicional con éter frío (2 x 25 ml) proporcionó el péptido no protegido que se secó al vacío durante 6 h. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC.

15 **(viii) Ensayo de unión a la integrina mediante ELISA.** Se recubrieron tiras inmunomodulares Nunc (Nunclon, N° de Cat. 167008, Daniel Biotech, Israel) durante toda la noche con 2 $\mu g/ml$ de integrina humana $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon, N° de Cat. CC1020, Biotest, Israel) disuelto en tampón carbonato-bicarbonato 0,06 M. Las tiras se bloquearon durante 2 horas a TA con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% (Sigma, N° de Cat. A-9647, Israel) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Biological Industries, Israel). Una mezcla de c[RGDfK]-biotina (10^{-3} M) y un compuesto de ensayo a diferentes concentraciones (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M) diluido en tampón de ensayo (Tris HCl 50 mM, pH = 7,7, BSA al 0,5%, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,01%) fueron añadidos a las tiras revestidas y se incubó durante la noche a TA con agitación. Después de lavar con PBS, se añadieron anticuerpos anti-biotina marcados con fosfatasa alcalina (1:200) (Miltenyi Biotec, Almog, Israel) y se incubaron durante 1 hora a TA. Las muestras se incubaron con sustrato de fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP, Calbiochem, Mercury, Israel) y se leyeron a 405 nm.

20 **(ix) Modelo de carcinoma ovárico in-vivo.** Fueron anestesiados ratones desnudos CD-1 hembra (7-9 semanas de edad, 23-28 gr) y subcutáneamente (SC) se les implantó una suspensión de células de carcinoma ovárico humano MLS (obtenidas del Prof. M. Neeman, Instituto Weizmann de Ciencia, Israel) ($2-3 \times 10^6$ Células/ratón). Los tumores alcanzaron el tamaño del tratamiento, diámetro 6-8 mm, en las siguientes 2-3 semanas.

25 Los animales se anestesiaron con gas con una mezcla de 7:3 $N_2O:O_2$ que contenía 2% de isoflurano (Medeva, Bethlehem, PA) o por inyección intraperitoneal (IP) con una mezcla de 5 mg/kg de ketamina (Rhone Merieux, Lyon, Francia) y 1 mg/kg de pompún (Bayer, Leverkusen, Alemania) (85:15, v:v).

30 **(x) Modelo de carcinoma de colon in vivo.** Este modelo es similar al modelo de carcinoma de ovario *in vivo* descrito en (ix) anterior, excepto por el hecho de que fueron usadas células de carcinoma de colon humano HT29 (ATCC, EE.UU., $2-3 \times 10^6$ células/ratón) en lugar de células de carcinoma ovárico humano MLS.

35 **(xi) Modelo de cáncer de próstata in vivo.** Se implantaron células LNCaP (3×10^6 células/ratón) SC en la parte posterior de ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID). Los tumores se dejaron crecer durante 60-70 días. Cuando el tumor alcanzó el tamaño del tratamiento ($0,7-0,8$ cm³), los animales se anestesiaron y la solución del compuesto de ensayo se inyectó por vía intravenosa (IV). Las imágenes en IVIS se tomaron a las 8, 11, 14, 24 y 48 horas después de la inyección.

40 **(xii) Modelo de cáncer de mama in vivo.** Se implantaron ratones desnudos CD-1 hembras (6-8 semanas de edad, 20-25 g, obtenidos de Harlan Biotech Israel, Rehovot, Israel) con células de cáncer de mama humano MDA-MB-231-RFP (4×10^6 células/ratón). Estas células son, de hecho, células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (ATCC, EE.UU.) transfectadas con el gen de la proteína de fluorescencia roja (RFP) que posee así fluorescencia roja. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de 1-1,5 cm³ Para los tumores necróticos, los ratones se anestesiaron mediante inyección IP de 30 μl de mezcla de ketamina: xilacina 85:15, y se inyectó entonces el conjugado de ensayo (15 mg/kg) a la vena de la cola.

45 **(xiii) Protocolo de visualización fluorescente para conjugados BTA-RGD.** Se inyectaron compuestos de ensayo (8 mg/kg) en la vena de la cola de ratones portadores de tumor anestesiados con IP. Las imágenes de animales anestesiados con gas se tomaron a las 6, 8, 10, 12, 14 y 24 horas (en algunos casos también a las 48 y 72 horas) después de la inyección usando IVIS[®] 100 Series Imaging System. Los filtros de excitación y emisión se fijaron en el IVIS a 710-760 nm y a 810-860 nm, respectivamente. El filtro de emisión con la longitud de onda más próxima al pico de emisión del compuesto se seleccionó entre los filtros disponibles en la configuración estándar de IVIS.

50 **(xiv) Protocolo de visualización fluorescente para conjugados FITC-RGD.** Se inyectaron compuestos de ensayo (8 mg/kg) en la vena de la cola de ratones portadores de tumor anestesiados con IP. Se tomaron imágenes de animales anestesiados con gas a las 6 y 8 horas después de la inyección. Los animales se sacrificaron a las 8 h, se excitaron los órganos (tumor, riñón, hígado) y se tomaron imágenes de los órganos usando IVIS[®] 100 Series Imaging System. Los filtros de excitación y emisión se fijaron en el IVIS a 445-490 nm y 515-575 nm, respectivamente. El filtro de emisión con longitud de onda más próxima al pico de emisión de FITC se seleccionó entre los filtros disponibles en la configuración estándar de IVIS.

55 **(xv) Ensayo de unión in vitro.** Se cultivaron células de carcinoma ovárico humano MLS como monocapas en medio esencial mínimo (MEM-alfa) que contenía 1 g/l de D-glucosa, pH 7,4, suero de ternero fetal al 10% (FCS), glutamina (2 mM), penicilina (0,06 mg/ml) y estreptomina (0,1 mg/ml), y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada

con CO₂ al 5%. A las 48 horas antes del experimento, las células se sembraron en placas de 6 pocillos (3 x 10⁵ células/pocillo).

Expresión de integrina $\alpha_v\beta_3$ en células MLS. Las células se cultivaron en cubreobjetos. Después de la inanición de suero durante la noche, la fijación con paraformaldehído al 4% (Sigma, Israel) y la permeabilización con 0,2% de Triton X-100 (Sigma, Israel), se incubaron las células en solución de bloqueo (10% de suero de caballo) (Biological Industries, Israel) 1 h a TA. Las células se incubaron entonces con anticuerpos de integrina $\alpha_v\beta_3$ de ratón anti-humano (1:100) (Chemicon, Biotest, Israel) durante 1 hora a TA. Se aplicaron IgG anti-ratón marcadas con FITC de conejo secundario (1:200) (Sigma, Israel) a las células durante 1 hora a TA. La visualización de la imagen se realizó mediante un microscopio fluorescente (Nikon Optiphot2, Japón) equipado con una cámara digital (DVC Company, Inc., Austin, TX).

Ensayo de unión *in vitro*. Los conjugados RGD se disolvieron inicialmente en DMSO para dar 4x10⁻³ M. Las soluciones madre se diluyeron 1:40 en medio de cultivo y se añadieron en células MLS o HT29 (100 μ M/pocillo). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO al 5%₂ humidificada durante 3 horas. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y las imágenes se realizaron en un Xenogen IVIS® 100 Series Imaging System. Los filtros de excitación y emisión fijados en el IVIS para BTA-RGD fueron 710-760 nm y 810-860 nm, respectivamente, y para FITC-RGD fueron 445-490 nm y 515-575 nm, respectivamente.

(xvi) Experimentos de unión competitiva (determinación de IC₅₀). Se recubrieron tiras inmunomodulares MAXISORP (Nunc, Danyel Biotech, Israel) con 50 μ l/pocillo de 2 μ g/ml de integrina $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon, EE.UU.) durante la noche y se bloquearon con BSA al 2% (Sigma, Israel) durante 2 horas a TA. Después de lavar con tampón Tris tamponado con solución salina-Tween (TBST), una mezcla de péptido RGD c[RGDfK]-biotina (10⁻³M) y el conjugado RGD ensayado a diferentes concentraciones (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ M) fue añadido por triplicado y se incubó durante la noche y se agitó a TA. Después de lavar con tampón PBS, se añadieron anticuerpos anti-biotina marcados con fosfatasa alcalina (1:200) (Miltenyi Biotec, Alemania) y se incubaron durante 1 hora a TA. Las muestras se incubaron con sustrato de p-NPP y se leyeron a 405 nm en Multiscan Spectrum (Labotal, Israel). Los datos se representaron gráficamente para representar la dependencia del porcentaje de unión fuera de la concentración de RGD-conjugado y se determinó el valor IC₅₀.

Ejemplo 1. Síntesis de conjugados basados en peptidomiméticos cíclicos que contienen RGD de fórmula general I

1(i) Síntesis de conjugados peptidomiméticos cíclicos de BTA y Pd-BTA identificados en la presente invención como conjugados 1, 3 - 6, 15, 23 - 26 y 34 - Método A

La resina del tripéptido Fmoc -Arg(Pbf)-Gly-Asp(^oO-alil)-2-clorotritilo se preparó en una fase sólida por el acoplamiento de Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH al residuo de H-Asp-O-Alilo unido a resina.

La fijación del primer aminoácido se realizó agitando una resina de cloruro de 2-clorotritilo (300 mg, sustitución 1,4 mmol/g) con una solución de Fmoc-Asp-O-Alilo (83 mg, 0,21 mmol) y DIEA (147 μ l, 0,84 mmol) en 5 ml de DCM seco durante 1 hora a TA para dar una carga de aproximadamente 0,7 mmol/g. Después de completar el acoplamiento, se trató la resina (lavados y eliminación con Fmoc) como se describe en Materiales y Métodos con los correspondientes volúmenes de la solución de disolventes y reactivos. Se disolvieron Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH (223 mg, 0,315 mmol), HOBt (48 mg, 0,315 mmol) y DIC (49 μ l, 0,315 mmol) en 5 ml de DMF y se agitó a TA durante 20 min. La solución resultante se añadió a la resina H-Asp-O-Alilo lavada y la mezcla se agitó durante 2 horas a TA. La resina de peptidilo se lavó con DMF (5 x 5 ml). La eliminación del grupo Fmoc se llevó a cabo mediante la adición de 20% de piperidina (5 ml) en DMF (2x15 min) seguido de lavado con DMF (7x5 ml, 1 min). El acoplamiento de mono Fmoc-diamina se realizó como se describe en Materiales y Métodos seguido por la desprotección con Fmoc y lavado con DMF. El acoplamiento de Fmoc-Lys(Alloc)-OH, así como de Fmoc-Dap(Alloc)-OH, Fmoc-Dab(Alloc)-OH y Fmoc-Orn(Alloc)-OH al tetrapeptido se realizó mediante la adición de una solución de DMF (5 ml) de Fmoc-Lys(Alloc)-OH (0,63 mmol), preactivada (durante 15 min) con HOBt (0,63 mmol) y DIC (0,63 mmol) y tiempo de acoplamiento de 1 h. Después del acoplamiento, la resina se lavó con DMF (6 x 5 ml, 1 min). La terminación del acoplamiento se controló mediante un ensayo cualitativo de ninhidrina (Prueba Kaiser). La desprotección de Alilo y Alloc se llevó a cabo mediante la agitación de la peptidil-resina con una solución de [(C₆H₅)₃P]₄Pd⁰ (0,252 mmoles) y DMBA (3,57 mmoles) en DCM (5 ml) durante 2 horas a temperatura ambiente bajo argón. La resina se lavó con DCM (3x5 ml, 1 min), DMF (3x5 ml, 1 min), sal sódica de ácido dietilditiocarbámico (0,5% en DMF, 4x5 ml, 2 min) y finalmente con DMF (5x5 ml, 1 min). La ciclización en resina se realizó usando una solución de PyBOP (0,63 mmol) y DIEA (1,26 mmol) en DMF (4 ml) durante 2 horas a TA. Después de la desprotección con Fmoc, se realizó la conjugación de BTA a la resina de peptidilo no protegida, así como la escisión del péptido de la resina, como se describe en Materiales y Métodos. Los productos se purificaron mediante RP-HPLC.

1(ii) Síntesis del conjugado peptidomimético cíclico de BTA identificado en este documento como el conjugado 2 - Método B

La síntesis de la resina H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(^oO-alil)-2-clorotritilo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente para el Método A.

Acoplamiento del hidrocloreuro de Fmoc-NH-NH₂ al tripéptido no protegido. Se disolvió hidrocloreuro de mono Fmoc-hidrazina (1,05 mmol) en una mezcla 1:1 de dioxano y 1,3-dicloropropano (10 ml). Se añadió DIEA (1,26 mmol) a esta solución y se agitó durante 1 minuto seguido por la adición de BTC (0,35 mmol) y DIEA (3,15 mmol). La solución se añadió a la resina de peptidilo (0,21 mmol) (prelavada con dioxano:1,3-dicloropropano 1:1) y se dejó reaccionar durante 1 hora a 55°C. Después del acoplamiento, la resina se lavó con DCM (3 x 6 ml, 1 min) seguido de DMF (6 x 6 ml, 1 min). La terminación del acoplamiento se controló mediante un ensayo cualitativo de ninhidrina (Prueba Kaiser). El resto de la síntesis fue como se describe para el Método A. El producto se purificó por RP-HPLC.

1(iii) Síntesis de los conjugados peptidomiméticos cíclicos de BTA identificados en este documento como conjugados 9-11 y 27 - 33 - Método C

La síntesis del ciclopentapéptido se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente para el Método A.

Acoplamiento de los espaciadores de aminoácidos al ciclopentapéptido. Se disolvió el Fmoc aminoácido (0,63 mmol de Fmoc-Gly-OH, Fmoc-β-Ala-OH, Fmoc- GABA-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-1-Nal-OH, Fmoc-D-1-Nal-OH o ácido Fmoc-3-aminometilbenzoico) en DMF (5 ml) y después se añadieron HOBt (0,63 mmol) y DIC (0,63 mmol) y se dejó reaccionar durante 15 min. La solución se añadió a la resina de ciclopentapéptido-2-clorotritilo desprotegida con Fmoc (0,21 mmol) y se agitó durante 1 h. La resina se lavó con DMF (6x5 ml, 1 min) seguido por desprotección con Fmoc. El acoplamiento de BTA y la escisión del péptido de la resina se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los productos se purificaron mediante RP-HPLC.

Acoplamiento de los separadores de diaminas al ciclopentapéptido. Se disolvió clorhidrato de mono Fmoc-diamina (1,05 mmol de clorhidrato de Fmoc-etilendiamina o clorhidrato de Fmoc-diaminobutano) en DCM (10 ml). Se añadió DIEA (1,26 mmol) a la solución y se agitó durante 1 min seguido de la adición de BTC (0,35 mmol) y DIEA (3,15 mmol). La solución obtenida se añadió a 0,21 mmol de resina de peptidilo, se lavó previamente con DCM y se dejó reaccionar durante 1 h. Después del acoplamiento, la resina se lavó con DCM (3 x 6 ml, 1 min cada uno) y DMF (6 x 6 ml, 1 min cada uno). La terminación del acoplamiento se controló mediante un ensayo cualitativo de ninhidrina (Prueba Kaiser). El acoplamiento de BTA y la escisión del péptido de la resina se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los productos se purificaron mediante RP-HPLC.

1(iv) Síntesis de los conjugados peptidomiméticos cíclicos de BTA identificados en la presente invención como conjugados 7 y 8 - Método D

La síntesis de H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(¹⁸O-alil)-2-clorotritilo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente para el Método A.

Acoplamiento de Fmoc-Glicinol al Tripéptido Fmoc-desprotegido. Se disolvió Fmoc-Glicinol (1,05 mmol) en DCM (10 ml), y después se añadió BTC (0,35 mmol) a esta solución seguido por la adición de DIEA (3,15 mmol). Después de agitar durante 5 min, la solución obtenida se añadió a resina de peptidilo (0,21 mmol) prelavada con DCM y se dejó reaccionar durante 1 hora a TA. La resina se lavó con DCM (3 x 6 ml, 1 min) y DMF (6 x 6 ml durante 1 min). La terminación del acoplamiento se controló mediante un ensayo cualitativo de ninhidrina (Prueba Kaiser). El resto de la síntesis se llevó a cabo como se describe para el Método A. La escisión del conjugado de péptido de la resina se realizó con solución de TFA (6 ml) que contenía 15% de DCM + 5% de TIS y 5% de tianisol. Los productos se purificaron mediante RP-HPLC.

1(v) Síntesis de conjugados peptidomiméticos cíclicos de FITC identificados en la presente invención como conjugados 12-14 - Método E

La síntesis de ciclopentapéptido se llevó a cabo como se describe anteriormente para el Método A. Después de la desprotección con Fmoc, se añadió una solución de Fmoc-β-Ala-OH o Fmoc-GABA-OH (0,63 mmol), HOBt (0,63 mmol) en DMF (5 ml) durante 15 minutos, se añadió a la resina de peptidilo (0,21 mmol) y se dejó reaccionar durante 1 h. La resina se lavó con DMF (6x5 ml, 1 min). La eliminación del grupo Fmoc se llevó a cabo por la adición de piperidina al 20% en DMF (2 x 15 ml, 15 min) seguido por lavado con DMF (6 x 5 ml, 1 min). El acoplamiento de FITC a la resina de peptidilo no protegida y la escisión del péptido de la resina se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los productos se purificaron mediante RP-HPLC.

1(vi) Síntesis de los conjugados peptomiméticos cíclicos de dansilo identificados en la presente invención como conjugados 16 - 22 - Método F

La síntesis del péptido cíclico se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente para el Método A, y después de la desprotección con Fmoc, los compuestos se hicieron reaccionar directamente con cloruro de dansilo como se describe en Materiales y Métodos.

Los compuestos que contenían un espaciador se hicieron reaccionar primero con Fmoc-Gly-OH o, alternativamente, con Fmoc-β-Ala-OH, bajo las mismas condiciones descritas para el Método E, seguido por acoplamiento con cloruro de dansilo. La escisión del péptido de la resina se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Los productos se purificaron mediante RP-HPLC.

1(vii) Síntesis del conjugado peptidomimético cíclico de DTPA identificado en el presente documento como conjugado 35 - Método G

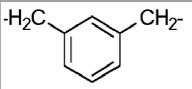
5 La síntesis del péptido cíclico se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente para el Método A. Tras la desprotección con Fmoc, se añadió una disolución de DTPA-tetra (t-Bu éster) (0,42 mmol) en DMF (3 ml) activado por HATU (0,42 mmol), se añadieron HOAt (0,42 mmol) y DIEA (0,42 mmol) a la resina de peptidilo (0,14 mmol) y se agitaron durante 2 horas a TA. La resina se lavó con DMF (4 ml, 5 veces, 1 min cada vez). La escisión del péptido de la resina se realizó como se describe en Materiales y Métodos.

1(viii) Síntesis del conjugado peptidomimético cíclico de DOTA identificado en el presente documento como conjugado 36 - Método H

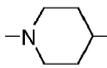
10 La síntesis de péptido cíclico se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente para el Método A. Después de la desprotección con Fmoc, se añadió una solución de DOTA-tris (t-Bu éster) (0,42 mmol) en DMF (3 ml) activado por HATU (0,42 mmol), se añadió HOAt (0,42 mmol) y DIEA (0,42 mmol) a la resina de peptidilo (0,14 mmol) y se agitó durante 3 horas a 60°C. La resina se lavó con DMF (4 ml, 5 x 1 min). La escisión del péptido de la resina se realizó como se describe en Materiales y Métodos.

15 La **tabla 1** enumera los conjugados sintetizados y sus características estructurales.

Tabla 1: Conjugados basados en peptidomiméticos cíclicos de la fórmula general I sintetizada y método de síntesis

Conjugado	X*	R*	A ₁ *	Espaciador	Carga útil	Método	MW
1	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	-	BTA	A	1217,3
2 (Referencia)	NUEVA HAMPSHIRE	-	Dap	-	BTA	B	1189,8
3 (Referencia)	NHR	(CH ₂) ₂	Dab	-	BTA	A	1231,3
4	NHR	(CH ₂) ₂	Orn	-	BTA	A	1245,3
5	NHR	(CH ₂) ₂	Lys	-	BTA	A	1259,4
6 (Referencia)	NHR	(CH ₂) ₂	Lys	-	BTA	A	1259,4
7	O	(CH ₂) ₂	Dap	-	BTA	D	1218,2
8	O	(CH ₂) ₂	Lys	-	BTA	D	1260,3
9	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	Gly	BTA	C	1275,2
10	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	Resto beta-Ala	BTA	C	1289,2
11	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	Resto GABA	BTA	C	1303,2
12	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	Resto beta-Ala	FITC	E	960,7
13	NHR	(CH ₂) ₂	Lys	Resto beta-Ala	FITC	E	1002,7
14	NHR	(CH ₂) ₂	Lys	Resto GABA	FITC	E	1016,7
15 (Referencia)	NHR		Orn	-	BTA	A	1321,2
16	NHR	(CH ₂) ₂	Lys	-	Dansilo	F	776,3

ES 2 627 377 T3

Conjugado	X*	R*	A ₁ *	Espaciador	Carga útil	Método	MW
17	NHR	(CH ₂) ₂	Lys	Gly	Dansilo	F	833,6
18	NHR	(CH ₂) ₂	Orn	-	Dansilo	F	762,3
19	NHR	(CH ₂) ₂	Salto	-	Dansilo	F	734,3
20	NHR	(CH ₂) ₂	Salto	Gly	Dansilo	F	791,5
21 (Referencia)	NHR	(CH ₂) ₄	Orn	-	Dansilo	F	789,7
22 (Referencia)	NHR	(CH ₂) ₄	Orn	Resto beta-Ala	Dansilo	F	860,72
23** (Referencia)	NHR		Orn	-	BTA	A	1285,4
24 (Referencia)	NHR	(CH ₂) ₃	Orn	-	BTA	A	1259,8
25 (Referencia)	NHR	(CH ₂) ₄	Orn	-	BTA	A	1273,4
26 (Referencia)	NHR	(CH ₂) ₆	Orn	-	BTA	A	1301,4
27	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	Resto Phe	BTA	C	1364,4
28	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	Resto D - Phe	BTA	C	1364,4
29	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	Resto 1-Nal	BTA	C	1414,4
30	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	Resto D-1-Nal	BTA	C	1414,4
31	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	Resto ácido 3-(aminometil) benzoico	BTA	C	1350,4
32	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	-HN-(CH ₂) ₂ -NH-	BTA	C	1304,2
33	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	-HN-(CH ₂) ₄ -NH-	BTA	C	1332,2
34	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	-	Pd-BTA	A	1321,3
35	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	-	DTPA	G	875,0
36	NHR	(CH ₂) ₂	Dap	-	DOTA	H	887,0

* X, R y A₁ se definen de acuerdo con las definiciones de la fórmula general I.

** R junto con el átomo de nitrógeno unido al mismo forman un anillo heterocíclico saturado.

Ejemplo de referencia 2. Síntesis de conjugados de BTA basados en peptidomiméticos cíclicos que contienen RGD de fórmula general II

En un recipiente de reacción equipado con un fondo de vidrio sinterizado, se hinchó la resina MBHA amida Rink (300 mg, sustitución 0,58 mmol/g) en DMF por agitación durante la noche. El grupo Fmoc se retiró de la resina tras el tratamiento con piperidina al 20% en DMF durante 15 min (3 ml). Esta acción se repitió dos veces. La resina se lavó con DMF (4 ml, 2 min, 5 veces). Se realizó el acoplamiento de Fmoc-Dap(Alloc)-OH, así como de Fmoc-Dab(Alloc)-OH, Fmoc-Orn(Alloc)-OH y Fmoc-Lys(Alloc)-OH a la resina por la adición de una disolución de DMF (2,5 ml) de Fmoc-Dap(Alloc)-OH (0,52 mmol), preactivada (durante 15 min) con HOBt (0,52 mmol) y DIC (0,52 mmol), y tiempo de acoplamiento 1 h. Después del acoplamiento, la resina se lavó con DMF (4 ml, 2 min, 5 veces). La terminación del acoplamiento se controló mediante un ensayo cualitativo de ninhidrina (Prueba Kaiser). La eliminación de Fmoc y el lavado con DMF después de la desprotección con Fmoc se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente. Se realizó el acoplamiento de Fmoc-Asp(O-tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH y Fmoc-Lys(Dde)-OH y la desprotección de Fmoc entre cada acoplamiento se realizó bajo las mismas condiciones descritas para Fmoc-Dap(Alloc)-OH.

Procedimiento general para el acoplamiento del éster alílico de aminoácidos a la resina de amida de pentapeptido Lys(Dde)-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O-tBu)-X

Se disolvió éster alílico de aminoácidos en forma de una sal de TsOH (0,87 mmol) en DCM (7 ml). Se añadió DIEA (1,05 mmol) a la solución y se agitó durante 1 min seguido de la adición de BTC (0,29 mmol) y DIEA (2,6 mmol). La solución obtenida se añadió a 0,174 mmol de resina de peptidilo, se lavó previamente con DCM y se dejó reaccionar durante 1 h. Después del acoplamiento, la resina se lavó con DCM (3 x 6 ml, 1 min cada uno) y DMF (6 veces x 6 ml, 1 min cada uno). La terminación del acoplamiento se controló mediante un ensayo cualitativo de ninhidrina.

Después de acoplar el éster alílico de aminoácido y el lavado con DMF, la resina se lavó con DCM (4 veces, 4 ml, 1 min cada uno). La desprotección de Alilo y Alloc se llevó a cabo mediante agitación de la peptidil-resina con una solución de $[(C_6H_5)_3P]_4Pd^0$ (0,21 mmol) y DMBA (2,61 mmol) en DCM (5 ml) durante 2 horas a temperatura ambiente bajo argón. La resina se lavó con DCM (3x5 ml, 1 min), DMF (3x5 ml, 1 min), sal sódica de ácido dietilditiocarbámico (0,5% en DMF, 4x5 ml, 2 min) y finalmente con DMF (5x5 ml, 1 min). La ciclación en resina se realizó usando una solución de PyBOP (0,52 mmol) y DIEA (1,04 mmol) en DMF (4 ml) durante 2 horas a TA. Después de la ciclación, el grupo Dde se eliminó por la adición de monohidrato de hidrazina al 2% en DMF (3 veces, 3 min cada vez) seguido de lavado con DMF (4 ml, 6 veces, 2 min cada vez). La conjugación de BTA a la resina de peptidilo no protegida, así como la escisión del péptido de la resina, se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los productos se purificaron mediante RP-HPLC.

La **Tabla 2** enumera los conjugados sintetizados y sus características estructurales.

Tabla 2: Conjugados basados en peptidomiméticos cíclicos de la fórmula general II sintetizada

Conjugado	A ₁ *	A ₂ *	A ₃ *	Espaciador	Carga útil	MW
41 (Referencia)	Lys	Phe	Dap	-	BTA	1449,4
42 (Referencia)	Lys	Val	Dap	-	BTA	1401,38
43 (Referencia)	Lys	Dhe	Dap	-	BTA	1449,38
44 (Referencia)	Lys	Gly	Dap	-	BTA	1359,33
45 (Referencia)	Lys	Áspid	Dap	-	BTA	1418,31
46 (Referencia)	Lys	Phe	Dab	-	BTA	1463,4
47 (Referencia)	Lys	Phe	Orn	-	BTA	1477,4
48 (Referencia)	Lys	Phe	Lys	-	BTA	1491,4

* A₁, A₂ y A₃ se definen de acuerdo con las definiciones de la fórmula general II,

Ejemplo 3 El tamaño del anillo de un peptidomimético cíclico de la fórmula general I afecta la actividad biológica del conjugado basado en el mismo

Con el fin de examinar si el tamaño de anillo del peptidomimético cíclico que contiene RGD de fórmula general I afecta la actividad biológica del conjugado, la actividad de diversos conjugados de sondas fluorescentes basados en peptidomiméticos cíclicos de fórmula general I que tiene diferentes tamaños de anillo fue probada en ambos el modelo de carcinoma ovárico *in vivo* y el ensayo de unión *in vitro* usando células de carcinoma de ovario humano, como se describe en Materiales y Métodos.

El tamaño de anillo del peptidomimético cíclico que contiene RGD se cambió alterando dos parámetros estructurales del compuesto cíclico, en particular, (i) el residuo de aminoácido unido por enlaces amida a través de su grupo carboxilo α o de cadena lateral a la cadena principal NH y a través de su grupo amino de cadena α o lateral al grupo α -carboxilo del residuo de ácido aspártico, es decir, el radical A_1 en la fórmula general I; y (ii) el radical que forma un puente con la cadena principal de carbonilo y la cadena principal de NH, es decir, el radical X en la fórmula general I. Los restos de aminoácidos específicos usados fueron restos del ácido diaminopropiónico (Dap), ácido diaminobutírico (Dab), ornitina (Orn), y lisina (Lys), que tienen de una a cuatro unidades de metileno, respectivamente, en la cadena lateral; y los diferentes radicales X utilizados fueron NH, $NH(CH_2)_2$, $NH(CH_2)_3$, $NH(CH_2)_4$ y $NH(CH_2)_6$, los cuales, junto con la cadena principal NH, forman un resto de hidrazina, diaminoetano, diaminopropano, diaminobutano y diaminohexano, respectivamente, formando un puente con A_1 y el carbonilo de la cadena principal.

La **Tabla 3** muestra los diversos conjugados sonda fluorescentes ensayados y su actividad biológica. Como se muestra, la actividad de los conjugados ensayados aumentó con el aumento del tamaño del anillo del peptidomimético cíclico de 16 átomos a 18-20 átomos; sin embargo, disminuyó con el aumento del tamaño del anillo. Estos resultados indican que mientras que el enlace de urea une el grupo α -amino del residuo de arginina y el radical X hace que el peptidomimético cíclico sea más rígido, un anillo más grande que tenga hasta 18-20 átomos es más flexible para adoptar la conformación deseada para unirse a la integrina. Por otra parte, en los casos en los que el tamaño del anillo del peptidomimético cíclico sea superior a 20 átomos, el peptidomimético cíclico probablemente no puede adoptar la conformación deseada para la unión a la integrina.

Tabla 3: La actividad biológica de conjugados sonda fluorescentes basados en peptidomiméticos cíclicos de fórmula general I que tienen diferentes tamaños de anillo

Conjugado	Tamaño del anillo (átomos)	Modelo de carcinoma ovárico (<i>in vivo</i>)	Ensayo de unión a integrina (<i>in vitro</i>)
2 (Referencia)	16	Fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 6 horas. A las 10 h, señal baja en hígado y tumor. Aclaramiento completo a las 21 h.	Sin enlace
6 (Referencia)	17	Fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 6 horas. A las 8 h, señal fuerte en el hígado. Aclaramiento completo a las 15 h.	Sin enlace
1	18	Fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 10 horas con señales fuertes en el hígado y el tumor. A las 24-72 horas, sólo en el tumor.	Unión
19	18	A las 8 h, fuerte acumulación en el tumor pero no en el riñón o el hígado.	
3 (Referencia)	19	Fluorescencia se extiende por todo el cuerpo durante 8 horas. A las 10 h, señal fuerte en hígado y tumor. A las 14 horas, sólo en el tumor. La mayoría del fármaco se limpia a las 23 h.	Sin enlace
4	20	Fluorescencia se extiende por todo el cuerpo durante 8 horas. A las 10 h, señal fuerte en hígado y tumor. A las 14 horas, sólo en el tumor. La mayoría del fármaco se limpia a las 23 h.	Unión
18	20	A las 8 h, fuerte acumulación en el tumor pero no en el riñón	

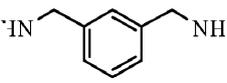
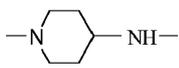
Conjugado	Tamaño del anillo (átomos)	Modelo de carcinoma ovárico (<i>in vivo</i>)	Ensayo de unión a integrina (<i>in vitro</i>)
		o el hígado.	
5	21	Fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 8 horas con puntos altos en el hígado y el tumor. A las 10 h, sólo en hígado y tumor. A las 12-23 horas, sólo en el tumor.	Unión
16	21	A las 8 h, fuerte acumulación en el tumor pero débil en riñón e hígado.	
24 (Referencia)	21	Acumulación en el tumor y el hígado hasta 14 horas con el nivel máximo a las 11 h. Aclaramiento completo a las 48 h.	Unión débil
25 (Referencia)	22	Acumulación en el tumor hasta 28 horas con nivel máximo a las 8-11 horas. Aclaramiento completo a las 48 h.	Unión débil
21 (Referencia)	22	A las 8 h, fuerte acumulación en el tumor pero no en el riñón o el hígado.	
26 (Referencia)	24	Acumulación en el tumor y el hígado hasta 14 horas con el nivel máximo a las 8 h. Aclaramiento completo a las 24 h.	Sin enlace
* La caracterización de cada conjugado se presenta en la tabla 1 anterior.			

Ejemplo 4 El tamaño y la estructura del residuo de diamina en un peptidomimético cíclico de la fórmula general I afecta la actividad biológica del conjugado basado en el mismo

- 5 Con el fin de examinar si el tamaño y la estructura del residuo de diamina, unido por enlaces amida al grupo carboxilo α o de cadena lateral del residuo de aminoácido A_1 en la fórmula general I y, a través del carbonilo de la cadena principal, al grupo α -amino del residuo de arginina, afecta a la actividad biológica del conjugado, la actividad de diversos conjugados de BTA basados en peptidomiméticos cíclicos de fórmula general I que tienen diferentes residuos de diamina como se definió anteriormente se ensayaron en ambos modelo de carcinoma ovárico *in vivo* y ensayo de unión *in vitro* usando células de carcinoma de ovario humano, como se describe en Materiales y Métodos.
- 10 Los conjugados específicos ensayados fueron los conjugados **4**, **24** (Referencia), **25** (Referencia), **15** (Referencia) y **23** (Referencia), en los que el residuo de aminoácido A_1 Es ornitina; la molécula de BTA está unida al N-terminal del anillo peptidomimético sin un espaciador; y el radical designado X en la fórmula general I es $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{2-4}-$, 1,3-dimetilbenceno-1,3-diilo o piperidin-1,4-diilo, respectivamente.
- 15 La **Tabla 4** muestra los diversos conjugados ensayados y su actividad biológica. Como se muestra, la actividad biológica del conjugado **4** fue la más alta entre los conjugados en que los residuos de alquildiamina forman un puente con A_1 y la cadena principal $\text{C}=\text{O}$, lo que indica que la actividad biológica de estos conjugados disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena alquímica. Además, cuando el anillo peptidomimético se vuelve rígido, como en los casos de los conjugados **15** (Referencia) y **23** (Referencia) en los que se usaron radicales distintos de los residuos de alquildiamina, no se midió ninguna actividad biológica, lo que indica que el anillo peptidomimético en dichos conjugados adopta una conformación que es indeseable para la interacción con la integrina.
- 20

Tabla 4: La actividad biológica de los conjugados de BTA basados en peptidomiméticos cíclicos de fórmula general I que tienen diferentes unidades de diamina que se enlazan mediante enlaces amida al resto de arginina y al residuo de aminoácido designado A_1

Conjugado	Residuo de diamina	Modelo de carcinoma ovárico (<i>in vivo</i>)	Ensayo de unión a integrina (<i>in vitro</i>)
4	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$	A las 10 h, señal fuerte en hígado y tumor. A las 14 horas, sólo en el tumor. La mayoría del fármaco se elimina a las 23 h.	Unión

Conjugado	Residuo de diamina	Modelo de carcinoma ovárico (<i>in vivo</i>)	Ensayo de unión a integrina (<i>in vitro</i>)
24 (Referencia)	-NH-(CH ₂) ₃ -NH-	Acumulación en el tumor y el hígado hasta 14 horas con el nivel máximo a las 11 h. Aclaramiento completo a las 48 h.	Unión débil
25 (Referencia)	-NH-(CH ₂) ₄ -NH-	Acumulación en el tumor hasta 28 horas con nivel máximo a las 8-11 horas. Aclaramiento completo a las 48h.	Unión débil
15 (Referencia)		Fuerte acumulación en el tumor hasta 24 h.	Sin enlace
23 (Referencia)		Alta fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 48 h.	Sin enlace
* La caracterización de cada conjugado se presenta en la tabla 1 anterior.			

Ejemplo 5. El espaciador que une el resto de carga útil con un peptidomimético cíclico de la fórmula general I afecta a la actividad biológica del conjugado

5 En este experimento, la actividad biológica de varios conjugados de sondas fluorescentes basados en peptidomiméticos cíclicos de fórmula general I que tienen diferentes espaciadores que unen el resto de sonda fluorescente y el N-terminal del peptidomimético cíclico, es decir, el grupo amino de α o la cadena lateral del residuo de aminoácido A₁, se probó en ambos modelo de carcinoma ovárico *in vivo* y ensayo de unión *in vitro* usando células de carcinoma de ovario humano, como se describe en Materiales y Métodos. Los espaciadores específicos utilizados eran restos de diversos aminoácidos naturales o sintéticos, en particular, glicina, β -alanina, fenilalanina, D-fenilalanina, 1-naftilalanina (1-Nal), D-1-naftilalanina (D-1-Nal), Ácido gamma-aminobutírico (GABA) y ácido 3-(aminometil)benzoico.

15 La **Tabla 5** muestra los diversos conjugados ensayados y su actividad biológica. Como se muestra, el conjugado **1**, que no tiene separador entre la molécula de BTA y el peptidomimético cíclico mostró una actividad biológica alta, probablemente debido al hecho de que la molécula de BTA no interfiere con la unión del peptidomimético cíclico a la integrina. Contrariamente a esto, los conjugados en los que se usaron restos de glicina o β -alanina como espaciadores, que tenían una mayor distancia entre el peptidomimético cíclico y la molécula de BTA, mostraron menor actividad biológica, probablemente debido al volumen de la molécula de BTA. En el caso del conjugado **11**, en el que se usó un resto de GABA como espaciador, es decir, la distancia entre el peptidomimético cíclico y la molécula de BTA se incrementó adicionalmente, tanto los resultados *in vitro* como *in vivo* mostraron una fluorescencia alta, posiblemente indicando que GABA era lo suficientemente largo para dar más libertad al anillo peptidomimético para unirse a la integrina; sin embargo, no demasiado largo para causar el plegamiento de la molécula de BTA sobre el anillo peptidomimético.

25 En los casos en que se usaron sondas fluorescentes más pequeñas, es decir, FITC o dansilo, la distancia entre la sonda fluorescente y el terminal N del anillo peptidomimético no tuvo influencia sobre la actividad biológica del conjugado.

30 Los conjugados **27** y **28**, en los que la fenilalanina y los restos de D-fenilalanina, respectivamente, se usaron como espaciadores, fueron más activos que los conjugados **9**, en los que se usó un resto de glicina como espaciador, probablemente debido a la cadena lateral aromática de fenilalanina, que proporciona interacción con la bolsa hidrófoba de la integrina. La actividad biológica del conjugado **28**, que fue mayor que la del conjugado **27** puede indicar adicionalmente que la configuración D de la fenilalanina puede encajar con la bolsa hidrófoba de la integrina mejor que la configuración L, mejorando así la unión.

35 Los conjugados **32** y **33**, en los que se usaron residuos de 1,2-etilendiamina y 1,4-diaminobutano, respectivamente, como espaciadores y se formó un enlace de urea entre el anillo peptidomimético y el resto BTA, tenían casi la misma actividad biológica que los conjugados **10** y **11**, Indicando que el enlace de urea tiene casi la misma actividad que el enlace amida y no influye en la conformación del peptidomimético.

Tabla 5: La actividad biológica de conjugados sonda fluorescentes basados en peptidomiméticos cíclicos de la fórmula general I que tienen diferentes espaciadores

Conjugado	Espaciador	Modelo de carcinoma ovárico (<i>in vivo</i>)	Ensayo de unión a integrina (<i>in vitro</i>)
1	-	Fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 10 horas con señales fuertes en el hígado y el tumor. A las 24-72 horas, sólo en el tumor.	Unión
19	-	A las 8 h, fuerte acumulación en el tumor pero no en el riñón o el hígado.	
9	Resto Gly	Aclaración completa a las 8 h.	Baja unión
20	Resto Gly	A las 8 h, fuerte acumulación en el tumor pero no en el riñón o el hígado.	
10	Resto beta-Ala	Fluorescencia se extiende por todo el cuerpo y desaparece muy rápido.	Sin enlace
12	Resto beta-Ala	A las 8 h, acumulación en el tumor y el riñón.	Unión
11	Resto GABA	Fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 12 horas con fuertes señales en el hígado y el tumor. A las 24 horas, principalmente en el tumor.	Fuerte unión
27	Resto Phe	A las 8-14 horas, sólo en el tumor. Aclaramiento completo a las 24 h.	Unión débil
28	Resto D-Phe	A las 8-24 horas, sólo en el tumor. Aclaramiento completo a las 48 h.	Fuerte unión
16	-	A las 8 h, fuerte acumulación en el tumor pero débil en riñón e hígado.	
17	Resto Gly	A las 8 h, fuerte acumulación en el tumor pero no en el riñón o el hígado.	
13	Resto beta-Ala	A las 8 h, acumulación en el tumor y en el riñón.	Unión
14	Resto GABA	A las 8 h, debilidad acumulada en el tumor y fuerte en el riñón.	Unión
29	Resto 1-Nal	A las 8 h, acumulación sólo en tumor y permanece allí hasta 24 h.	Unión débil
30	Resto D-1-Nal	A las 24 h, acumulación en el tumor. La señal del cuerpo es alta.	Unión débil
31	3-(aminometil) benzoico	A las 8 h, acumulación sólo en tumor y permanece allí hasta 24 h.	Unión débil
32	NH-(CH ₂) ₂ -NH	A las 24 horas, acumulación en el tumor y permanece allí durante más de 72 horas.	Unión débil
33	NH-(CH ₂) ₄ -NH	A las 24 h, acumulación en el tumor y permanece allí durante más de 5 días.	Fuerte unión
* La caracterización de cada conjugado se presenta en la tabla 1 anterior.			

Ejemplo 6 La actividad biológica de los conjugados basados en peptidomiméticos cíclicos de fórmula general I en los que se forma un resto de urea con el grupo α-amino del residuo de arginina es similar a la de los conjugados en los que se forma un resto de carbamato

5 En este experimento se comparó la actividad biológica de conjugados, en particular, conjugados de BTA, a base de peptidomiméticos cíclicos de fórmula general I en los que se forma un resto de urea con el grupo α-amino del residuo de arginina, con la de los conjugados en los que se forma un resto carbamato.

10 Los conjugados específicos ensayados fueron los conjugados **1** y **5**, en los que el residuo de aminoácido A₁ en la fórmula general I es un ácido diaminopropiónico o un residuo de lisina, respectivamente; la molécula BTA está unida al N-terminal del peptidomimético cíclico sin un espaciador; y el radical designado como X en la fórmula general I es -NH(CH₂)₂-; y los conjugados **7** y **8** que tienen una estructura similar en la que el radical designado como X es -O(CH₂)₂- en lugar de -NH(CH₂)₂-. La actividad biológica de los conjugados se ensayó en el modelo de carcinoma de colon, así como en el carcinoma de ovario en ambos ensayos de unión *in vivo* e *in vitro* que utilizan células de carcinoma de ovario humano, como se describe en Materiales y Métodos.

15 La actividad biológica de los conjugados **1** y **5** en el modelo de carcinoma ovárico se describe en la **Tabla 3**. Como se muestra en la **Tabla 6**, los conjugados en los que se forma un resto de urea con el grupo α-amino del residuo de arginina tenían una actividad similar a la de los conjugados correspondientes en los que se forma un resto de carbamato, indicando que la naturaleza del resto formado con el grupo α-amino del residuo de arginina no afectaba a la actividad biológica del conjugado.

20 **Tabla 6:** La actividad biológica de los conjugados BTA basados en peptidomiméticos cíclicos de la fórmula general I en los que se forma un resto urea vs. carbamato con el grupo α-amino del residuo de arginina

Conjugado	Modelo de carcinoma de colon/ovario (<i>in vivo</i>)	Ensayo de unión a integrina (<i>in vitro</i>)
1	<u>Colon</u> - Ortotópico: acumulación en el tumor hasta 8 h. Aclaración completa a las 12 h.	Unión
5	<u>Colon</u> - SC: la fluorescencia se extiende por todo el cuerpo durante 8 horas. A las 10 h, señal fuerte en hígado y tumor. A las 14-24 horas, sólo en el tumor (n = 1); Ortotópico: acumulación en el tumor hasta 8 h. Aclaración completa a las 12 h.	Unión
7	<u>Colon</u> - la fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 8 horas. A las 10-24 horas, sólo en el tumor.	
	<u>Ovario</u> - la fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 8 horas. A las 10-24 horas, sólo en el tumor.	Unión
8	<u>Colon</u> - la fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 6 horas. A las 8 h, se acumula en el tumor y el hígado. A las 12-14 horas, sólo en el tumor. Aclaración casi completa a las 24 hrs.	
	<u>Ovario</u> - la fluorescencia se extiende por todo el cuerpo hasta 6 horas. A las 8 h, en el tumor y el hígado. A las 14 horas, sólo en el tumor. Aclaración casi completa a las 24 h.	Unión
* La caracterización de cada conjugado se presenta en la tabla 1 anterior.		

Ejemplo 7. La actividad biológica de los conjugados derivados de BTA basados en peptidomiméticos cíclicos de la fórmula general I en la que el resto taurina del BTA se sustituye por diferentes diaminas es similar a la de los conjugados no derivatizados correspondientes

25 Cuatro diferentes conjugados de derivados de bacterioclorofila basados en peptidomiméticos cíclicos de la fórmula general I, conjugados identificados en la presente invención como **37-40**, fueron sintetizados, y su actividad biológica analizada en células de carcinoma de ovario humano MLS utilizando el ensayo de unión a integrina. Estos conjugados se basaron en los conjugados **1** y **4** en los que el resto taurina (-NH-(CH₂)₂-SO₃H) en el resto BTA se reemplazó por diferentes nucleófilos, en particular, -NH-(CH₂)₂-NH₂ y -NH-(CH₂)₂-NH-CH₃.

30

El peptidomimético cíclico para estos conjugados se sintetizó de acuerdo con el Método A descrito anteriormente. Después de la ciclización y la eliminación de Dde, se añadió a la resina de peptidilo una solución de Bfeida (2 eq), activada por PyBoP (2 eq), HOBt (2 eq), DIEA (6 eq) en DMF y se agitó durante 2 h bajo argón. La resina se lavó con DMF ocho veces (monitorización por ensayo de ninhidrina). Se añadió una disolución de diamina (30 eq) en DMF a la resina de peptidilo y se agitó durante 1 h bajo argón seguido de lavado con DMF. El péptido se escindió de la resina como se describe en Materiales y Métodos, y los conjugados crudos se purificaron por RP-HPLC. Como se muestra en la **Tabla 7**, la actividad biológica de todos estos conjugados fue similar, indicando que en estos casos, el grupo amino no tiene efecto sobre la actividad biológica y su comportamiento es casi el mismo que el del sulfonato en la taurina.

10 **Tabla 7:** La actividad biológica de varios conjugados BTA sustituidos basados en peptidomiméticos cíclicos de la fórmula general I

Conjugado	X*	A ₁ *	Espaciador	Sonda	J*	Ensayo de unión a integrina (<i>in vitro</i>)
1	NH (CH ₂) ₂	Dap	-	BTA	-	Unión
37	NH (CH ₂) ₂	Dap	-	BTA sustituido	-NH- (CH ₂) ₂ -NH ₂	Unión
38	NH (CH ₂) ₂	Dap	-	BTA sustituido	-NH- (CH ₂) ₂ -NH-CH ₃	Unión
39	NH (CH ₂) ₂	Orn	-	BTA sustituido	-NH- (CH ₂) ₂ -NH ₂	Unión
40	NH (CH ₂) ₂	Orn	-	BTA sustituido	-NH- (CH ₂) ₂ -NH-CH ₃	Unión

* X y A₁ se definen de acuerdo con las definiciones de la fórmula general I.

* J representa el nucleófilo específico que sustituye la taurina en BTA.

Ejemplo de referencia 8: El tamaño del anillo de un peptidomimético cíclico de la fórmula general II afecta a la actividad biológica del conjugado basado en el mismo

15 Con el fin de examinar si el tamaño del anillo del peptidomimético cíclico de fórmula general II afecta a la actividad biológica del conjugado, la actividad de varios conjugados de BTA basados en peptidomiméticos cíclicos de fórmula general II que tienen los mismos residuos de aminoácidos A₁ (Lys) y A₂ (Phe), pero diferentes residuos de aminoácidos A₃, en particular, Dap, Dab, Orn y Lys, que tienen de una a cuatro unidades de metileno, respectivamente, en la cadena lateral, se ensayaron en ambos modelo de carcinoma ovárico *in vivo* y ensayo de unión *in vitro* utilizando células de carcinoma de ovario humano, como se describe en Materiales y Métodos.

20 La **Tabla 8** muestra los diversos conjugados BTA ensayados y su actividad biológica. Como se muestra, la actividad biológica de los conjugados probados disminuyó al aumentar el tamaño del anillo del peptidomimético cíclico de 20 átomos a 23 átomos, indicando que un tamaño de anillo mayor de 20 átomos no encajaba en el sitio de unión de la integrina.

25 **Tabla 8:** La actividad biológica de conjugados de BTA basados en peptidomiméticos cíclicos de fórmula general II que tienen diferentes tamaños de anillo

Conjugado	Tamaño del anillo (Nº de átomos)	Modelo de carcinoma ovárico (<i>in vivo</i>)	Ensayo de unión a integrina (<i>in vitro</i>)
41 (Referencia)	20	Acumulación en el tumor hasta 8 h. Aclaración completa a las 12 h.	Unión
46 (Referencia)	21		Unión débil
47 (Referencia)	22		Unión débil

Conjugado	Tamaño del anillo (Nº de átomos)	Modelo de carcinoma ovárico (<i>in vivo</i>)	Ensayo de unión a integrina (<i>in vitro</i>)
48 (Referencia)	23		Unión débil
* La caracterización de cada conjugado se presenta en la Tabla 2 anterior.			

Ejemplo de Referencia 9: Las características del residuo de aminoácido A₂ en un peptidomimético cíclico de la fórmula general II afecta a la actividad biológica del conjugado basado en el mismo

5 Con el fin de examinar si el tamaño y la estructura del residuo aminoácido A₂ en el peptidomimético cíclico de fórmula general II, unido a través de su grupo α-amino al C=O de la cadena principal y a través de su grupo α-carboxilo al resto de aminoácido A₃, afecta a la actividad biológica del conjugado, teniendo la actividad de varios conjugados de BTA basados en peptidomiméticos cíclicos de fórmula general II los mismos residuos de aminoácidos A₁ (Lys) y A₃ (Dap), pero diferentes residuos de aminoácidos A₂, en particular, Phe, Val, D-Phe, Gly y Asp, se ensayaron en ambos el modelo de carcinoma ovárico *in vivo* y el ensayo de unión *in vitro* utilizando células de carcinoma de ovario humano, como se describe en Materiales y Métodos.

10 La **Tabla 9** muestra los diversos conjugados BTA ensayados y su actividad biológica. Como se muestra, la actividad biológica de los conjugados **41** (Referencia), **42** (Referencia) y **43** (Referencia), que tienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos A₂, fue mayor que la de los conjugados **44** (Referencia) y **45** (Referencia), que son más polares, posiblemente debido a las interacciones hidrofóbicas con la bolsa hidrofoba en el sitio de unión de la integrina. El hecho de que el conjugado **43** (Referencia) era menos activo que el conjugado **41** (Referencia) puede deberse a la configuración del primero, lo que sugiere que la configuración D no encaja completamente en la cavidad hidrofóbica.

Tabla 9: La actividad biológica de los conjugados de BTA basados en peptidomiméticos cíclicos de fórmula general II que tiene diferentes residuos de aminoácidos A₂

Conjugado	A ₂	Actividad biológica (carcinoma de ovario)
41 (Referencia)	Phe	<i>In vitro</i> : Unión
		<i>In vivo</i> : Se acumula en el carcinoma ovárico MLS, permanece en el tumor hasta 24 horas después de la inyección y se limpia del cuerpo y del tumor a las 48 horas.
		<i>Ortotópico</i> : A las 11 horas después de la inyección, la alta fluorescencia es detectable en el área del tumor, éter SC u ortotópico. A las 24 h, el fármaco se eliminó del cuerpo, pero en el área tumoral el nivel de fluorescencia era todavía detectable hasta 3 días después de la inyección. La acumulación del fármaco no depende del sitio de implantación.
42 (Referencia)	Val	<i>In vitro</i> : Unión
		<i>In vivo</i> : Este compuesto se acumula en tumores ováricos y de colon a las 24 horas después de la inyección y permanece allí hasta 72 horas.
43 (Referencia)	Dhe	<i>In vitro</i> : Unión débil
44 (Referencia)	Gly	<i>In vitro</i> : Ninguna unión
45 (Referencia)	Asp	<i>In vitro</i> : Ninguna unión
* La caracterización de cada conjugado se presenta en la Tabla 2 anterior.		

20 **Ejemplo 10. La unión competitiva de varios conjugados BTA de la presente invención a la integrina α_vβ₃ humana**

En este estudio, el nivel de unión competitiva, es decir, el IC₅₀, de varios conjugados de BTA de la presente invención a la integrina α_vβ₃ humana se ensayó frente a la biotina-c[RGDFK], como se describe en Material y Métodos. Los conjugados específicos ensayados fueron los conjugados **1**, **4**, **5**, **7**, **11** y **28** (basados en los

peptidomiméticos cíclicos que contienen RGD de la fórmula general I, véase el Ejemplo 1), así como el conjugado **41** (Referencia) (basado en un peptidomimético cíclico que contiene RGD de fórmula general II, véase el Ejemplo 2), y los valores IC₅₀ medidos para estos conjugados se presentan en la **Tabla 10**.

5 Como se muestra, los conjugados **1**, **7**, **28** y **41** (Referencia) mostraron el IC₅₀ más bajo (10⁻⁴ M), es decir, la actividad biológica más alta; el IC₅₀ del conjugado **4** fue ligeramente superior (3x10⁻⁴ M); y el IC₅₀ de los conjugados **5** y **11** fue el más alto (3x10⁻³ M).

Tabla 10: El nivel de unión competitiva (IC₅₀) de varios conjugados de BTA de la presente invención a integrina α_vβ₃

Conjugado	IC ₅₀ (M) a integrina α _v β ₃ humana
1	10 ⁻⁴
4	3x10 ⁻⁴
5	3x10 ⁻³
7	10 ⁻⁴
11	3x10 ⁻³
28	10 ⁻⁴
41 (Referencia)	10 ⁻⁴

* La caracterización de cada uno de los conjugados 1, 4, 5, 7, 11 y 28, y del conjugado 41, se presenta en la **Tabla 1** y la **Tabla 2**, respectivamente, en este documento anteriormente.

10 **Ejemplo 11. Los conjugados 1, 4 y 41 (Referencia) se acumulan en el núcleo necrótico de los tumores necróticos MDA**

En este estudio, se examinaron el patrón específico de acumulación de los conjugados **1**, **4** y **41** (Referencia) en lesiones primarias ortotópicas del modelo de carcinoma mamario, monitorizadas por la señal de fluorescencia generada por el tumor, y la señal de fluorescencia generada por estos conjugados. También se determinó la localización de los conjugados en los tumores a medida que progresaba el tiempo. Los animales se trataron como se describe en Materiales y Métodos, y la fluorescencia de ambas células tumorales y los conjugados **1**, **4** y **41** (Referencia) fueron monitoreados por IVIS[®] 100 Imaging System desde el día 1 hasta el 7.

15 Las **Figs. 1A, 1B y 1C** muestran los patrones de acumulación de los conjugados **1**, **4** y **41** (Referencia), respectivamente, en el tumor principal primario ortotópico MDA-MB-231-RFP de mama humano ortotópico en la almohadilla mamaria de ratones desnudos hembra CD-1, utilizando el Xenogen IVIS[®] System. Las imágenes completas de los animales se registraron concomitantemente usando conjuntos de filtros que comprenden un filtro de excitación de 500-550 nm y un filtro de emisión de 575-650 nm. Conjunto de filtros de fondo para la sustracción de la auto fluorescencia del tejido: filtro de excitación 460-490 nm y filtro de emisión 575-650 nm. Conjunto de filtros principal de imágenes fotosensibilizadoras: filtro de excitación 665-695 nm, filtro de emisión 810-875 nm.

20 Todos los conjugados se acumularon en el tumor mientras que se eliminaban por completo del hígado, proporcionando una formación de imágenes selectiva del tumor a ≥ 3 días al final del período de seguimiento a los 7 días después de la inyección y después un aclaramiento muy lento. El tamaño y la ubicación del tumor no cambió a lo largo del experimento como se ve por el rojo de las imágenes de cuerpo entero *in vivo*. Como se muestra en las **Figs. 2A, 2B y 2C**, la localización de estos conjugados seis días después de la inyección se encuentra en el área necrótica del tumor.

25 **Ejemplo 12. La actividad biológica de los conjugados 1, 4 y 41 (Referencia) en células de cáncer de próstata**

En este estudio, se examinó la actividad biológica de los conjugados **1**, **4** y **41** (Referencia) en células de cáncer de próstata LNCaP que expresaban integrina α_vβ₃. Como se muestra anteriormente, estos conjugados específicos mostraron actividad en células de carcinoma de ovario, carcinoma de colon y cáncer de mama.

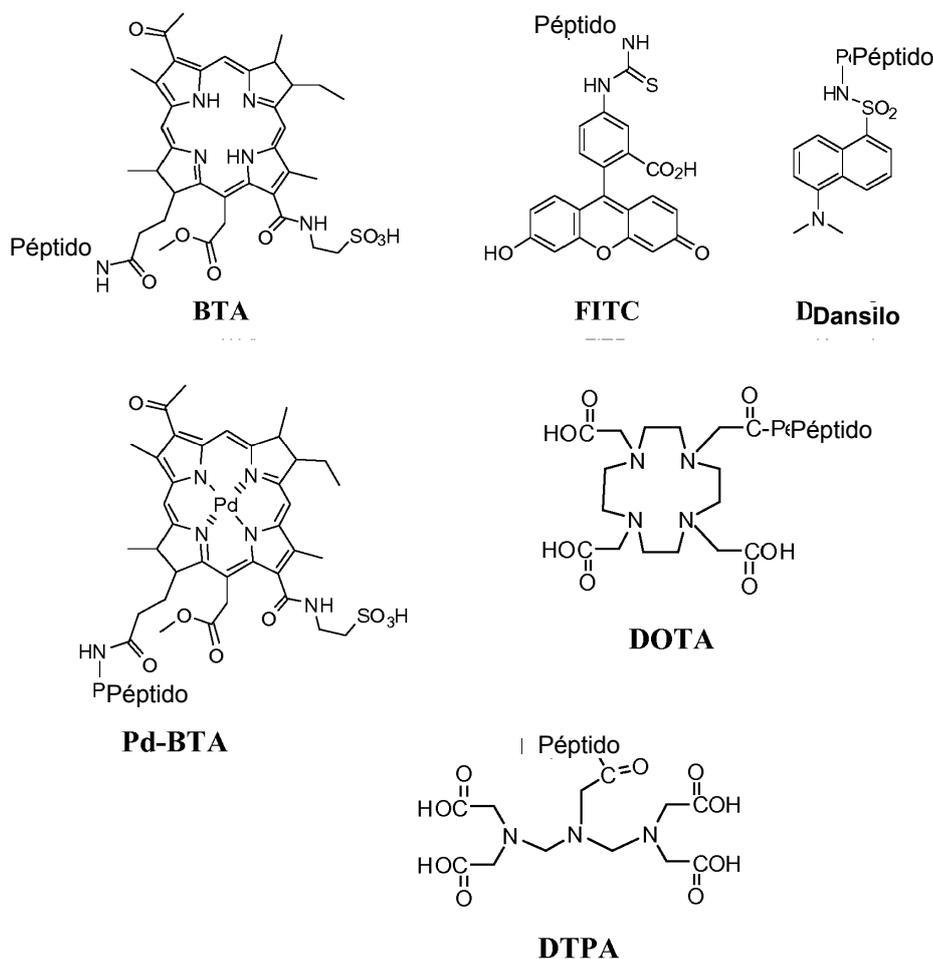
30 La acumulación de los conjugados en el tumor implantado se monitorizó a las 8, 11, 14, 24 y 48 horas después de la inyección usando el sistema Xenograph IVIS[®] y como se muestra en las **Figs. 3A, 3B y 3C**, referentes a los conjugados **1**, **4** y **41** (Referencia), respectivamente, se observó el nivel de fluorescencia más alto en el área tumoral

a las 8 a 11-14 horas después de la inyección, y el conjugado permaneció en el tumor hasta 48 horas en los casos de los conjugados **1** y **4**, y hasta 24 horas en el caso del conjugado **41** (Referencia). Como se muestra adicionalmente, los perfiles de acumulación de estos conjugados en tumores de próstata y de ovario fueron casi los mismos.

5 Ejemplo 13. La toxicidad de los conjugados **1**, **4** y **41** (referencia) en ratas

Se realizó un estudio de toxicidad de los conjugados **1**, **4** y **41** (Referencia) en ratas Wistar (5 hembras, 170-190 g y 5 machos, 288-315 g). Los diversos conjugados a la dosis de 50 mg/kg se inyectaron en la vena de la cola durante 1-2 min. Los animales sobrevivieron y no mostraron ningún comportamiento o problemas de motilidad. Después de cinco días, no se encontraron evidencias de necrosis o inflamación en el hígado o en los riñones de estos animales, lo que sugiere que estos conjugados no son tóxicos a la dosis ensayada.

Esquema 2: Las estructuras químicas de los diversos restos de carga útil usados, unidos a peptidomiméticos cíclicos (marcados como "Péptido") de la presente invención



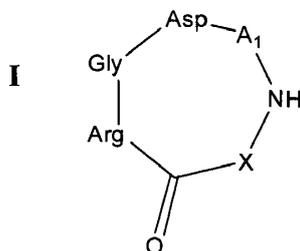
Referencias

- Arap W., Haedicke W., Bernasconi M., Kain R., Rajotte D., Krajewski S., Ellerby H.M., Bredesen D.E., Pasqualini R., Ruoslahti E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2002, 99, 1527-1531
- 15 Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E., Science, 1998, 279, 377-380
- Assa - Munt N., Jia X., Laakkonen P., Ruoslahti E., Biochemistry, 2001, 40, 2373 - 2378
- Banfi, L. Basso A., Damonte G., De Pellegrini F., Galatini A., Guanti G., Monfardini I., Riva R., Scapolla C., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, 17, 1341-1345
- 20 Belvisi L., Riccioni T., Marcellini M., Vesci L., Chiarucci I., Efrati D., Potenza D., Scolastico C., Manzoni L., Lombardo K., Stasi MA, Orlandi A., Ciucci A., Nico B., Ribatti D., Giannini G., Presta M., Carminati P., Pisano C., Mol. Cancer Ther., 2005, 4, 11

- Chaleix V., Sol V., Huang Y.M., Guilloton M., Granet R., Blais J.C., Krausz P., *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 1486 - 1493
- Dijkgraaf I., Kruijtzter J. A.W., Frielink C., Soede A.C., Hilbers H.W., Oyen W.J.G., Corstens F.H.M., Liskamp R.M.J., Boerman O.C., *Nuclear Medicine and Biology*, 2006, 33, 953-961
- D'Souza S.E., Ginsberg M.H., Plough E.F., *Trends Biochem. Sci.*, 1991, 16, 246 - 250
- 5 Ellerby H.M., Arap W., Ellerby L.M., Kain R., Andrusiak R., Del Río G., Krajewski S., Rao R., Ruoslahti E., Bredesen D.E., Pasqualini R., *Nat. Med.*, 1999, 5, 1032 - 1038
- Goligorsky M.S., Kessler H., Romanov V.I., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1998, 13, 254 - 263
- Hardan I., Weiss L., Hershkovitz R., Greenspoon N., Alon R., Cahalon L., Reich S., Slavin S., Lider O., *Int. J. Cancer*, 1993, 55, 1023 - 1028
- 10 Haubner R., Gratias R., Diefenbach B., Goodman S.L., Jonczyk A., Kessler H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 7461-7472
- Haubner R., Wester H.J., Weber W.A., Mang C., Ziegler S.L., Goodman S.L., Senekowitsch-Schmidtke R., Kessler H., Schwaiger M., *Cancer res.*, 2001, 61, 1781-1785
- Joshi P., Chung C.Y., Aukhil I., Erickson H.P., *J Cell Sci.*, 1993, 106, 389-400
- 15 Kawaguchi M., Hosotani R., Ohishi S., Fujii N., Tulachan SS, Koizumi M., Toyoda E., Masui T., Nakajima S., Tsuji S., Ida J., Fujimoto K., Wada M., Doi R., Imamura M., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 2001, 288, 711-717
- Koivunen E., Wang B., Dickinson C.D., Ruoslahti E., *Methods Enzymol.*, 1994, 245, 346 - 369
- Lark MW, Stroup GB, Hwang SM, James IE, Rieman DJ, Drake FH, Bradbeer JN, Mathur A., Erhard KF, Newlander KA, Ross ST, Salyers KL, Smith BR, Miller WH, Huffman WF, Gowen M., *JPET*, 1999, 291, 612 - 617
- 20 Locardi E., Mullen D.G., Mattern R., Goodman M., *J. Peptide Sci.*, 1999, 5, 491 - 506
- Pasqualini R., Ruoslahti E., *Nature*, 1996, 380, 364 - 366
- Pasqualini R., Koivunen E., Ruoslahti E., *Nat. Biotechnol.*, 1997, 15, 542 - 546
- Pasqualini R., Koivunen E., Kain R., Lahdenranta J., Sakamoto M., Stryhn A., Ashmun R.H., Shapiro L.H., Arap W., Ruoslahti E., *Cancer res.*, 2000, 60, 722-727
- 25 Pierschbacher M., Ruoslahti E., *Nature*, 1984, 309, 30 - 33
- Pierschbacher M.D., Ruoslahti E., *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 17294 - 17298
- Raboisson P., Manthey C.L., Chaikin M., Lattanze J., Crysler C., Leonard K., Pan W., Tomczuk B.E., Marugán J.J., *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, 41, 847 - 861
- Romanov V.I., Goligorsky M.S., *The prostate*, 1999, 39, 108-118
- 30 Ruoslahti E., *Rev. Annual. Cell Dev. Biol.*, 1996, 12, 697 - 715
- Ruoslahti E., *Seminars in cancer biology*, 2000, 10, 435-442
- Ruoslahti E., *DDT*, 2002, 7, 1138 - 1143
- Ruoslahti E., Pierschbacher M.D., *Science*, 1987, 238, 4826, 491 - 497
- Ruoslahti E., Rajotte D., *Annu. Rdo. Immunol.*, 2000, 18, 813 - 827
- 35 Saiki I., Murata J., Iida J., Sakurai T., Nishi N., Matsuno K., Azuma I., *Br. J. Cancer*, 1989, 60, 722 - 728
- Su Z.F., Liu G., Gupta S., Zhu Z., Rusckowski M., Hnatowich D.J., *Bioconjug. Chem.*, 2002, 13, 561 - 570
- Van Hagen P.M., Breeman W.A., Bernard H.F., Schaar M., Mooij C.M., Srinivasan A., Schmidt M.A., Krenning E.P., de Jong M., *Int. J. Cancer*, 2000, 90, 186-198

REIVINDICACIONES

1. Un peptidomimético cíclico que contiene arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) de la fórmula general I:



donde

5 el resto de arginina está unido por su grupo α -amino al C=O de la cadena principal;

X es -NH-R-, -O-R-, o -S-R-, en donde R es un radical hidrocarbilo derivado de etano, eteno o ciclopropano; y

10 A₁ es un resto de aminoácido que lleva un grupo amino en su cadena lateral, unido por su grupo carboxilo al NH de la cadena principal y por su grupo amino de cadena lateral al grupo α -carboxilo del residuo de ácido aspártico, dicho aminoácido se selecciona de ácido diaminopropiónico (Dap), ornitina (Orn) o lisina (Lys).

2. El peptidomimético cíclico que contiene RGD de la reivindicación 1, en el que X es -NH-R-, -O-R- o -S-R- y R es un hidrocarbilo derivado de etano.

3. El peptidomimético cíclico que contiene RGD de la reivindicación 1 ó 2, en el que:

15 (i) X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, y A₁ es Dap, Orn o Lys; o

(ii) X es -O-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, y A₁ es Dap o Lys.

20 4. Un conjugado del peptidomimético cíclico que contiene RGD de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un resto de una carga útil seleccionada de una sonda fluorescente, un fotosensibilizador, un agente quelante o un agente citotóxico, unido al grupo α -amino del residuo de aminoácido A₁ en el peptidomimético, opcionalmente a través de un espaciador.

5. El conjugado de la reivindicación 4, en el que dicho espaciador se selecciona entre un resto de un aminoácido natural o no natural, un resto de un péptido pequeño que tiene no más de 8 aminoácidos, un resto de diamina, un resto hidrocarbilo C₁-C₂₅, o un polímero soluble.

25 6. El conjugado de la reivindicación 5, en el que dicho aminoácido es glicina (Gly), β -alanina (β -Ala), fenilalanina (Phe), D-fenilalanina (D-Phe), 1-naftilalanina (1-Nal) D-1-naftilalanina (D-1-Nal), ácido γ -aminobutírico (GABA) o ácido 3- (aminometil)benzoico; dicho residuo de diamina es -HN-(CH₂)₂-NH- o -HN-(CH₂)₄-NH-; dicho hidrocarbilo C₁-C₂₅ es un alqueno C₁-C₁₀ o fenileno, sustituido por dos grupos funcionales finales tales como OH, COOH, SO₃H, COSH o NH₂, formando así los grupos éter, éster, amida, tioamida o sulfonamida; y dicho polímero soluble se selecciona entre polietilenglicol (PEG) lineal o ramificado o sus copolímeros, poliláctida (PLA) o sus copolímeros, poliésteres que tienen grupos funcionales adecuados basados en PLA, poliglicolida (PGA), policaprolactona (PCL) o sus copolímeros, o poliamidas basadas en polimetacrilamida o sus copolímeros, teniendo dichos polímeros grupos funcionales adecuados.

7. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la carga útil es una sonda fluorescente, un fotosensibilizador, un agente quelante o un agente citotóxico.

35 8. El conjugado de la reivindicación 7, en el que dicha sonda fluorescente es BPheide taurina amida (BTA), fluorenil isotiocianato (FITC), dansilo, rodamina, eosina o eritrosina; dicho fotosensibilizador es una porfirina, una clorofila o una bacterioclorofila, preferiblemente un derivado de clorofila o de bacterioclorofila, más preferiblemente un derivado de bacterioclorofila; dicho agente quelante es DTPA o DOTA; y dicho agente citotóxico es un agente quimioterapéutico de antraciclina seleccionado de doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarubicina o mitoxantrona, preferiblemente doxorubicina, un inhibidor mitótico, preferiblemente paclitaxel, un inhibidor de topoisomerasa I, preferiblemente camptotecina, o un inhibidor de topoisomerasa II, preferiblemente elipticina.

40 9. El conjugado de la reivindicación 4, en el que:

(i) la carga útil es BTA, unida directamente a A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, y A₁ es Dap, Orn, o Lys;

- (ii) la carga útil es dansilo, unido directamente a A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, y A₁ es Dap, Orn o Lys;
- (iii) la carga útil es BTA, unido directamente a A₁, X es -O-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, y A₁ es Dap o Lys;
- 5 (iv) la carga útil es BTA, unido a través de un espaciador a A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, A₁ es Dap, y el espaciador es un resto de GABA o D-Phe, o un residuo de 1,4-diaminobutano;
- (v) la carga útil es FITC, unido mediante un espaciador a A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano y:
- (A) A₁ es Dap, y el espaciador es un resto β-Ala; o
- 10 (B) A₁ es Lys, y el espaciador es un resto de β-Ala o GABA;
- (vi) la carga útil es dansilo, unido a través de un espaciador a A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, A₁ es Dap o Lys, y el espaciador es un resto Gly;
- (vii) la carga útil es el derivado de bacterioclorofila Pd-BTA, enlazado directamente con A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, y A₁ es Dap;
- 15 (viii) la carga útil es DTPA o DOTA, unido directamente a A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, y A₁ es Dap;
- (ix) la carga útil es un BTA sustituido en el que el resto taurina se sustituye por -NH-(CH₂)₂-NH₂, dicho BTA sustituido está unido directamente a A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, y A₁ es Dap o Orn; o
- 20 (x) la carga útil es un BTA sustituido en el que el residuo de taurina se sustituye por -NH-(CH₂)₂-NH-CH₃, dicho BTA sustituido está unido directamente a A₁, X es -NH-R-, R es un hidrocarbilo derivado de etano, y A₁ es Dap o Orn.
10. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la carga útil es una sonda fluorescente.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, con fines de diagnóstico, preferiblemente para la visualización de órganos y tejidos, o para el diagnóstico de tumores, más preferiblemente para el diagnóstico de tumores por imagen de fluorescencia dinámica, técnica de radiodiagnóstico tal como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía por emisión de fotón único (SPET), o resonancia magnética molecular (MRI).
- 30 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la carga útil es un fotosensibilizador.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, para terapia fotodinámica (PDT), preferiblemente para PDT de tumores o tejidos no neoplásicos, más preferiblemente para PDT de un tumor primario o metástasis de melanoma, cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, cerebro o cabeza y cuello, o para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad, o para el tratamiento de la obesidad limitando el suministro vascular al tejido adiposo.
- 35 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la carga útil es un agente quelante.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, para su uso en radiografía o radioterapia.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la carga útil es un agente citotóxico, preferiblemente para uso en quimioterapia dirigida.
- 40 18. Un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con fines de diagnóstico, terapia fotodinámica (PDT), radioimagen o radioterapia, o quimioterapia dirigida.

Fig. 1A

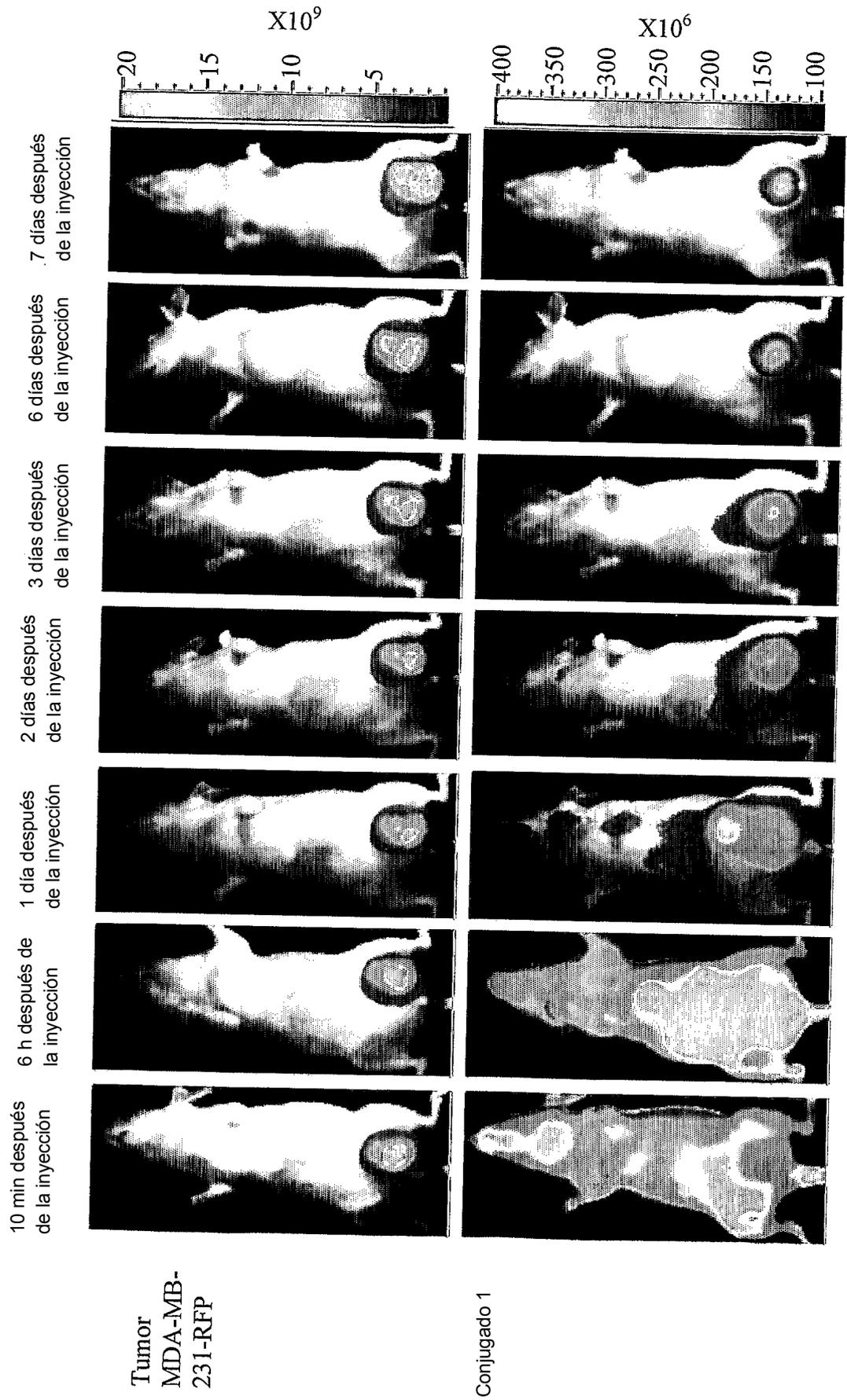


Fig. 1B

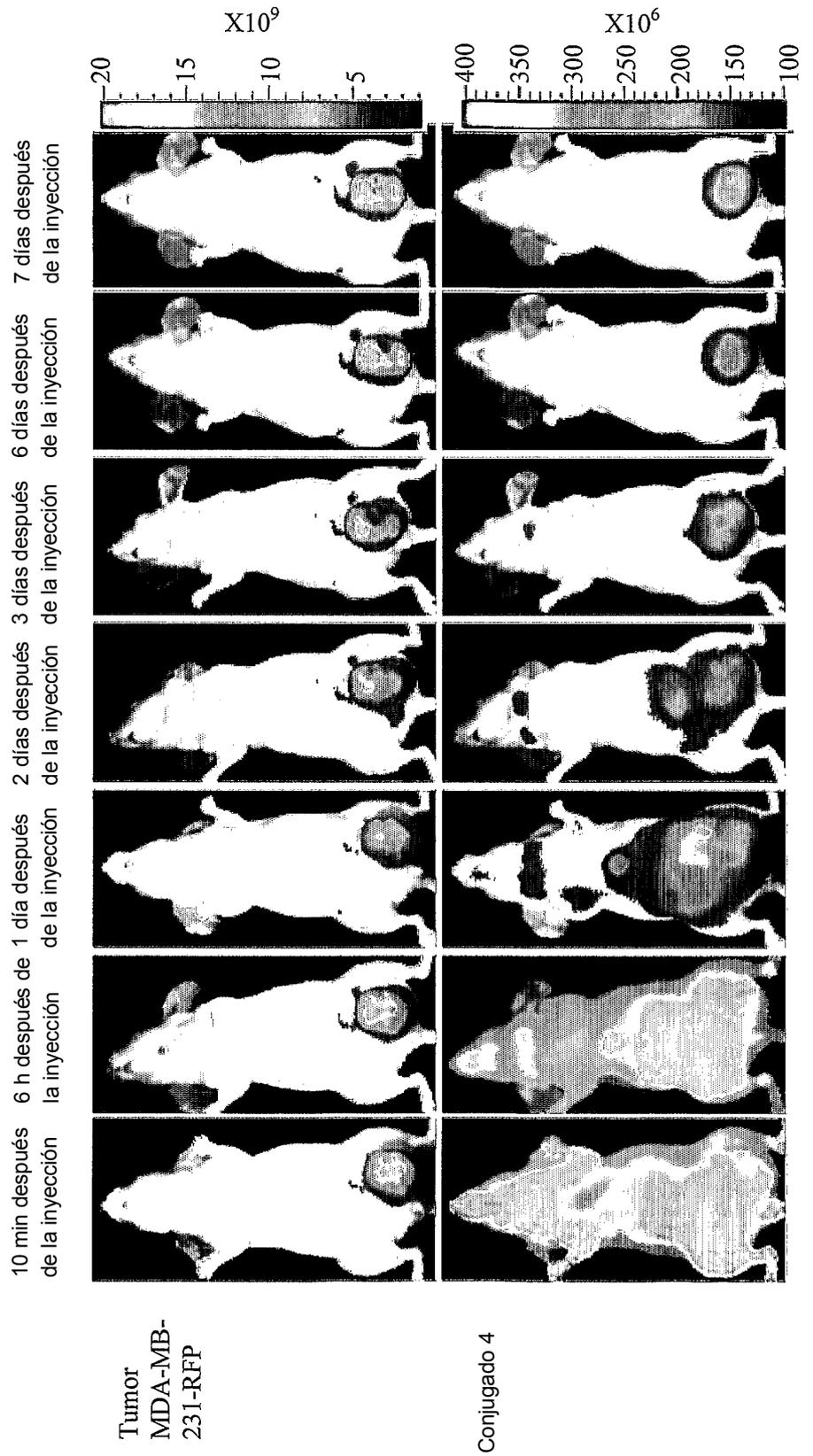


Fig. 1C

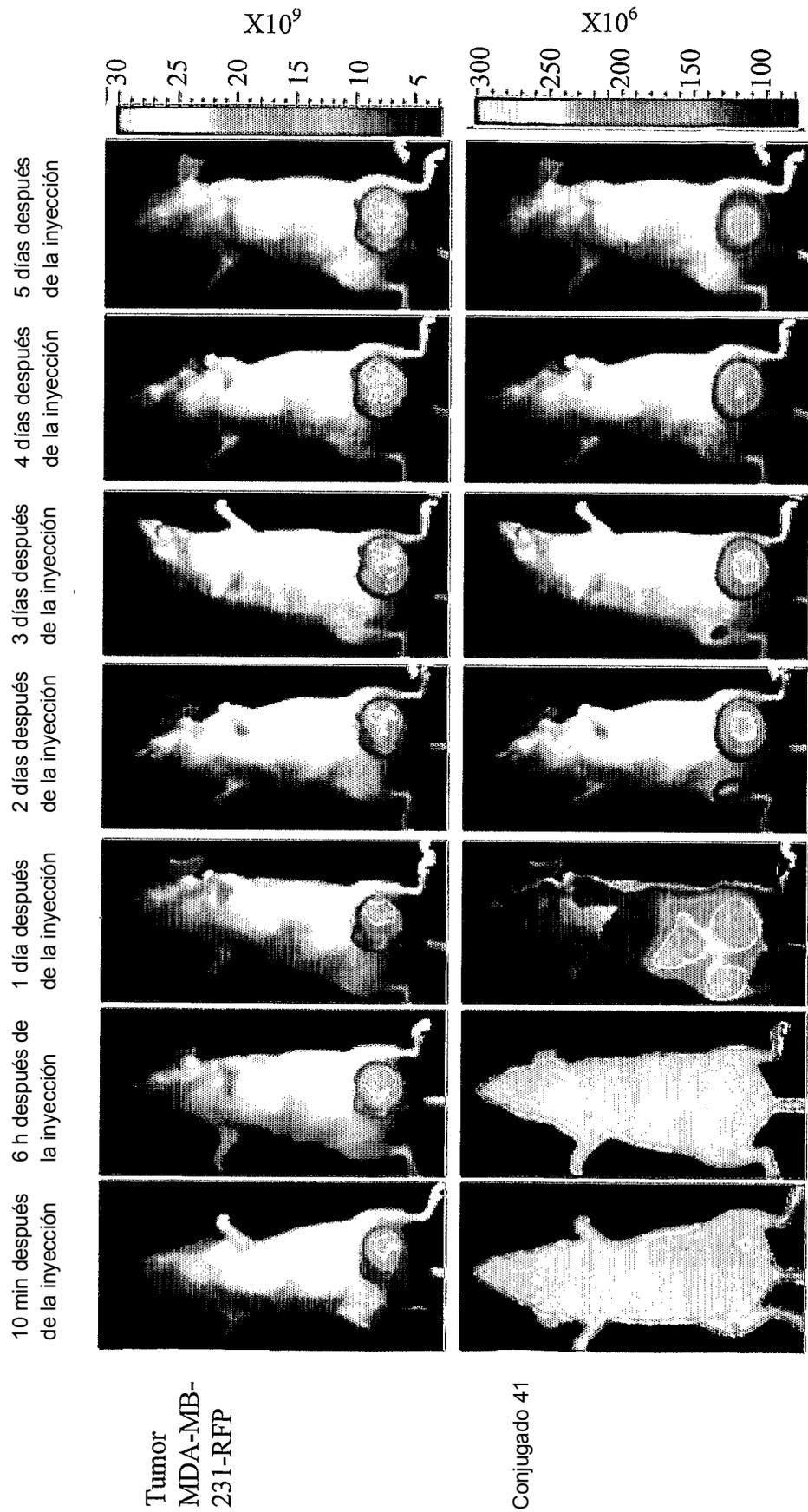


Fig. 2A

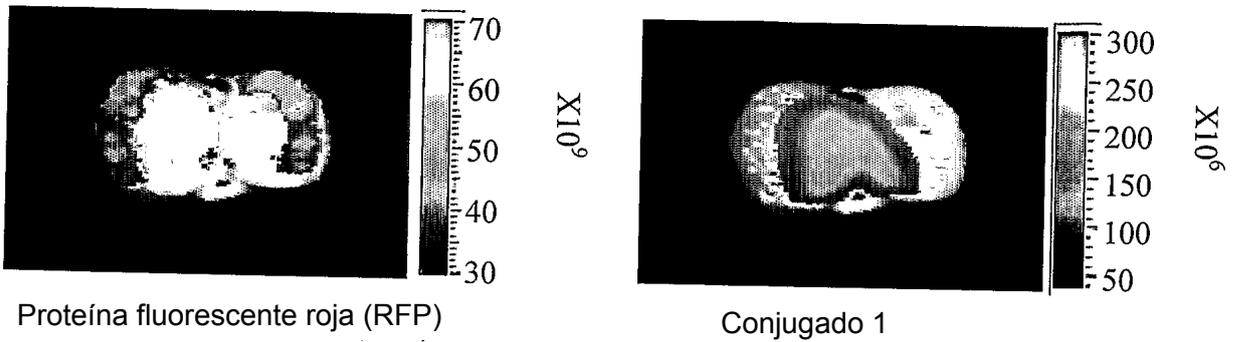


Fig. 2B

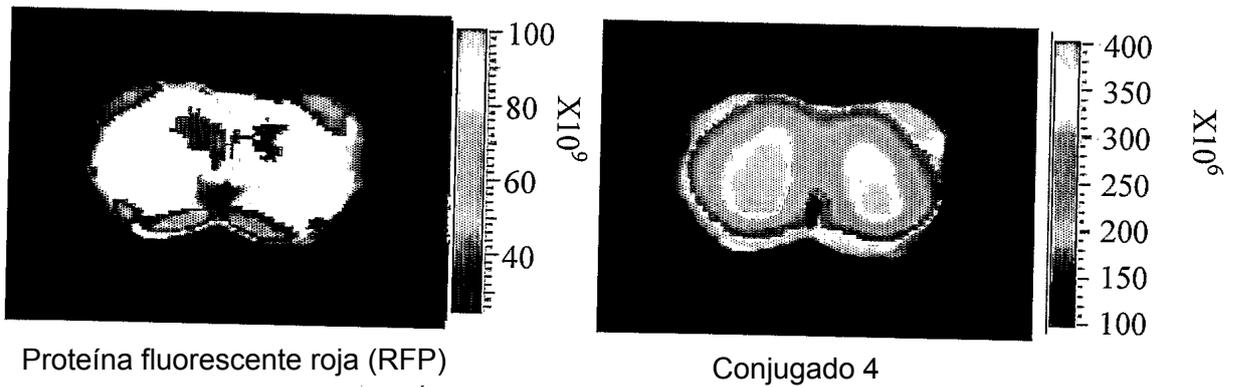


Fig. 2C

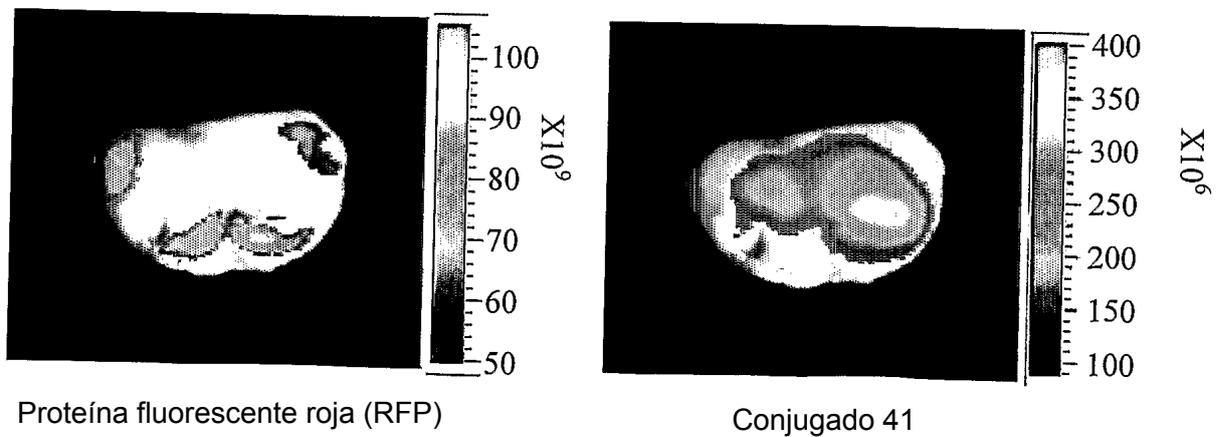


Fig. 3A

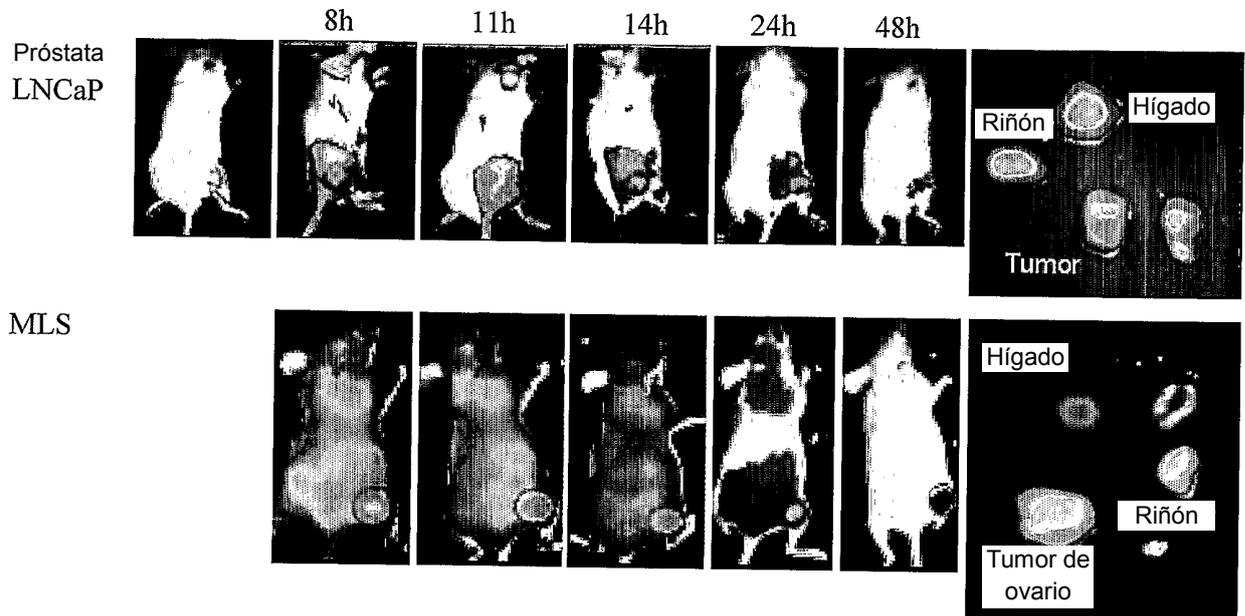


Fig. 3B

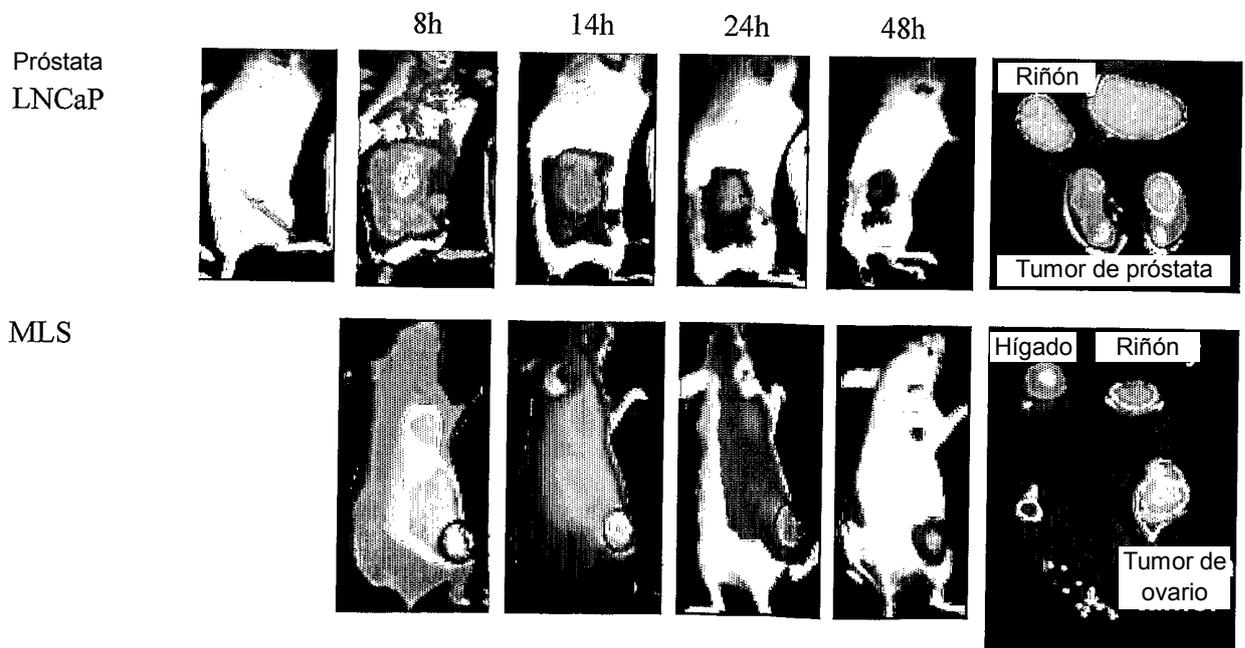


Fig. 3C

