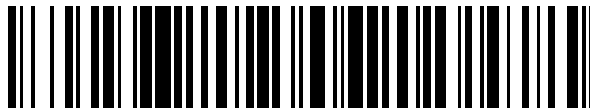


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 852**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

**A61K 49/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2009 E 13185417 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2732826**

54 Título: **Agentes de imagenología fluorescentes**

30 Prioridad:

**18.01.2008 US 22024 P**

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

**12.03.2018**

73 Titular/es:

**VISEN MEDICAL, INC. (100.0%)  
940 Winter Street  
Waltham MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**RAJOPADHYE, MILIND;  
GROVES, KEVIN y  
PREDA, DORIN V**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 658 852 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

Agentes de imaginología fluorescentes

**Antecedentes de la invención**

5 Las técnicas actuales para valorar los criterios de valoración molecular en enfermedades normalmente requieren toma de muestras de tejido y sangre, cirugía y, en el caso de animales de experimentación, el sacrificio en diferentes puntos temporales. A pesar de las mejoras en la imaginología no invasiva, se necesitan urgentemente agentes de imaginología no invasivos, más sensibles y específicos y procedimientos. Técnicas de imaginología capaces de visualizar dianas moleculares específicas y/o rutas completas podrían mejorar de forma significativa la capacidad para diagnosticar y valorar la eficacia del tratamiento de intervenciones terapéuticas para muchos estados de enfermedad diferentes. La mayoría de las técnicas de imaginología actuales presentan principalmente información anatómica o fisiológica (por ejemplo, imaginología por resonancia magnética (IRM), tomografía computarizada (TC) y ultrasonidos). Las modalidades más novedosas, tales como la imaginología óptica y las nuevas sondas para imaginología molecular tienen la posibilidad de revolucionar el modo en que se detectan, tratan y monitorizan las enfermedades.

15 La imaginología molecular es un campo en desarrollo en las ciencias de la imaginología que trasciende los límites tradicionales de la estructura y fisiología de la imaginología, y tiene la posibilidad de revolucionar las actuales prácticas de investigación y clínicas hacia una medicina molecular real. El paradigma para la imaginología molecular implica el uso de una sonda "molecular" o agente que se dirija de forma selectiva a un gen, proteína, receptor o una función celular particular, siendo la ausencia, presencia, cantidad o concentración de la diana específica indicativa de un estado particular de enfermedad.

20 En particular, la imaginología óptica ofrece varios atributos de rendimiento potentes que la convierten en una técnica de imaginología molecular realmente poderosa, económica y de alta sensibilidad. De forma específica, la imaginología óptica es rápida, segura, económica y de alta sensibilidad. Los tiempos de exploración son, de forma típica, del orden de segundos a minutos, no hay radiación ionizante, y los sistemas de imaginología son relativamente sencillos de usar. Además, las sondas ópticas pueden diseñarse como agentes de imaginología molecular dinámicos que pueden alterar sus perfiles de información *in vivo* para proporcionar información molecular y funcional en tiempo real. Con el fin de conseguir la máxima penetración y sensibilidad *in vivo*, la elección para la mayoría de los sistemas de imaginología óptica en sistemas biológicos está en la región del espectro de rojo e infrarrojo cercano (NIR), aunque también pueden usarse otras longitudes de onda en la región visible. En el rango de longitudes de onda del NIR, se minimiza la absorción por absorbentes fisiológicamente abundantes tales como hemoglobina o agua.

Aunque se han desarrollado diferentes tipos de sondas para imaginología óptica que incluyen (1) sondas que se activan después de entrar en contacto con la diana (por ejemplo, por unión o interacción), (2) balizas que cambian con la longitud de onda, (3) sondas fluorescentes multicolor, (4) sondas que tienen elevada afinidad por las dianas, es decir, que permanecen en una región diana mientras que sondas no específicas son eliminadas del organismo (Achilefu et al., *Invest. Radiol.*, 35:479-485, 2000; Becker et al., *Nature Biotech.* 19:327-331, 2001; Bujai et al., *J. Biomed. Opt.* 6:122-133, 2001; Ballou et al. *Biotechnol. Prog.* 13:649-658, 1997; y Neri et al., *Nature Biotech.* 15:1271-1275, 1997), y (5) sondas basadas en semiconductores fluorescentes, existe una constante necesidad de sondas para imaginología que, por ejemplo, puedan proporcionar imágenes de alta calidad e información molecular.

40 El documento WO 2004/028449 A2 describe sondas fluorescentes en el infrarrojo cercano inactivadas por dímero de azuleno, "Azulene Dimer-Quenched, Near-Infrared Fluorescent Probes". Yaron et al. (1979) *Anal. Biochem.* 95, 228-235, describe sustrato fluorogénico inactivado intramolecularmente para enzimas hidrolíticas, "Intramolecularly Quenched Fluorogenic Substrate for Hydrolytic Enzymes". Funovics et al. (2003) *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 956-963, describe sensores de proteasas para bioimagenología, "Protease Sensors for Bioimaging". Pham et al. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 3659-3662, describe un dímero de azuleno como un inactivador en el infrarrojo cercano, "An Azulene Dimer as a Near-Infrared Quencher". Harris et al. (2003) *Nature Rev.* 2, 214-221, describe el efecto de la pegilación en productos farmacéuticos, "Effect of Pegylation on Pharmaceuticals".

**Sumario de la invención**

50 La presente invención proporciona agentes de imaginología fluorescentes que tienen propiedades fluorescentes significativamente mejoradas tras la activación y pueden usarse para aplicaciones de imaginología *in vivo* e *in vitro*. Los agentes de imaginología tienen un sistema indicador fluorescente, que en ciertas realizaciones, contiene dos fluoróforos o un fluoróforo y un inactivador, donde uno de los fluoróforos inactiva el otro fluoróforo o el inactivador inactiva el fluoróforo. Aunque los agentes de imaginología pueden tener no más de dos fluoróforos, estos todavía tienen un coeficiente de extinción suficiente para aplicaciones de imaginología *in vivo*. Además, su tamaño permite que los agentes queden rápidamente distribuidos por los tejidos o fluido corporal de un sujeto, lo que permite que el agente se desplace a tejidos o células para la activación por proteasas, unión a receptores de la superficie celular o internalización en las células.

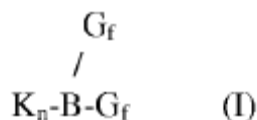
Los agentes de imaginología tienen propiedades fluorescentes mejoradas tras la activación y, bajo determinadas

circunstancias, pueden tener propiedades magnéticas, por ejemplo, propiedades paramagnéticas o superparamagnéticas, de modo que los agentes de imaginología pueden usarse como agentes para IRM o multimodalidad (por ejemplo, imaginología óptica o imaginología por resonancia magnética). Además, los agentes de imaginología pueden incluir opcionalmente restos para diagnóstico o terapéuticos, por ejemplo, metales radiactivos, de modo que los agentes de imaginología resultantes pueden usarse como radiofármacos, agentes de imaginología nuclear o agentes de imaginología multimodalidad (por ejemplo, en un entorno de imaginología óptica y de imaginología nuclear).

En un aspecto, la invención proporciona un agente de imaginología inactivado intramolecularmente. El agente comprende (a) un oligopéptido escindible enzimáticamente que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 residuos aminoácidos; (b) un modificador biológico opcional unido químicamente al oligopéptido escindible enzimáticamente; y (c) bien dos fluoróforos o un fluoróforo y un inactivador, cada uno unido covalentemente, directamente o indirectamente, al oligopéptido o al modificador biológico opcional, en el que un fluoróforo inactiva el otro fluoróforo o el inactivador inactiva el fluoróforo y después de la escisión enzimática del oligopéptido, al menos un fluoróforo se inactiva y es capaz de producir una señal fluorescente mayor cuando se excita por radiación electromagnética que antes de la escisión enzimática del oligopéptido.

El oligopéptido puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 residuos aminoácidos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 14 residuos aminoácidos, de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 residuos aminoácidos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 residuos aminoácidos.

En determinadas realizaciones, el agente de imaginología puede representarse por la Fórmula I:



en la que:

B es  $[M_m, -ECO-M_m]$ ;

ECO es un oligopéptido escindible enzimáticamente;

G es L-F;

F es un fluoróforo o inactivador;

M es un modificador biológico;

K es N-L;

N es un indicador no fluorescente;

L, independientemente, para cada aparición, es un resto enlazador o un enlace;

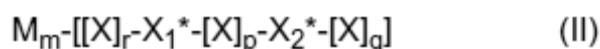
n es un número entero de 0 a 3;

m, independientemente, para cada aparición, es 0 ó 1, y opcionalmente al menos un m es 1; y

f, independientemente, para cada aparición, es un número entero de 0 a 2, en el que el número total de fluoróforos F en el agente no es mayor de 2.

Cada F puede unirse químicamente, directamente o a través del resto enlazador L, a un aminoácido separado del oligopéptido. Alternativamente, al menos un F está unido químicamente, directamente o a través del resto enlazador L, a M. En determinadas realizaciones, ECO es un oligopéptido cíclico.

Además, en determinadas realizaciones, el agente de imaginología está representado por la Fórmula II:



en la que:

X, independientemente, para cada aparición, es un residuo aminoácido;

$X_1^*$  y  $X_2^*$  son cada uno independientemente X-L-F;

L, independientemente, para cada aparición, es un resto enlazador o un enlace;

F es un fluoróforo;

M es un modificador biológico;

m es 0, 1 o 2;

r es un número entero de 0 a 28;

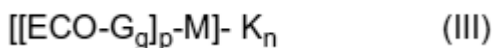
5 p es un número entero de 1 a 28;

q es un número entero de 0 a 28; donde la suma de r, p y q no es mayor de 28.

Dependiendo de las circunstancias, el residuo aminoacídico  $X_1^*$  es una lisina y/o el residuo aminoacídico  $X_2^*$  es una lisina.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un agente de imaginología inactivado intramolecularmente cíclico como se define en la reivindicación 3.

En otro aspecto, la invención proporciona un agente de imaginología inactivado intramolecularmente representado por la Fórmula III.



en la que:

15 ECO es un oligopéptido escindible enzimáticamente;

G es L-F;

F, independientemente, está seleccionado de un fluoróforo o inactivador, en el que al menos un F es un fluoróforo;

L, independientemente, para cada aparición, está seleccionado de un resto enlazador o un enlace;

M es un modificador biológico;

20 K es L-N;

N es un indicador no fluorescente;

p es un número entero de 1 a 4;

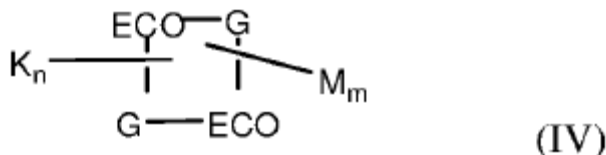
n es un número entero de 0 a 3; y

25 g, independientemente, para cada aparición, es un número entero de 1 a 2, en el que la suma de cada aparición de g no es mayor de 2.

30 El oligopéptido puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 residuos aminoacídicos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 14 residuos aminoacídicos, de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 amino residuos aminoacídicos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 residuos aminoacídicos. En determinadas realizaciones, al menos un F está unido químicamente, directamente o indirectamente, a un residuo de lisina.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un agente de imaginología inactivado intramolecularmente cíclico que comprende (a) un primer fluoróforo unido químicamente, directamente o indirectamente, al extremo C terminal de un primer oligopéptido escindible y unido químicamente, directamente o indirectamente, al extremo N terminal de un segundo oligopéptido opcionalmente escindible; (b) un segundo fluoróforo unido químicamente, directamente o indirectamente, al extremo N terminal del primer oligopéptido escindible y unido químicamente, directamente o indirectamente, al extremo C terminal del segundo oligopéptido opcionalmente escindible; y (c) opcionalmente, al menos un modificador biológico unido químicamente al primer o segundo oligopéptido o fluoróforo.

En una realización, el agente de imaginología puede representarse por la Fórmula IV:



en la que,

ECO, independientemente, para cada aparición, es un oligopéptido escindible enzimáticamente;

G es L-F-L;

F, independientemente, para cada aparición, es un fluoróforo;

5 L, independientemente, para cada aparición, es un resto enlazador o un enlace;

M es un modificador biológico;

K es L-N;

N es un indicador no fluorescente;

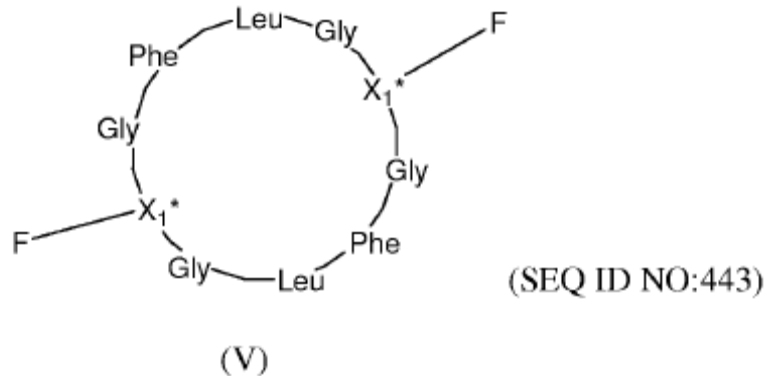
n es un número entero de 0 a 3; y

10 m es un número entero de 0 a 3.

En otro aspecto, la invención proporciona un agente de imagenología inactivado intramolecularmente que comprende (a) un oligopéptido escindible enzimáticamente que comprende de 2 a 14 residuos aminoacídicos; (b) al menos un modificador biológico con un peso molecular de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 35 kDa unido covalentemente al oligopéptido escindible enzimáticamente; y (c) dos fluoróforos, cada uno unido covalentemente, directamente o indirectamente, al oligopéptido en localizaciones de manera que los fluoróforos se inactivan entre sí, y en el que, después de la escisión enzimática del oligopéptido, al menos un fluoróforo se vuelve no inactivado y es capaz de emitir una señal fluorescente cuando se excita por radiación electromagnética.

15

En otro aspecto, la invención proporciona un agente de imagenología inactivado intramolecularmente representado por la Fórmula V:



20

en la que

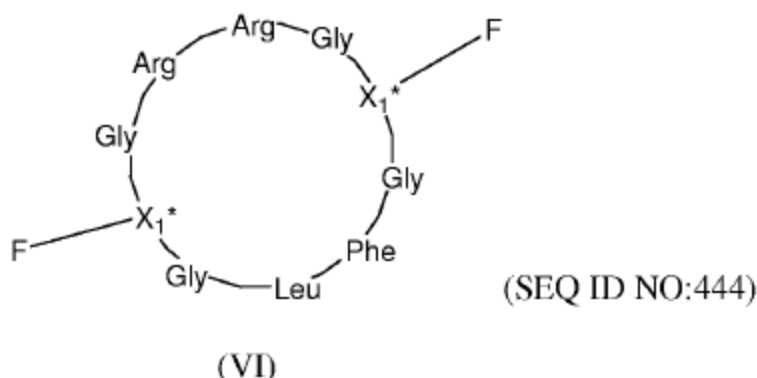
X<sub>1</sub>\* independientemente, para cada aparición, es X-L-;

X es un residuo aminoacídico;

L es un resto enlazador o un enlace; y

25 F, independientemente, para cada aparición, es un fluoróforo.

En otro aspecto, la invención proporciona un agente de imaginología inactivado intramolecularmente representado por la Fórmula VI:



en la que

5  $X_1^*$  independientemente, para cada aparición, es X-L-;

X es un residuo aminoacídico;

L es un resto enlazador o un enlace;

F, independientemente, para cada aparición, es un fluoróforo.

10 En cualquiera de los anteriores agentes de imaginología, el fluoróforo es preferiblemente un fluoróforo en el rojo lejano o en el infrarrojo cercano. Fluoróforos ejemplo incluyen fluoróforo de carbocianina y fluoróforo de indocianina. Se sobreentiende que cuando el agente comprende dos fluoróforos, estos pueden ser iguales o distintos. Otros fluoróforos e inactivadores útiles, así como enlazadores, modificadores biológicos e indicadores no fluorescentes útiles se describen con más detalle a continuación.

15 En determinadas realizaciones, el oligopéptido escindible enzimáticamente es escindible por al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en una catepsina, una metaloproteinasa de la matriz, una peptidasa, una carboxipeptidasa, una glicosidasa, una lipasa, una fosfolipasa, una fosfatasa, una fosfodiesterasa, una sulfatasa, una reductasa y una enzima bacteriana.

20 Además, la invención proporciona métodos de imaginología *in-vivo* o *in-vitro*. En un aspecto, la invención proporciona un método para realizar imaginología óptica *in vivo* en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un animal o un ser humano. El método comprende las etapas de (a) administrar a un sujeto uno o más de los agentes de imaginología anteriores, (b) permitir que el agente o agentes se distribuyan en el sujeto; (c) exponer al sujeto a luz de una longitud de onda absorbible por al menos un fluoróforo en el agente; y (d) detectar una señal emitida por el fluoróforo. La señal emitida puede usarse para construir una imagen, por ejemplo, una imagen tomográfica. Además, las etapas (c) - (d) pueden repetirse a intervalos predeterminados para permitir de esta manera la evaluación de las señales emitidas del agente en el sujeto con el tiempo. De forma similar, las etapas (a) - (d) pueden repetirse a intervalos de tiempo predeterminados para permitir de esta manera la evaluación de las señales emitidas del agente en el sujeto con el tiempo. La presencia, ausencia, o nivel de señal emitida puede ser indicativo de un estado de enfermedad y o puede usarse para detectar y/o monitorizar una enfermedad.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de imaginología *in vitro*. El procedimiento comprende (a) poner en contacto una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, con uno cualquiera o más de los anteriores agentes de imaginología, (b) dejar que el agente se una a, o se asocie con una diana biológica; opcionalmente, retirar los agentes no unidos; y (d) detectar una señal emitida desde el fluoróforo para determinar de este modo si el agente ha sido activado por, o se ha unido a la diana biológica.

35 Los agentes de imaginología también pueden incorporarse en un kit, por ejemplo, un kit con instrucciones opcionales para el uso de los agentes durante una imaginología *in vivo* o *in vitro*. El kit comprende opcionalmente componentes que ayudan al uso de los agentes de imaginología para los procedimientos descritos, tales como tampones, y otros agentes de formulación. De forma alternativa, el kit puede comprender dispositivos médicos que ayuden a la administración y/o detección de los agentes a sujetos.

40 Los agentes de imaginología y los procedimientos descritos en la presente memoria proporcionan diversas ventajas y tienen amplias aplicaciones tanto en los ámbitos de investigación como en clínicos. Por ejemplo, los agentes y los procedimientos de imaginología permiten la adquisición de imágenes moleculares y, opcionalmente imágenes anatómicas de alta resolución. Los agentes y procedimientos de imaginología pueden proporcionar perspectivas en

anomalías moleculares específicas que forman la base de muchas enfermedades, y pueden usarse para valorar la eficacia de terapias establecidas a nivel molecular. A su vez, es de esperar que esto tenga un impacto en el desarrollo de medicamentos, pruebas de medicamentos, diagnóstico de enfermedades y elección de terapias apropiadas y cambios en las terapias en un sujeto dado.

- 5 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de las siguientes figuras, descripción detallada y de las reivindicaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** representa una imagen plana de tumores bilaterales a las 6 horas después de la administración de un agente de imaginología ejemplo denominado Q65.

- 10 La **Figura 2** representa imágenes de tomografía de fluorescencia bilaterales de tumores a las 6 horas después de la administración del agente de imaginología ejemplo Q65.

La **Figura 3** representa imágenes de reflectancia de fluorescencia plana de tumores de xenoinjerto 4T1 usando un agente ejemplo denominado Q66.

- 15 La **Figura 4** representa una imagen plana de reflectancia de fluorescencia de tumores de xenoinjerto HT-29 usando un agente ejemplo denominado Q91.

La **Figura 5** representa un perfil de activación enzimática del agente de imaginología Q65.

La **Figura 6** representa los perfiles de activación enzimática de los agente de imaginología ejemplo, denominados Q92 (Figura 6A) y Q93 (Figura 6B).

- 20 La **Figura 7A** representa imágenes de fluorescencia de control (**Figuras 7A y 7C**) y osteoporosis inducida por ovariectomía (**Figuras 7B y 7D**) en ratones tomadas 4 horas (**Figuras 7A y 7B**) y 24 horas (**Figuras 7C y 7D**) después de administrar un agente de imaginología ejemplo denominado Q94. La **Figura 7E** es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de la fluorescencia tibial de osteoporosis inducida 4 horas y 24 horas después de la administración del agente de imaginología Q94.

- 25 La **Figura 8** representa una imagen producida por imaginología por reflectancia de fluorescencia de enfermedad cardiovascular usando el agente de imaginología ejemplo Q65.

La **Figura 9** representa una imagen de un ratón después de un edema de pata inducido por carragenano usando el agente de imaginología ejemplo Q91.

- 30 La **Figura 10** es una representación esquemática de un agente de imaginología (agente de imaginología) cíclico que comprende dos fluoróforos separados por dos péptidos. Cada péptido contiene un sitio de escisión proteolítico en el que, cuando está intacto, el agente de imaginología está inactivado y, cuando los péptidos son escindidos por exposición a una o más proteasas, al menos un fluoróforo ya no está inactivado por el otro.

La **Figura 11** es un gráfico de barras que muestra el perfil de activación enzimática para los agentes de imaginología denominados R20, R21, R23, R24, R26 y R27.

- 35 La **Figura 12** muestra imágenes de ratones en una dieta control o baja en sodio usando dos agentes de imaginología ejemplo, donde la **Figura 12A** representa un ratón en una dieta control que ha recibido el agente de imaginología R20, la **Figura 12B** representa un ratón en una dieta baja en sodio que ha recibido el agente de imaginología R20, la **Figura 12C** representa un ratón en una dieta control que ha recibido el agente de imaginología R21, y la **Figura 12D** representa un ratón en una dieta baja en sodio que ha recibido el agente de imaginología R21.

- 40 La **Figura 13** es un gráfico de barras que muestra un panel de activación enzimático para un agente de imaginología ejemplo denominado R22.

La **Figura 14** muestra imágenes creadas por imaginología por reflectancia de fluorescencia después de 6 horas (**Figura 14A**) y después de 24 horas (**Figura 14B**) y por imaginología tomográfica después de 6 horas (**Figura 14C**) y después de 24 horas (**Figura 14D**) usando el agente de imaginología ejemplo R22.

- 45 La **Figura 15** es un gráfico de barras que muestra perfiles de activación enzimática de agentes de imaginología ejemplo denominados R51, R52, R53, R55, R56, R57, R58 y R59.

- 50 La **Figura 16** representa imágenes y cuantificación de las imágenes en ratones ApoE <sup>-/-</sup> y control usando el agente de imaginología ejemplo R51. La **Figura 16A** muestra imágenes tomadas por tomografía de fluorescencia, y la **Figura 16B** es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de las imágenes resultantes. La **Figura 16C** es una imagen de reflectancia, y la **Figura 16D** es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de las imágenes resultantes.

La **Figura 17** representa imágenes y cuantificación de las imágenes en ratones ApoE  $-/-$  y control usando el agente de imaginología ejemplo R55. La **Figura 17A** muestra imágenes tomadas por tomografía de fluorescencia, y la **Figura 17B** es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de las imágenes resultantes.

#### Descripción detallada

5 Esta invención proporciona agentes de imaginología que incluyen uno o más péptidos marcados por fluorescencia. La fluorescencia de los agentes de imaginología se potencia tras la activación, por ejemplo, se produce un aumento de la fluorescencia, debido a una escisión de una secuencia de péptidos por una proteasa después, antes o durante la unión del agente o después de la internalización del agente de imaginología.

10 Por ejemplo, los agentes de imaginología de la presente invención incluyen al menos un oligopéptido que comprende un sitio de escisión proteolítica, y dos fluoróforos o un único fluoróforo y un inactivador) unidos de forma covalente (directa o indirectamente) al oligopéptido o un modificador biológico opcional tal que la fluorescencia de al menos un fluoróforo está inactivada de forma significativa. Tras la escisión del péptido, por ejemplo, por escisión enzimática, el agente emite una señal de fluorescencia cuando es excitado por radiación electromagnética de longitud de onda y frecuencia apropiadas. En determinadas realizaciones, los agentes de imaginología contienen no más de dos fluoróforos. Por ejemplo, los agentes de imaginología pueden contener un sistema indicador fluorescente que consiste en, o consiste esencialmente en, (i) dos fluoróforos, (ii) dos fluoróforos y dos inactivadores, (iii) dos fluoróforos y un inactivador, o (iv) un fluoróforo y un inactivador.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "inactivar" se sobreentiende que se refiere al proceso de reducción parcial o total de la señal de fluorescencia de un fluoróforo. Por ejemplo, una señal de fluorescencia puede reducirse inter- o intramolecularmente por la colocación de otro fluoróforo (bien sea el mismo o un fluoróforo diferente) en proximidad de inactivación de la fluorescencia del primer fluoróforo o la colocación de una molécula cromófora de inactivación no fluorogénica (inactivador) en proximidad de inactivación de la fluorescencia del primer fluoróforo. El agente es des-inactivado (o activado), por ejemplo, por escisión enzimática de una secuencia de péptidos.

25 El péptido de los agentes de imaginología puede opcionalmente estar unido químicamente a un modificador biológico. Además, los agentes de imaginología opcionalmente pueden estar unidos a otro indicador no fluorescente. Tal como se usa en la presente memoria, el término "unido químicamente" se sobreentiende que significa conectado por una fuerza atractiva entre átomos suficientemente fuerte para permitir que el agregado combinado funcione como una unidad. Esto incluye, aunque sin quedar limitado a, enlaces químicos tales como enlaces covalentes, enlaces no covalentes tales como enlaces iónicos, enlaces metálicos y enlaces de puente, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals.

30 En un aspecto de la invención, los agentes de la presente invención son agentes inactivados intramolecularmente que incluyen (a) un oligopéptido escindible enzimáticamente que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 restos aminoácido; (b) un modificador biológico opcional unido químicamente al oligopéptido escindible enzimáticamente; y (c) bien dos fluoróforos o un fluoróforo y un inactivador, cada uno unido covalentemente, de forma directa o indirecta, al oligopéptido o al modificador biológico, donde un fluoróforo inactiva al otro fluoróforo o el inactivador inactiva el fluoróforo y, tras la escisión enzimática del oligopéptido, al menos un fluoróforo queda inactivado y es capaz de producir una mayor señal de fluorescencia cuando es excitado por radiación electromagnética que antes de la escisión enzimática del oligopéptido.

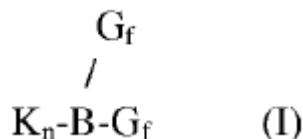
40 Por ejemplo, el agente de imaginología puede comprender uno o más oligopéptidos de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 residuos aminoácidos de longitud, de aproximadamente 2 a aproximadamente 14 residuos aminoácidos de longitud, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 residuos aminoácidos de longitud, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 residuos aminoácidos de longitud. En determinadas realizaciones, el oligopéptido comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos.

45 El modificador biológico, antes de estar químicamente unido al oligopéptido escindible enzimáticamente, puede tener un peso molecular menor de aproximadamente 35 kDa, por ejemplo, de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 35 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 30 kDa, o de aproximadamente 15 kDa a aproximadamente 25 kDa. El modificador biológico está unido preferiblemente al oligopéptido en una posición que no interfiera con la inactivación fluorescente. Por ejemplo, el modificador biológico puede estar químicamente unido a un resto del oligopéptido que no esté situado entre dos fluoróforos que se inactiven mutuamente o entre un fluoróforo y un inactivador.

50 En algunas realizaciones, los agentes de imaginología descritos en la presente memoria comprenden dos fluoróforos, que pueden ser iguales o distintos. Los agentes de imaginología de la invención pueden comprender adicionalmente un indicador no fluorescente químicamente unido al oligopéptido escindible enzimáticamente o al modificador biológico.



En una realización, el agente de imaginología está representado por la Fórmula I:



en la que:

B es [M<sub>m</sub>-ECO-M<sub>m</sub>];

5 ECO es el oligopéptido escindible enzimáticamente;

G es L-F;

F es un fluoróforo o inactivador;

M es un modificador biológico;

K es N-L;

10 N es un indicador no fluorescente;

L, independientemente, para cada aparición, es un resto enlazador o un enlace;

n es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2, ó 3);

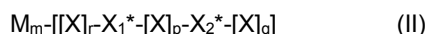
m, independientemente, para cada aparición, es 0 ó 1, y opcionalmente al menos un m es 1; y

15 f, independientemente, para cada aparición, es un número entero de 0 a 2, en el que el número total de fluoróforos F en el agente no es mayor de 2.

En una realización, f es 2 y al menos un F es un fluoróforo.

20 Cada F puede estar unido covalentemente, directamente, o indirectamente (por ejemplo, a través de un resto enlazador L), a un residuo aminoacídico diferente (por ejemplo, una lisina) del oligopéptido. En otra realización, al menos un F está unido covalentemente, directamente, o indirectamente (por ejemplo, a través de un resto enlazador L), al modificador biológico M. Se entiende que ECO puede ser un oligopéptido lineal, o puede ser un oligopéptido cíclico.

En otro aspecto, el agente de imaginología está representado por la fórmula II:



en la que:

25 X, independientemente, para cada aparición, es un residuo aminoacídico;

X<sub>1</sub>\* y X<sub>2</sub>\* son cada uno independientemente X-L-F;

L, independientemente, para cada aparición, es un resto enlazador o un enlace;

F es un fluoróforo;

M es un modificador biológico;

30 m es 0, 1 o 2;

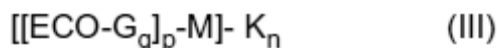
r es un número entero de 0 a 28;

p es un número entero de 1 a 28;

q es un número entero de 0 a 28; donde la suma de r, p y q no es mayor de 28.

35 En determinadas realizaciones, la suma de r, p y q es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. El residuo aminoacídico X<sub>2</sub>\* y/o X<sub>1</sub>\* puede ser, por ejemplo, una lisina.

En otro aspecto, el agente de imaginología está representado por la Fórmula III:



en la que:

ECO es un oligopéptido escindible enzimáticamente;

5 G es L-F;

F, independientemente, está seleccionado de un fluoróforo o inactivador, en el que al menos un F es un fluoróforo;

L, independientemente, para cada aparición, está seleccionado de un resto enlazador o un enlace;

M es un modificador biológico;

K es L-N;

10 N es un indicador no fluorescente;

p es un número entero de 1 a 4;

n es un número entero de 0 a 3; y

g, independientemente, para cada aparición, es un número entero de 1 a 2, en el que la suma de cada aparición de g no es mayor de 2.

15 Por ejemplo, ECO puede tener una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 residuos aminoacídicos. El número entero n puede ser 0, 1, 2 ó 3; g de fórmula III puede ser, independientemente para cada aparición, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En determinadas realizaciones, al menos un F está unido químicamente, directamente o indirectamente, a un residuo de lisina del oligopéptido ECO. Por ejemplo, F, para cada aparición, está unido covalentemente al oligopéptido ECO.

20 En otro aspecto, el agente de imaginología es un agente de imaginología inactivado intramolecularmente cíclico que comprende: a) un primer fluoróforo químicamente unido, directa o indirectamente, al extremo C terminal de un primer oligopéptido escindible y unido químicamente, directa o indirectamente, al extremo N terminal de un segundo oligopéptido opcionalmente escindible; b) un segundo fluoróforo químicamente unido, directa o indirectamente, al extremo N terminal del primer oligopéptido escindible y unido químicamente, directa o indirectamente, al extremo C terminal del segundo oligopéptido opcionalmente escindible; y c) opcionalmente, al menos un modificador biológico químicamente unido al primer o segundo oligopéptido o fluoróforo.

25

En una realización, los agentes cíclicos pueden estar representados por la Fórmula IV:



en la que

30 ECO, independientemente para cada aparición, es un oligopéptido escindible enzimáticamente;

G es L-F-L;

F, independientemente, para cada aparición, es un fluoróforo;

L, independientemente, para cada aparición, es un resto enlazador o un enlace;

M es un modificador biológico;

35 K es L-N;

N es un indicador no fluorescente;

n es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo 0, 1, 2 o 3); y

m es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo 0, 1, 2 o 3);

También se contemplan en la presente memoria formas estereoisoméricas, mezclas de formas estereoisoméricas y sales farmacéuticamente aceptables de los agentes de imaginología descritos.

### I. Fluoróforos

5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "fluoróforo" se sobreentiende que significa un fluorocromo, una molécula de colorante, un fluoróforo orgánico o inorgánico, o quelato metálico. Un fluoróforo puede incluir un fluoróforo en el rojo lejano o en el infrarrojo cercano. En determinadas realizaciones, los agentes de imaginología descritos en la presente memoria incluyen un fluoróforo seleccionado del grupo que consiste en un fluoróforo de carbocianina o un fluoróforo de indocianina. Fluoróforos ejemplo incluyen fluoróforos sulfonados. Se sobreentiende que los fluoróforos también pueden ser nanopartículas que tengan propiedades fluorescentes o luminiscentes.

10 En determinadas realizaciones, los fluoróforos son fluoróforos en el infrarrojo cercano (NIRF) con absorción y emisión máxima entre aproximadamente 600 nm y aproximadamente 900 nm. Se aprecia que el uso de fluoróforos con longitudes de onda de excitación y emisión en otros espectros también puede emplearse en las composiciones y procedimientos de la presente invención.

15 Por ejemplo, determinados NIRF ejemplo tienen un coeficiente de extinción de al menos 30.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> por molécula de fluoróforo en medio acuoso, o al menos 50.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> por molécula de fluoróforo en medio acuoso. Los NIRF tienen preferiblemente también (1) alto rendimiento cuántico (es decir, rendimiento cuántico mayor de 5% en medio acuoso), (2) estrecho espectro de excitación/emisión, espectros de absorción y excitación separados espectralmente (es decir, máximos de excitación y de emisión separados por al menos 15 nm), (3) elevada estabilidad química y lumínica, (4) poca o nula toxicidad, (5) buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y excretabilidad, y (6) viabilidad comercial y producción escalable para grandes cantidades (es decir, cantidades de gramo y de kilogramo) requeridas para el uso *in vivo* y humano.

20 Un coeficiente de extinción de los agentes que incluye un fluoróforo puede calcularse como la proporción entre la absorbancia del fluoróforo en su máximo de absorción (por ejemplo a -750 nm para VivoTag-S-750, VisEn Medical) en una celda de longitud de recorrido de 1 cm y la concentración de partículas, ( $\epsilon = A/cl$ , donde A es absorbancia, c es concentración molar y l es la longitud de recorrido, en cm).

25 En particular, determinados fluoróforos fluorescentes de carbocianina o polimetina pueden usarse para producir los agentes de imaginología de la invención, por ejemplo, los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 6,747,159; patente de Estados Unidos n.º 6,448,008; patente de Estados Unidos n.º 6,136,612; patentes de Estados Unidos n.º 4,981,977; 5,268,486; patente de Estados Unidos n.º 5,569,587; patente de Estados Unidos n.º 5,569,766; patente de Estados Unidos n.º 5,486,616; patente de Estados Unidos n.º 5,627,027; patente de Estados Unidos n.º 5,808,044; patente de Estados Unidos n.º 5,877,310; patente de Estados Unidos n.º 6,002,003; patente de Estados Unidos n.º 6,004,536; patente de Estados Unidos n.º 6,008,373; patente de Estados Unidos n.º 6,043,025; patente de Estados Unidos n.º 6,127,134; patente de Estados Unidos n.º 6,130,094; patente de Estados Unidos n.º 6,133,445; también los documentos WO 97/40104, WO 99/51702, WO 01/21624 y EP 1 065 250 A1; y Tetrahedron Letters 41, 9185-88 (2000).

35 Diversos fluoróforos ejemplo útiles están disponibles de forma comercial e incluyen, por ejemplo: Cy5.5, Cy5 y Cy7 (GE Healthcare); AlexaFlour660, AlexaFlour680, AlexaFlour750 y AlexaFlour790 (Invitrogen); VivoTag680, VivoTag-S680 y VivoTag-S750 (VisEn Medical); Dy677, Dy682, Dy752 y Dy780 (Dyomics); DyLight547, DyLight647 (Pierce); HiLyte Fluor 647, HiLyte Fluor 680 y HiLyte Fluor 750 (AnaSpec); IRDye800CW, IRDye 800RS y IRDye 700DX (Li-Cor); y ADS780WS, ADS830WS y ADS832WS (American Dye Source).

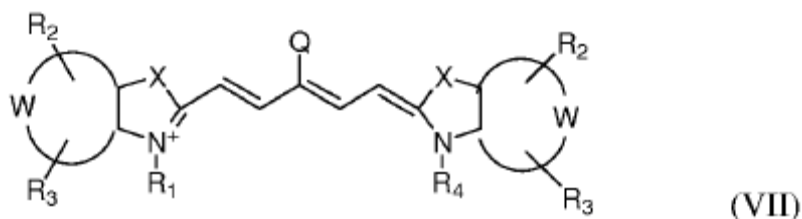
40 La Tabla 1 lista una serie de fluoróforos ejemplo útiles en la práctica de la invención junto con sus propiedades espectrales.

**Tabla 1**

Fluoróforo	$\epsilon_{\max}$ M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Absorbancia máx (nm)
Cy5	250.000	649
Cy5.5	250.000	675
Cy7	250.000	743
AlexaFlour660	132.000	663
AlexaFlour680	184.000	679

Fluoróforo	$\epsilon_{\max}$ M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Absorbancia máx (nm)
AlexaFlour750	280.000	749
VivoTag-S680	220.000	674
VivoTag-S750	100.000	750
Dy677	180.000	673
Dy682	140.000	690
Dy752	270.000	748
Dy780	170.000	782
DyLight547	150.000	557
DyLight647	250.000	653

Por ejemplo, determinados fluoróforos útiles están representados por la Fórmula general VII:



o una sal del mismo, en la que:

5 X está seleccionado independientemente del grupo que consiste en C(CH<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>)(CH<sub>2</sub>Y<sub>2</sub>), O, S, y Se;

Y<sub>1</sub> y Y<sub>2</sub> están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, grupo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> y un grupo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido con -OR\*, N(R\*)<sub>2</sub> o -SR\*;

W representa un anillo benzo-condensado, nafto-condensado o pirido-condensado;

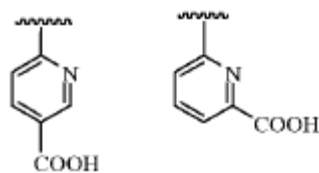
10 R<sub>1</sub> está seleccionado del grupo que consiste en (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>H, donde x es un número entero seleccionado de 0 a 6 y n es un número entero seleccionado de 2 a 6;

R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> están seleccionados, independientemente, para cada aparición, del grupo que consiste en H, carboxilato, ácido carboxílico, éster carboxílico, amina, amida, sulfonamida, hidroxilo, alcoxilo, un resto ácido sulfónico y un resto sulfonato;

15 R<sub>4</sub> está seleccionado del grupo que consiste en (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>H, donde x es un número entero seleccionado de 0 a 6 y n es un número entero seleccionado de 2 a 6; y

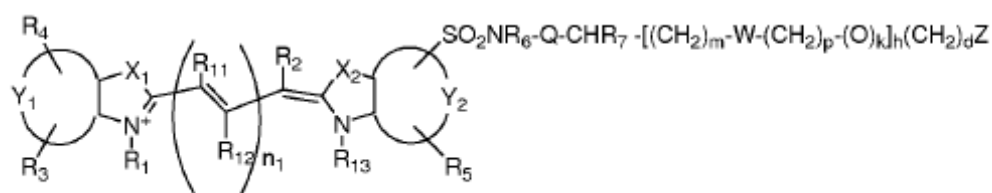
Q está seleccionado de un grupo que consiste en un anillo heteroarilo sustituido con un grupo carboxilo o un anillo heteroarilo de 6 miembros sustituido con un grupo carbonilo.

20 En determinadas realizaciones, Q puede estar seleccionado del grupo que consiste en (i) un anillo heterocíclico funcionalizado con carboxilo, (ii) un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno funcionalizado con carboxilo, (iii) un anillo heterocíclico de 6 miembros que contiene nitrógeno funcionalizado con carboxilo, tal como piridina, pirimidona, pirazina y piridazina, (iv) un anillo heterocíclico de 6 miembros que contiene nitrógeno funcionalizado con carboxilo, tal como piridina, (v) un anillo heterocíclico de 6 miembros que contiene nitrógeno funcionalizado con carboxilo, tal como piridina, (vi) un ácido isoitacónico, ácido nicotínico, y un grupo seleccionado de:



en los que el grupo carboxilo puede también estar en la forma de un éster, un éster activado o haluro de carbonilo que puede reaccionar con nucleófilos, y puede ser, por ejemplo, un CO-O-benzotriazolilo, CO-ON-hidroxisuccinimidilo, CO-O-tetrafluorofenilo, CO-O-pentafluorofenilo, CO-O-imidazol y CO-O-p-nitrofenilo.

- 5 Otros fluoróforos útiles están representados por la Fórmula general VII:



(VIII)

o una sal del mismo, en la que:

X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> están seleccionados independientemente del grupo que consiste en C(CH<sub>2</sub>K<sub>1</sub>)(CH<sub>2</sub>K<sub>2</sub>), O, S y Se;

- 10 K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub> están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, un grupo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> y un grupo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido con -OR\*, N(R\*)<sub>2</sub> o -SR\*; o K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub> juntos son parte de un anillo carbocíclico o heterocíclico sustituido o no sustituido;

Y<sub>1</sub> y Y<sub>2</sub> son cada uno independientemente un anillo benzo-condensado, un anillo nafto-condensado o un anillo pirido-condensado;

n<sub>1</sub> es 1, 2, o 3;

- 15 R<sub>2</sub>, R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> son independientemente H, F, Br, Cl, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ariloxi, un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno, un anillo heteroaromático que contiene nitrógeno, un sulfonato, un ion iminio, o dos sustituyentes R<sub>12</sub> y R<sub>11</sub> o sustituyentes R<sub>2</sub> y R<sub>11</sub> adyacentes cualesquiera, cuando se toman combinados, forman un anillo carbocíclico de 4, 5 o 6 miembros sustituido o no sustituido, un anillo carbocíclico no aromático sustituido o no sustituido o un anillo arilo carbocíclico sustituido o no sustituido, donde los anillos carbocíclicos están cada uno, independientemente, sustituidos una o más veces con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, o OR\* o SR\*;

R<sub>1</sub> y R<sub>13</sub> son (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>, cuando x es un número entero seleccionado de 0 a 6; o R<sub>1</sub> y R<sub>13</sub> son independientemente (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> o (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>H cuando n es un número entero seleccionado de 2 a 6;

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, carboxilato, ácido carboxílico, éster carboxílico, amina, amida, sulfonamida, hidroxilo, alcoxilo, un resto ácido sulfónico y un resto sulfonato;

- 25 Q está ausente, o está seleccionado de un resto carbonilo o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, donde 0-2 de los grupos metileno del grupo alquilo pueden estar opcionalmente reemplazados por NH, O o S, o un anillo carbocíclico C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carbocíclico no aromático, heterocíclico o heterocíclico no aromático sustituido o no sustituido en el que los anillos heterocíclicos contienen 1-2 heteroátomos;

- 30 R<sub>6</sub> está seleccionado del grupo que consiste en H, un grupo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido, donde R<sub>6</sub> está opcionalmente sustituido con halógeno, OR\*, N(R\*)<sub>2</sub> o SR\*, cuando Q está ausente, un grupo carbonilo, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, donde 0-2 de los grupos metileno del grupo alquilo están reemplazados por NH, O o S, o un anillo carbocíclico C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carbocíclico no aromático, heterocíclico o heterocíclico no aromático sustituido o no sustituido en el que los anillos heterocíclicos contienen 1-2 heteroátomos; o

- 35 R<sub>6</sub> es H, cuando Q es un carbonilo; y

R<sub>7</sub> está seleccionado del grupo que consiste en H, un grupo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido, donde R<sub>7</sub> está opcionalmente sustituido con halógeno, OR\*, N(R\*)<sub>2</sub> o SR\*; o

R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, tomados juntos forman un anillo heterocíclico o heterocíclico no aromático de 4, 5, 6 o 7 miembros opcionalmente sustituido con halógeno, OR\*, N(R\*)<sub>2</sub> o SR\*; o

5 NR<sub>6</sub>, Q y CHR<sub>7</sub> forman juntos un sistema de anillo heterocíclico o heterocíclico no aromático sustituido o no sustituido en el que los anillos contienen 1 o 2 heteroátomos, donde los anillos están opcionalmente sustituidos con -OR\*, N(R\*)<sub>2</sub> o -SR\*; y

W está ausente o es un grupo seleccionado del grupo que consiste en -SO<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>-Q-CHR<sub>7</sub>-, -O-, -COO-, y -CONH-;

h = 0-70; k = 0 o 1; d = 0-12; m = 0-12; p = 0-12; y

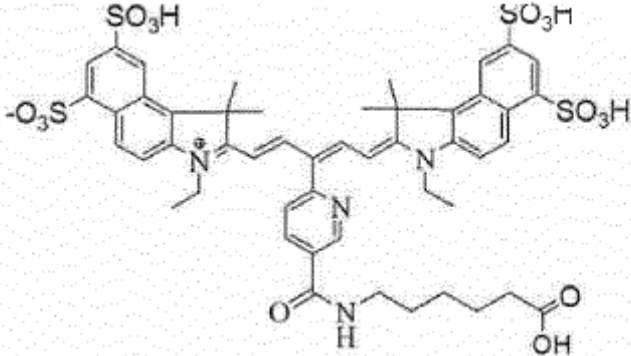
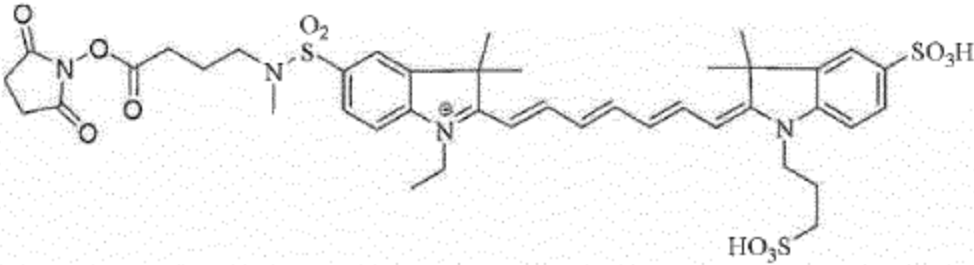
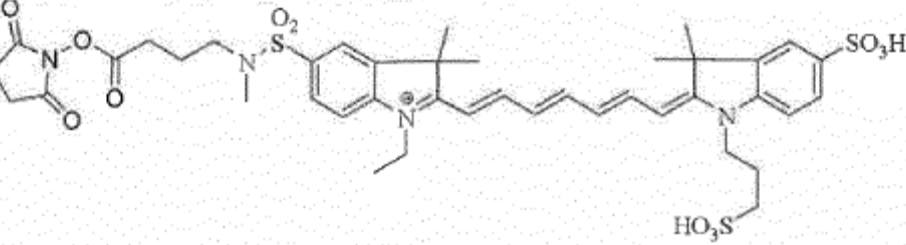
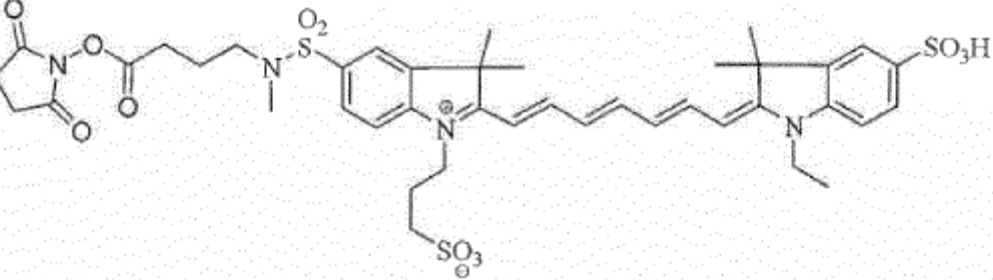
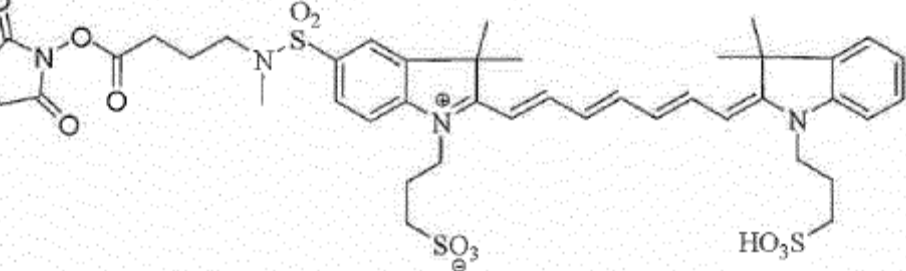
Z es, o contiene una funcionalidad nucleófila N, O o S o es, o contiene una funcionalidad capaz de reaccionar con nucleófilos N, O o S; y cada R\* es independientemente H o alquilo C<sub>1-20</sub>.

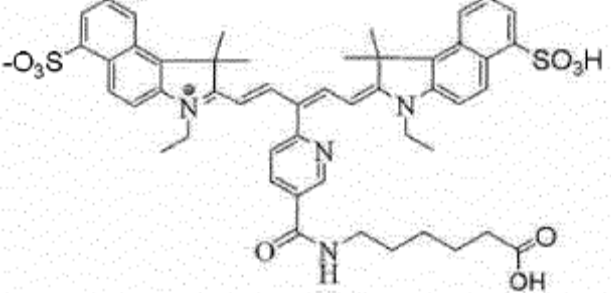
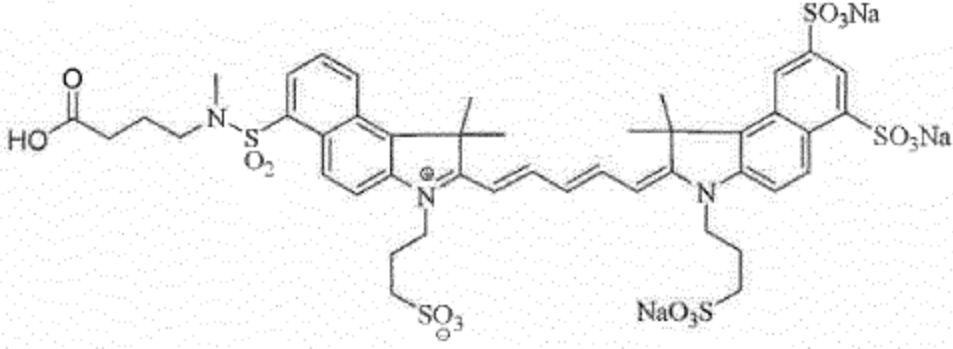
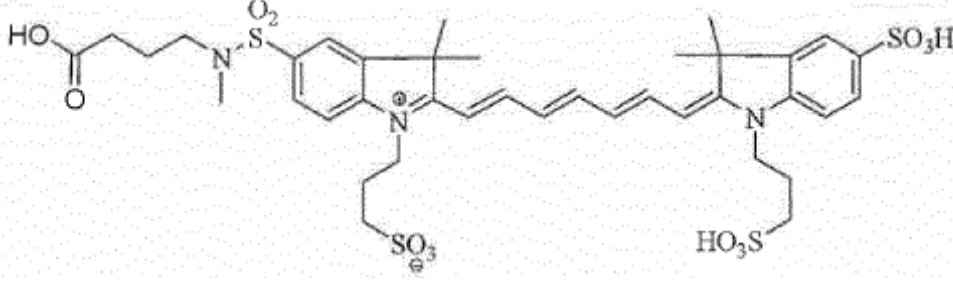
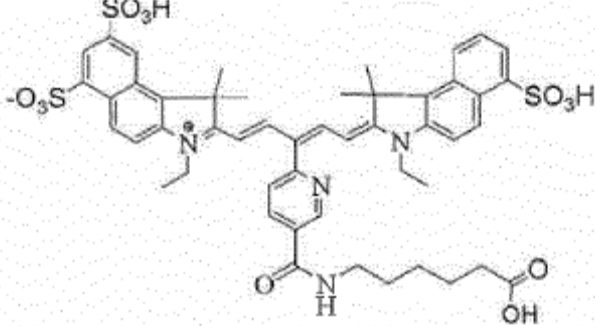
10 Los agentes de imaginología descritos en la presente memoria pueden incluir diversos derivados de fluoróforos y otras formas de fluoróforos, tales como formas N-hidroxisuccinimida de fluoróforos. Los fluoróforos pueden estar químicamente unidos a oligopéptidos escindibles enzimáticamente usando químicas bien conocidas en la técnica.

Fluoróforos ejemplo que pueden usarse en la síntesis de los agentes de imaginología de la invención incluyen, por ejemplo, los listados en la Tabla 2.

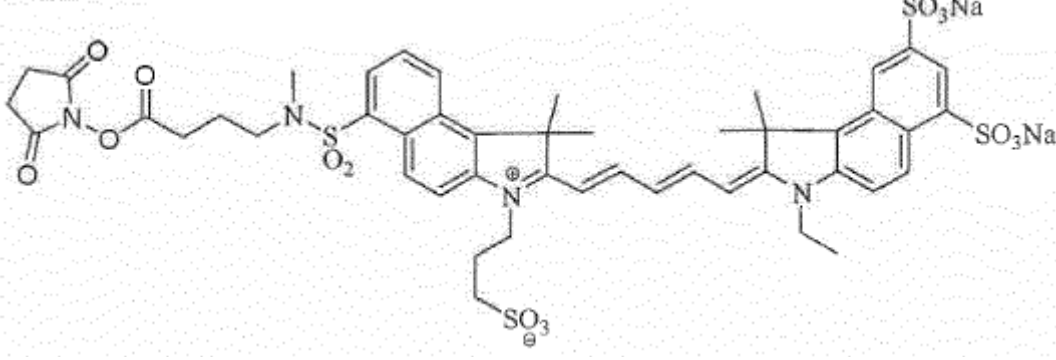
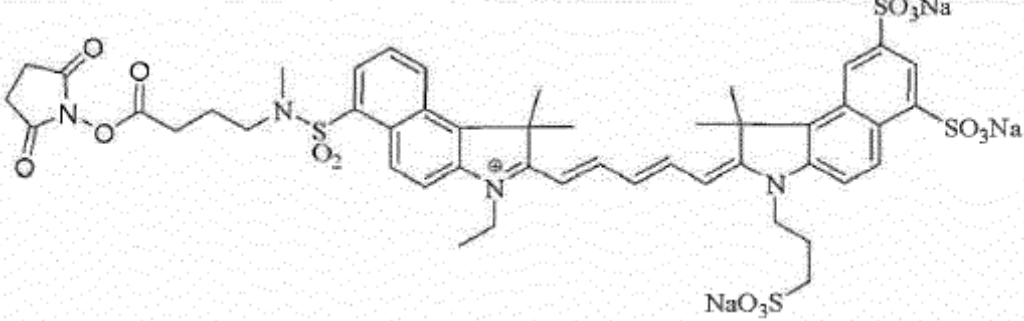
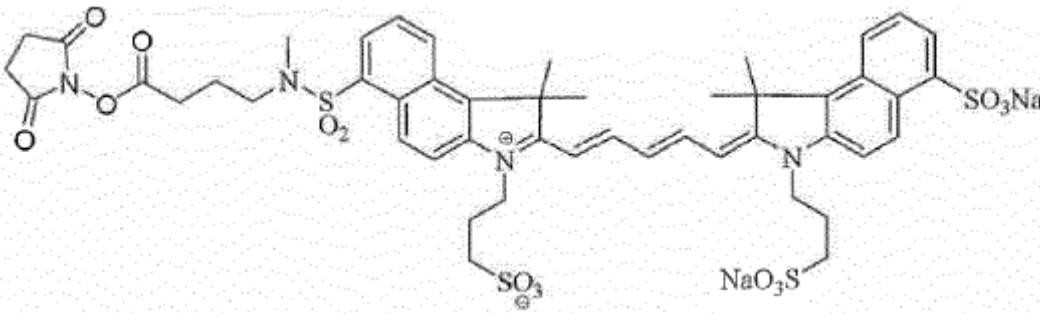
15 Tabla 2

N.º	Fluoróforo
1	
2	
3	

N.º	Fluoróforo
4	
5	
6	
7	
8	

N.º	Fluoróforo
9	
10	
11	
12	



N.º	Fluoróforo
13	
14	
15	

- En otra realización, el fluoróforo es una nanopartícula que tiene propiedades fluorescentes o luminiscentes. Por ejemplo, un oligopéptido escindible enzimáticamente puede injertarse sobre nanopartículas que comprenden silicio en una forma que tiene propiedades fluorescentes o luminiscentes o nanopartículas fluorescentes. Agregados de silicio cristalino (como cristales de silicio múltiples o aislados), silicio poroso o silicio amorfo, o una combinación de estas formas, pueden formar la nanopartícula. Nanopartículas de silicio fluorescentes preferidas tienen un diámetro de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 25 nm, más preferiblemente de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 10 nm. El tamaño de las nanopartículas puede determinarse por dispersión de luz láser o por microscopía de fuerzas atómicas u otras técnicas adecuadas.
- 5 Las nanopartículas de silicio fluorescentes tienen espectros de excitación y de emisión de 200 nm a 2000 nm, sin embargo, las nanopartículas de silicio fluorescentes preferidas tienen máximos de excitación y de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 1200 nm (y preferiblemente 500 nm - 900 nm, por ejemplo, 500 nm - 600 nm, 600 nm - 700 nm, 700 nm - 800 nm o 800 nm - 900 nm). Las nanopartículas de silicio fluorescentes preferidas tienen también coeficientes de extinción de al menos  $50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  en medio acuoso. Aunque se prefieren las nanopartículas de silicio fluorescentes con máximos de excitación y emisión entre 400 nm y 1200 nm, se apreciará que el uso de nanopartículas de silicio fluorescentes con longitudes de onda de excitación y emisión en otros espectros también pueden emplearse en las composiciones y procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las partículas tienen una excitación aproximadamente de alrededor de 300-350 nm, y una emisión aproximadamente de alrededor de 400-450 nm.
- 10 Las nanopartículas de silicio fluorescentes también tienen las siguientes propiedades: (1) elevado rendimiento
- 15
- 20

cuántico (es decir, rendimiento cuántico mayor de 5% en medio acuoso), (2) estrecho espectro de emisión (es decir, menor de 75 nm; más preferiblemente menor de 50 nm), (3) espectros de absorción y de emisión espectralmente separados (es decir, separados por más de 20 nm; más preferiblemente por más de 50 nm), (3) tienen estabilidad química y fotoestabilidad (es decir, mantienen las propiedades luminiscentes después de la exposición a la luz), (4) son biocompatibles (como se describe más adelante) o pueden hacerse más biocompatibles; (5) son no tóxicos o mínimamente tóxicos para las células o sujetos en dosis usadas para los protocolos de imaginología (como se mide, por ejemplo, por la DL<sub>50</sub> o estudios de irritación, u otros métodos similares conocidos en la técnica) y/o (6) tienen viabilidad comercial y producción escalable a mayores cantidades (es decir, cantidades de gramos y de kilogramos) requeridos para su uso *in vivo*, por ejemplo uso en seres humanos.

También se contemplan puntos cuánticos fluorescentes, por ejemplo, el oligopéptido escindible enzimáticamente puede injertarse en un punto cuántico fluorescente tal como amina T2 MP EviTags (Evident Technologies) o Nanocristales Qdot (Invitrogen). En general, los puntos cuánticos fluorescentes son nanocristales que contienen varios átomos de un material semiconductor (incluyendo, pero sin quedar limitados a los que contienen cadmio y selenio, sulfuro o telurio; sulfuro de cinc, indio-antimonio, selenuro de plomo, arseniuro de galio y sílice u ormosil), que han sido revestidos con sulfuro de cinc para mejorar las propiedades de estos agentes fluorescentes.

Los fluoróforos pueden incluir nanopartículas de óxido metálico que son fluorescentes y pueden usarse en una diversidad de aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. En una realización, un oligopéptido escindible enzimáticamente se conjuga con al menos una nanopartícula de óxido metálico fluorescente con una o más de las siguientes características: (1) un revestimiento de polímero adecuado para unir una pluralidad de fluoróforos consiguiendo de este modo grandes coeficientes de extinción (superiores a  $1.000.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), (2) un revestimiento de polímero no reticulado adecuado para unir de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 fluoróforos por partícula, (3) un revestimiento de polímero adecuado para unir una pluralidad de fluoróforos de una forma que no compromete de forma significativa el rendimiento cuántico de los fluoróforos (por ejemplo, las nanopartículas mantienen al menos un 50% de la señal fluorescente que se crea por sustancialmente el mismo número de fluoróforos libres cuando se prueba en las mismas condiciones), y (4) un revestimiento de polímero que es adecuado para unión química eficiente de biomoléculas con retención de sus propiedades biológicas para proporcionar agentes de imaginología moleculares. Las nanopartículas de óxido de metal fluorescentes pueden ser agentes de imaginología muy estables *in vitro*, tanto antes como después de la unión química de los fluoróforos y los agentes, pero todavía lábiles y/o degradables *in vivo*.

En determinadas realizaciones, pueden unirse de forma covalente una o más moléculas de fluoróforo diferentes con el oligopéptido o, de forma alternativa, pueden unirse de forma covalente con el oligopéptido dos fluoróforos sustancialmente similares, en localizaciones que permitan la inactivación de la fluorescencia para producir agentes de imaginología de la presente invención.

En determinadas realizaciones, se usa un inactivador para inactivar la señal fluorescente del fluoróforo unido covalentemente al oligopéptido. Por ejemplo, puede diseñarse un agente tal que el inactivador inactive la fluorescencia del fluoróforo del agente de imaginología cuando el agente esté en un estado inactivado, de modo que el agente de imaginología presente poca o nula señal hasta que sea activado. Se sobreentiende que el inactivador puede ser un agente no fluorescente, que cuando está adecuadamente situado respecto a un fluoróforo (es decir, en una localización que permite inactivación de la fluorescencia) es capaz de inactivar la señal de emisión del fluoróforo. Como se ha descrito antes, se sobreentiende que algunos de los fluoróforos anteriores pueden actuar para inactivar la señal fluorescente de otro fluoróforo separado, cuando los dos fluoróforos están situados en localizaciones que permiten una interacción con inactivación de la fluorescencia.

Están disponibles una serie de inactivadores y son conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, aunque sin quedar limitados a los mismos ácido 4-[[4-(dimetilamino)-fenil]-azo]-benzoico (DABCYL), QSY<sup>®</sup>-7 (cloruro de 9-[2-[[4-carboxi-1-piperidinil]sulfonil]fenil]-3,6-bis(metilfenilamino)-xantilio) (Molecular Probes, Inc., OR), QSY<sup>®</sup>-33 (Molecular Probes, Inc., OR), ATTO6120, ATTO580Q (ATTO-TEC, Alemania); Black Hole Quenchers<sup>®</sup> (Bioresearch Technologies, Novato, CA), QXL<sup>™</sup> 680 Acid (AnaSpec, San Jose CA), y fluoróforos fluorescentes tales como Cy5 y Cy5.5 (por ejemplo, 2-[5-[3-[6-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-6-oxohexil]-1,3-dihidro-1,1-dimetil-6,8-disulfo-2H-benz[e]indol-2-iliden]-1,3-pentadienil]-3-etil-1,1-dimetil-6,8-disulfo-1H-benc[e]indolio, sal interna) (Schobel, Bioconjugate 10:1107, 1999). Pueden usarse otras estrategias de inactivación, por ejemplo, usando diversos disolventes para inactivar la fluorescencia de los agentes.

Fluoróforos ejemplo que pueden inactivar la emisión de otros fluoróforos se representan en la Tabla 3.

Tabla 3

N.º	Inactivador
1	
2	

5 Como con los agentes de imaginología descritos en la presente memoria, los dos fluoróforos o el fluoróforo y el inactivador están situados en el agente de imaginología intacto en posiciones que permiten interacción con inactivación de la fluorescencia. En otras palabras, un primer fluoróforo está situado suficientemente cerca en el agente de imaginología a un segundo fluoróforo (o inactivador) para permitirlos interaccionar de forma fotoquímica entre sí de modo que el segundo fluoróforo (o inactivador) inactive la señal del primer fluoróforo. En el caso de agentes de imaginología con dos fluoróforos, un fluoróforo preferiblemente inactiva al otro fluoróforo. Para los principios de inactivación, véase la patente de Estados Unidos n.º 6,592,847.

## 10 II. Indicadores no fluorescentes

15 El término "indicador no fluorescente" tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un resto químico que no es fluorescente pero que puede usarse para proporcionar un contraste o señal en imaginología y puede detectarse por una técnica de imaginología no fluorescente. En determinadas realizaciones, pueden unirse químicamente otros indicadores no fluorescentes con los agentes de imaginología, o pueden administrarse a un sujeto de forma simultánea o secuencial con los agentes de imaginología de la invención. Tales indicadores pueden incluir nanopartículas fotoluminiscentes, radioisótopos, agentes superparamagnéticos, agentes de contraste para rayos X y agentes para ultrasonidos. Un indicador puede comprender también indicadores terapéuticos tales como porfirinas, Photofrin®, Lutrin®, Antrin®, ácido aminolevulínico, hipericina, derivados de benzoporfirina usados en terapia fotodinámica y radionúclidos usados para radioterapia.

## 20 (A) Indicadores radiactivos

Los agentes de imaginología pueden incluir uno o más marcadores radiactivos. Las formas radioisotópicas de metales tales como cobre, galio, indio, tecnecio, itrio y lutecio pueden unirse químicamente a los agentes de imaginología metálicos y pueden usarse para imaginología nuclear o aplicaciones terapéuticas. Marcadores radiactivos ejemplo incluyen, sin limitación,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  y  $^{67}\text{Cu}$ .

25 Otros marcadores ejemplo incluyen, por ejemplo,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  y  $^{18}\text{F}$ . Otros marcadores ejemplo pueden ser radiofármacos terapéuticos que incluyen, por ejemplo,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{111}\text{Ag}$  y  $^{192}\text{Ir}$ .

También se contemplan quelantes o restos de unión para radiofármacos para diagnóstico y terapéuticos y pueden

5 estar químicamente asociados con los agentes de imaginología. Quelantes ejemplo pueden seleccionarse de complejos estables con radioisótopos que tienen emisiones de rayos gamma o positrones visualizables por imagen, tales como  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  y  $^{67}\text{Ga}$ . Quelantes ejemplo incluyen diaminaditioles, monoamina-monoamiditioles, triamida-monotioles, monoamina-diamida-monotioles, diaminadioximas e hidrazinas. Los quelantes son en general  
10 tetradentados con átomos donantes seleccionados de oxígeno y azufre, y pueden incluir, por ejemplo, poliaminocarboxilatos cíclicos o acíclicos tales como ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), (DO3A), 2-bencil-DOTA, ácido alfa-(2-fenetil)1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-acético-4,7,10-tris(metilacético), ácido 2-bencil-ciclohexildietilentriaminapentaacético, 2-bencil-6-metil-DTPA y 6,6"-bis[N,N,N",N"-tetra(carboximetil)aminometil]-4'-(3-amino-4-metoxifenil)-2,2':6',2"-terpiridina.

15 Los quelantes o restos de unión para radiofármacos terapéuticos pueden seleccionarse para formar complejos estables con los radioisótopos que tienen partículas alfa, partículas beta, emisiones electrónicas Auger o Coster-Kronig, tales como  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  y  $^{67}\text{Cu}$ . Los quelantes pueden seleccionarse de diaminaditioles, monoamina-monoamiditioles, triamida-monotioles, monoamina-diamida-monotioles, diaminadioximas e hidrazinas, poliaminocarboxilatos cíclicos y acíclicos tales como DTPA, DOTA, DO3A, 2-bencil-DOTA, ácido alfa-(2-fenetil)1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-acético-4,7,10-tris(metilacético), ácido 2-bencil-ciclohexildietilentriaminapentaacético, 2-bencil-6-metil-DTPA y 6,6"-bis[N,N,N",N"-tetra(carboximetil)aminometil]-4'-(3-amino-4-metoxifenil)-2,2':6',2"-terpiridina.

### (B) Indicadores magnéticos

20 Otros indicadores ejemplo pueden incluir un agente quelante para agentes para resonancia magnética. Tales quelantes pueden incluir, por ejemplo, quelantes de poliamina-policarboxilato o quelantes de ácido iminoacético que pueden estar químicamente unidos a los agentes.

25 Quelantes para agentes de imaginología para resonancia magnética pueden seleccionarse para formar complejos estables con iones metálicos, tales como Gd(III), Dy(III), Fe(III) y Mn(II), están seleccionados de poliaminocarboxilatos cíclicos y acíclicos tales como DTPA, DOTA, DO3A, 2-bencil-DOTA, ácido alfa-(2-fenetil)1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-acético-4,7,10-tris(metilacético), ácido 2-bencil-ciclohexildietilentriaminapentaacético, 2-bencil-6-metil-DTPA y 6,6"-bis[N,N,N",N"-tetra(carboximetil)aminometil]-4'-(3-amino-4-metoxifenil)-2,2':6',2"-terpiridina.

30 En una realización, los agentes de imaginología están químicamente unidos a nanopartículas de óxido metálico superparamagnéticas que bien (a) son no fluorescentes o (b) son fluorescentes y pueden usarse en una diversidad de aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Nanopartículas de óxido metálico fluorescentes que también tienen propiedades magnéticas pueden usarse para IRM, proporcionando de este modo un agente de imaginología multimodalidad.

35 En determinadas realizaciones, los agentes de imaginología pueden incluir nanopartículas de óxido metálico superparamagnéticas fluorescentes y/o no fluorescentes con una o más de las siguientes características: (1) un revestimiento de polímero adecuado para unir una pluralidad de agentes (2) un revestimiento de polímero no reticulado adecuado para unir de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 agentes por partícula, y (3) un revestimiento de polímero que es adecuado para una unión química eficaz de los agentes con retención de sus propiedades biológicas para proporcionar agentes de imaginología moleculares. La nanopartícula de óxido metálico modificada con el agente puede ser un agente de imaginología molecular muy estable *in vitro*, tanto antes como  
40 después de la unión química de los agentes, pero todavía lábil y/o degradable *in vivo*.

### (C) Indicadores de ultrasonidos

45 Un indicador no fluorescente puede incluir burbujas rellenas de gas, tales como Levovist, Albnunex, o Echovist, o partículas o quelatos metálicos en los que los iones metálicos tienen números atómicos 21-29, 42, 44 o 57-83, por ejemplo para facilitar la imaginología por ultrasonidos. Ejemplos de tales compuestos se describen en Tyler et al., *Ultrasonic Imaging*, 3, páginas 323-29 (1981) y D.P. Swanson, "Enhancement Agents for Ultrasound: Fundamentals," *Pharmaceuticals in Medical Image*, páginas 682-87 (1990).

### (D) Indicadores de rayos X

50 Indicadores ejemplo pueden estas compuestos de moléculas orgánicas yodadas o quelatos de iones de metales pesados de números atómicos 57 a 83, por ejemplo, para imaginología por rayos X. Ejemplos de tales compuestos se describen en M. Sovak, ed., "Radiocontrast Agents," Springer-Verlag, páginas 23-125 (1984) y en la patente de Estados Unidos n.º 4,647,447.

### III. Enlazadores

55 Los restos enlazadores o espaciadores pueden usarse para unir covalentemente uno o más fluoróforos, inactivadores, modificadores biológicos e indicadores no fluorescentes a un oligopéptido escindible enzimáticamente o a un modificador biológico opcional para producir agentes de la presente invención. Se sobreentiende que, si está presente, no hay limitación estructural, de tamaño o de contenido particular. Enlazadores pueden incluir, por

ejemplo, una diversidad de grupos funcionales tales como maleimida, ditiopiridilo, tiol, azida, alqueno o alquino que permitan el ensamblaje de moléculas se estructura diferente.

Los enlazadores pueden ser enlazadores monofuncionales o enlazadores heterofuncionales. Por ejemplo, restos funcionalizados con amina (NH<sub>2</sub>) pueden hacerse reaccionar con reticuladores bifuncionales diseñados para reaccionar con grupos amino. Reaccionantes de conjugación particularmente útiles que pueden facilitar la formación de un enlazador o facilitar la unión covalente entre, por ejemplo, un fluoróforo y un oligopéptido escindible enzimáticamente pueden incluir un éster N-hidroxisuccinimida (NHS) y/o una maleimida. El éster NHS puede reaccionar con el grupo amina de, por ejemplo, un péptido o fluoróforo. La maleimida puede reaccionar con el grupo sulfhidrilo de otra molécula. Otros restos enlazadores particularmente útiles son reticuladores funcionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), cadena larga-SPDP, éster N-hidroxisuccinimida de ácido maleimidobenzoico (MBS), trans-4-(maleimidilmetil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), yodoacetato de succinimidilo (SIA).

En determinadas realizaciones un enlazador, si está presente, puede ser un derivado de una diamina. Un resto o derivado de diamina puede proporcionar una estructura enlazadora de diversas longitudes y químicas para unir químicamente moléculas por derivatización, opcionalmente, con ácidos carboxílicos. Ejemplos no limitantes de diaminas incluyen etilendiamina (EDA), propilendiamina, espermidina, espermina, hexanodiamina y diamina-aminoácidos, tales como homolisina, lisina, ornitina, ácido diaminobutírico y ácido diaminopropiónico. En otras realizaciones, restos de un agente de imaginología pueden estar químicamente unidos a un ácido dicarboxílico, por ejemplo, ácido succínico, ácido glutárico, ácido subérico o ácido adípico. En una realización, el enlazador es aminoetilmaleimida.

En determinadas realizaciones, un enlazador puede formarse a partir de un resto azida que puede reaccionar con alquinos sustituidos en una cicloadición de azida-acetileno de Huisgen [3+2]. En determinadas realizaciones el enlazador de azida o alquino puede unir un resto polietilenglicol (PEG) a, por ejemplo, un oligopéptido escindible enzimáticamente. Otros enlazadores contemplados incluyen restos propargilglicina, pentanoilo, ácido pentoinico, ácido propargílico y/o propargilamina.

En determinadas realizaciones, fluoróforos, inactivadores u otros indicadores están directamente unidos al agente de imaginología usando grupos éster NHS reactivos en los fluoróforos, inactivadores o indicadores que reaccionan con un grupo amina en el oligopéptido escindible enzimáticamente. En determinadas realizaciones, grupos ácido carboxílico en los fluoróforos, inactivadores u otros indicadores pueden ser activados *in situ* por agentes activadores conocidos en la técnica, tales como hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametiluronio (HBTU), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC), carbonato de N,N'-disuccinimidilo (DSC). En otras realizaciones, indicadores que incluyen un grupo sulfhidrilo o tiol pueden estar químicamente unidos al agente a través de un reticulador bifuncional que tiene un segundo resto que puede reaccionar con un grupo sulfhidrilo (tiol). Tales agentes reticuladores incluyen, por ejemplo y como se ha descrito antes, SPDP, cadena larga-SPDP, SIA, MBS, SMCC, y otro que son bien conocidos en la técnica.

Restos enlazadores útiles incluyen tanto aminoácidos naturales y no naturales, oligopéptidos, por ejemplo, oligopéptidos lineales o cíclicos y ácidos nucleicos.

El enlazador puede ser un péptido o resto peptídico que incluya opcionalmente un sitio de escisión proteolítico o no proteolítico, tal como una unión éster, que pueda escindirarse debido a cambios de pH en el sitio de interés.

#### 40 **IV Modificadores biológicos**

Tal como se usa en la presente memoria, el término "modificador biológico" se entiende que significa cualquier resto que pueda usarse para alterar las propiedades biológicas del agente de imaginología, tales como, sin limitación, hacer el agente más soluble en agua o más dispersable en medios para su administración, aumentar la especificidad de unión, reducir la inmunogenicidad o toxicidad, o modificar el perfil farmacocinético comparado con los agentes modificados por un modificador no biológico.

En una realización, uno o más modificadores biológicos pueden estar únicos químicamente al oligopéptido escindible enzimáticamente o fluoróforo. En una realización, el modificador biológico está unido covalentemente al péptido escindible enzimáticamente en una posición que no está entre dos aminoácidos unidos covalentemente a un fluoróforo o un inactivador.

Modificadores biológicos ejemplo incluyen polietilenglicol (PEG) y derivados del mismo (por ejemplo, alcoxi polietilenglicol (por ejemplo, metoxipolietilenglicol, etoxipolietilenglicol y similares), polipropilenglicol ramificado, polipropilenglicol, un copolímero de injerto de poli-lisina y metoxipolietilenglicol, aminoácidos, péptidos, lípidos, ácidos grasos, palmitato, fosfolípidos, conjugados de fosfolípido-PEG, carbohidratos (tales como dextrano, aminodextrano, carboximetil-dextrano), nanopartículas de óxido de hierro, sulfonatos, polisulfonatos, ácido cisteico, naftilalanina, fenilalanina y 3,3-difenilpropilamina.

En general, el modificador biológico puede tener un peso molecular de aproximadamente 2 kDa a menos de 50 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa, tal como de aproximadamente 10 kDa a

aproximadamente 35 kDa, adicionalmente tal como de aproximadamente 15 kDa a 30 kDa. En otra realización, el modificador biológico puede tener un peso molecular de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 45 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 35 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 30 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 25 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 15 kDa, adicionalmente tal como de aproximadamente 5 kDa a 10 kDa. En otra realización, el modificador biológico puede tener un peso molecular de aproximadamente 2 kDa a menos de 50 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 45 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 35 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 30 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 25 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 10 kDa, adicionalmente tal como de aproximadamente 2 kDa a 5 kDa.

En determinadas realizaciones, como se ha descrito antes, el modificador biológico puede ser un resto PEG que tiene un peso molecular, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 kDa a aproximadamente 50 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 35 kDa, o de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 30 kDa. De forma alternativa, el PEG puede ser dPEG, funcionalizado a un peso molecular discreto, por ejemplo, de aproximadamente 1100 daltons.

En determinadas realizaciones, el PEG es metoxiPEG<sub>(5000)</sub>-propionato de succinimidilo (mPEG-SPA), metoxiPEG<sub>(5000)</sub>-succinato de succinimidilo (mPEG-SS). Tales PEGS están disponibles de forma comercial de Nektar Therapeutics o SunBiowest o LaysanBio o NOF.

En una realización, puede conjugarse un resto PEG con aminas reactivas en el oligopéptido escindible enzimáticamente o fluoróforo a través de la funcionalidad carboxilo. De forma alternativa, el modificador PEG puede estar conjugado con el oligopéptido escindible enzimáticamente o fluoróforo usando un reticulador reactivo a tiol y luego reacción con un grupo tiol en el PEG.

En una realización, el PEG puede ser ramificado o en forma de Y, como está disponible de JenKem USA o NOF, o con forma de peine, o sintetizado acoplando dos o más PEG con una pequeña molécula tal como ácido glutámico.

La posición omega del PEG puede incluir un grupo hidroxilo o un grupo metoxi y el PEG también puede contener un grupo amino en la posición omega. Dicho grupo amino puede a su vez acoplarse a una diversidad de agentes. En otra realización de la presente invención, el modificador biológico puede ser una poli-L-lisina pegilada o una poli-D-lisina pegilada.

En otras realizaciones, el modificador biológico puede ser polímeros del tipo polivinilpirrolidona (PVP). El modificador biológico puede ser una polivinilpirrolidona funcionalizada por ejemplo, funcionalizada con carboxi o amino en un (o ambos) extremos del polímero (como la disponible de Polymersource) o en la cadena del polímero.

De forma alternativa, el modificador biológico puede incluir N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), o HPMA funcionalizada (amina, carboxi, etc.), poli(N-isopropil acrilamida) o poli(N-isopropilacrilamida) funcionalizada.

Modificadores biológicos pueden incluir grupos acilo de cadena lineal o ramificada tales como pentinoilo; grupos ácidos tales como succinilo; grupos alquilo inferior tales como metilo, etilo, propilo, etc.; grupos carboxialquilo tales como carboxietilo; grupos haloalquilo, tales como trifluorometilo; y similares.

En otras realizaciones, el modificador biológico puede incluir, aunque sin quedar limitado a los mismos, proteínas, péptidos, anticuerpos y fragmento de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>), anticuerpos de cadena sencilla o sFvs, oligonucleótidos, aptámeros, glucoproteínas, ligandos para receptores celulares, polisacáridos, receptores celulares, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, biotina, hormonas, neurohormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, lectinas, selectinas, toxinas, ácidos nucleicos, oligonucleótidos y derivados de los mismos. Pueden usarse otras biomoléculas tales como moléculas dirigidas a diana mediadas por folato (Leamon & Low, Drug Discovery Today, 6:44-51, 2001), transferrina, vitaminas, carbohidratos y ligandos que se dirigen la internalización de receptores, incluyendo, aunque sin limitarse a los mismos, receptor de asialoglucoproteína, somatostatina, factor de crecimiento nervioso, oxitocina, bombesina, calcitonina, arginina, vasopresina, angiotensina II, péptido natriurético atrial, insulina, glucagones, prolactina, gonadotropina, diversos opioides y activador de plasminógeno de tipo urocinasa. Se contemplan biomoléculas tales como agentes que se dirigen a integrinas, tales como  $\alpha_v\beta_3$  y GP $\alpha_{IIb}\beta_3$ , bombesina, CD4 y VCAM-1. También se contemplan péptidos para Hepsina, SPARC, PAR1, cáncer de colon, Factor 13.

Péptidos ejemplo para su uso como modificadores biológicos incluyen: (Hepsina) Ile-Pro-Leu-Val-Leu-Pro-Leu (SEQ ID NO:1); (SPARC) Ser-Pro-Pro-Thr-Gly-Ile-Asn (SEQ ID NO:2); (VCAM1) Val-His-Pro-Lys-Gln-His-Arg (SEQ ID NO:3); (Catepsina K) Val-His-Pro-Lys-Gln-His-Arg (SEQ ID NO:4); (péptido de unión por selección a E) Cys-Asp-Ser-Asp-Ser-Asp-Ile-Thr-Trp-Asp-Gln-Leu-Trp-Asp-Asp-Leu-Met-Lys (SEQ ID NO:5); y (Tat) Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg (SEQ ID NO:6).

Otros modificadores biológicos contemplados incluyen compuestos y secuencias señalizadores de membrana,

transmembrana y de translocación nuclear, que pueden derivarse de una serie de fuentes que incluyen, sin limitación, virus y bacterias. Ejemplos no limitantes incluyen péptidos derivados de HIV-tat, protamina y péptidos poliArg y ricos en Arg.

5 Modificadores biológicos también pueden incluir compuestos sintéticos que incluyen, aunque sin quedar limitados a los mismos, fármacos de pequeñas moléculas, moléculas fototerápicas y derivados de los mismos. Otros modificadores biológicos contemplados incluyen antibióticos tales como vancomicina, clindamicina, agentes quimioterápicos tales como doxorubicina, moléculas tales como glicina, derivados de AMG706, Zactima™, MP-412, erlotinib, sorafenib, dasatinib, lestaurtinib, lapatinib, XL647, XL999, MLN518, PKC412, STI571, AMN107, AEE788, OSI-930, OSI-817, sunitinib, AG-013736; moléculas que se dirigen/inhíben receptores VEGF, receptor PDGF, HER2, SSKI, EphB4, EGFR, FGFR, VEGFR-2, VEGFR-3, serina/treonina y cinasas receptoras, FLT-3, RTKs tipo III, c-KIT, Bcr-Abl, CSF-1R, CCR-2, RET, VEGF-2 y reactivos fotodinámicos incluyendo, pero sin limitarse a Clorina e6, Photofrin®, Lutrin®, Antrin®, ácido aminolevulínico, hipericina, porfirinas y derivados de porfirina, por ejemplo, derivado de benzoporfirina.

15 Los modificadores biológicos pueden, en determinadas circunstancias, hacer los agentes de imaginología más útiles para la imaginología biológica. Por ejemplo, el modificador biológico puede hacer a los agentes más solubles en agua, y/o más dispersables en medios para su administración y/o puede tener una mayor especificidad de unión, y/o puede ser menos inmunógeno y/o menos tóxico, y/o tener una menor unión no específica, y/o un perfil de distribución y/o farmacocinético alterado al compararlo con un agente modificado no biológicamente. Por ejemplo, la incorporación de metoxipolietilenglicol (mPEG) o polipéptidos puede actuar modificando la farmacodinámica y las 20 tasas de depuración sanguínea de los agentes *in vivo*. Otros modificadores biológicos pueden elegirse para acelerar la depuración de los agentes de los tejidos subyacentes tales como muscular o hepático, y/o de la sangre, reduciendo de este modo la interferencia subyacente y mejorando la calidad de imagen. Adicionalmente, los modificadores biológicos también pueden usarse para favorecer una ruta particular de excreción, por ejemplo, a través de los riñones en lugar de a través del hígado. Los modificadores biológicos también pueden ayudar a 25 formular agentes en composiciones farmacéuticas o pueden usarse para alterar o preservar las propiedades indicadoras de señal de los agentes. En una realización de la presente invención, el modificador biológico puede ser un poliaminoácido o un péptido, incluyendo péptidos cíclicos. En particular, la unión química de polietilenglicol (PEG) o un derivado del mismo a agentes puede dar lugar a un mayor tiempo de residencia en sangre (mayor circulación) y a reducir la inmunogenicidad.

### 30 V. Oligopéptidos escindibles enzimáticamente

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "oligopéptido escindible enzimáticamente" se sobreentiende que se refiere a un péptido que comprende dos o más aminoácidos (tal como se ha definido aquí) que están unidos por medio de un enlace peptídico escindible enzimáticamente. También se incluyen restos que incluyen un pseudopéptido o peptidomimético. Ejemplos de sustratos peptídicos escindibles pueden encontrarse en la patente de Estados Unidos n.º 7,439,319.

El término "aminoácido" tal como se usa en la presente memoria se sobreentiende que se refiere a un compuesto orgánico que contiene un grupo amino básico y un grupo ácido carboxílico. En este término están incluidos aminoácidos naturales (por ejemplo, L-aminoácidos), aminoácidos modificados y no habituales (por ejemplo, D-aminoácidos), así como aminoácidos que se sabe se presentan biológicamente en forma libre o combinada pero que normalmente no se encuentran en proteínas. Aminoácidos naturales incluyen, aunque sin quedar limitados a los mismos, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina, triptófano, prolina y valina. Otros aminoácidos incluyen, aunque sin quedar limitados a los mismos, ácido arginosuccínico, citrulina, cisteína ácido 45 sulfínico, 3,4-dihidroxifenilalanina, homocisteína, homoserina, ornitina, carnitina, selenocisteína, selenometionina, 3-monoyodotirosina, 3,5-diyodotirosina, 3,5,5'-triyodotironina, y 3,3',5,5'-tetrayodotironina.

Aminoácidos modificados o no habituales que pueden usarse para llevar a la práctica la invención incluyen, aunque sin quedar limitados a los mismos, D-aminoácidos, hidroxilisina, deshidroalanina, pirrolisina, ácido 2-aminoisobutírico, ácido gamma aminobutírico, 5-hidroxitriptófano, S-adenosil metionina, S-adenosil homocisteína, 4-hidroxi prolina, un aminoácido protegido con N-Cbz, ácido 2,4-diaminobutírico, homoarginina, norleucina, ácido N-metilaminobutírico, naftilalanina, fenilglicina, .beta.-fenilprolina, terc-leucina, 4-aminociclohexilalanina, N-metilnorleucina, 3,4-deshidroprolina, N,N-dimetilaminoglicina, N-metilaminoglicina, ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico, ácido 6-aminocaproico, ácido trans-4-(aminometil)-ciclohexanocarboxílico, ácido 2-, 3-, y 4-(aminometil)-benzoico, 1-ácido aminociclopentanocarboxílico, ácido 1-aminociclopropanocarboxílico y ácido 2-bencil-5-aminopentanoico.

Tal como se usa en la presente memoria, un "pseudopéptido" o "peptidomimético" es un compuesto que emula la estructura de un residuo aminoacídico o un péptido, por ejemplo, usando grupos de unión distintos de las uniones amida (enlaces pseudopeptídicos) y/o usando sustituyentes no aminoácidos y/o un residuo aminoacídico modificado. Un "residuo pseudopeptídico" se refiere a la porción de un pseudopéptido o peptidomimético que está presente en un péptido. El término "enlaces pseudopeptídicos" incluye isómeros con enlace peptídico que pueden usarse en lugar de, o como sustituyentes para la unión amida normal. Estas uniones sustitutas o "equivalentes" de amida se 60 forman a partir de combinaciones de átomos no encontrados normalmente en péptidos o proteínas que emulan los

requerimientos espaciales del enlace amida y que estabilizarán la molécula frente a la degradación enzimática. En la presente memoria se usan las siguientes abreviaturas convencionales aminoacídicas de tres letras: Ala = alanina; Aca = ácido aminocaproico, Ahx = ácido 6-aminohexanoico, Arg = arginina; Asn = asparaginas; Asp = ácido aspártico; Cha = ciclohexilalanina; Cit = citrulina; Cys = cisteína; Dap = ácido diaminopropionico; Gln = glutamina; Glu = ácido glutámico; Gly = glicina; His = histidina; Ile = isoleucina; Leu = leucina; Lys = lisina; Met = metionina; Nal = naftilalanina; Nle = norleucina; Orn = ornitina; Phe = fenilalanina; Phg = fenilglicina; Pro = prolina; Sar = sarcosina; Ser = serina; Thi = tienilalanina; Thr = treonina; Trp = triptófano; Tyr = tirosina; y Val = valina. El uso del prefijo D- indica el isómero D de dicho aminoácido; por ejemplo D-lisina está representada como D-Lys.

Los péptidos pueden sintetizarse usando bien química en solución o química en fase sólida o una combinación de ambas (Albericio, Curr. Opin. Cell Biol., 8, 211-221 (2004), M. Bodansky, Peptide Chemistry: A Practical Textbook, Springer-Verlag; N.L. Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis, 2005, CRC Press).

Pueden requerirse grupos protectores de amina selectivos u ortogonales para preparar los agentes de la invención. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "grupo protector de amina" se refiere a cualquier grupo conocido en la técnica de síntesis orgánica para la protección de grupos amina. Tales grupos protectores de amina incluyen los listados en Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis" John Wiley & Sons, Nueva York (1981) y "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, Academic Press, Nueva York (1981). Puede usarse cualquier grupo protector de amina conocido en la técnica. Ejemplos de grupos protectores de amina incluyen, aunque sin quedar limitados a los mismos, los siguientes: 1) tipos acilo tales como formilo, trifluoroacetilo, ftalilo y p-toluenosulfonilo; 2) tipos carbamato aromático tales como benciloxycarbonilo (Cbz o Z) y benciloxycarbonilos sustituidos, 1-(p-bifenil)-1-metiletoxicarbonilo y 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc); 3) tipos carbamato alifático tales como terc-butiloxycarbonilo (Boc), etoxycarbonilo, diisopropilmetoxycarbonilo y aliloxycarbonilo; 4) tipos carbamato de alquilo cíclico tales como ciclopentiloxycarbonilo y adamantiloxycarbonilo; 5) tipos alquilo tales como trifenilmetilo y bencilo; 6) trialkilsilano tal como trimetilsilano; y 7) tipos que contienen tiol tales como feniltiocarbonilo y ditiasuccinoilo. También están incluidos en el término "grupo protector de amina" grupos acilo tales como azidobenzilo, p-benzoilbenzilo, o-benzoilbenzilo, p-acetilbenzilo, dansilo, glicil-p-benzoilbenzilo, fenilbenzilo, m-benzoilbenzilo, benzoilbenzilo.

En determinadas realizaciones el oligopéptido escindible enzimáticamente puede incluir oligo-L-arginina, oligo-L-lisina, oligo-L-ácido aspártico o oligo-L-ácido glutámico.

En determinadas realizaciones el oligopéptido escindible enzimáticamente incluye lisina y arginina. En determinadas realizaciones de la presente invención, el oligopéptido escindible enzimáticamente puede incluir lisina, arginina y fenilalanina, o puede incluir lisina, fenilalanina y glicina. En otra realización, el oligopéptido escindible enzimáticamente puede incluir lisina, fenilalanina, leucina y glicina, o puede incluir ornitina, fenilalanina, leucina y glicina. En una realización, el oligopéptido escindible enzimáticamente puede incluir ácido diaminopropiónico, ornitina, fenilalanina, leucina y glicina.

Ejemplos de oligopéptidos escindibles enzimáticamente se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Oligopéptido	SEQ ID NO.
Lys-Lys-Lys-Lys-Gly	7
Lys-Lys-Lys-Gly	8
Lys-Lys-Gly-Lys-Lys	9
Orn-Lys-Lys-Orn-Gly	10
Orn-Lys-Lys-Orn-Ahx	11
Orn-Lys-Lys-Orn-Ahx-Gly-Gly	12
Lys-Lys-Lys-Lys-Ahx	13
Lys-Lys-Lys-βAla	14



ES 2 658 852 T3

Oligopéptido	SEQ ID NO.
Lys-Lys-Lys-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	15
Gly-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Gly	16
Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Gly	17
D-Lys-Lys-Lys-Lys-D-Lys-Lys-Gly	
Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ahx	18
Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	19
Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-D-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	
Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Gly	20
Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Gly-Cys	21
Lys-Arg-Arg-Arg-Lys-Arg-Gly	22
Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Gly	23
Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Lys-Arg-Gly	24
Phe-Arg-Lys-Gly-Gly-Arg-Lys	25
Phe-Arg-Lys-Gly-Gly-Arg-D-Lys	
Phe-Arg-Lys-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys	26
Phe-Arg-Lys-Gly-Gly-Arg-Lys-Ahx	27
Phe-Arg-Lys-Gly-Gly-Arg-Lys-Gly-Gly	28
Cha-Arg-Lys-Gly-Gly-Arg-Lys	29
Thi-Arg-Lys-Gly-Gly-Arg-Lys	30
Thi-Arg-Lys-Gly-Gly-Arg-Lys-Gly	31
Phe-Gly-Lys-Arg-Arg-Lys	32
D-Phe-Gly-Lys-Arg-Arg-Lys	
Thi-Gly-Lys-Arg-Arg-Lys	33
Cha-Gly-Lys-Arg-Arg-Lys	34
Phe-Gly-Orn-Arg-Arg-Dap	35
Phe-Gly-Orn-Arg-Arg-Orn	36

ES 2 658 852 T3

Oligopéptido	SEQ ID NO.
Phe-Gly-Lys-Arg-Arg-Lys-Gly-Gly	37
Phe-Gly-Lys-Arg-Arg-Lys-Ahx	38
Phe-Gly-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg-Arg-Ahx	39
Phe-Gly-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg-Arg-D-Arg-Ahx	
Phe-Gly-Lys-Arg-Arg-Lys-Glu-Glu-Glu-Ahx	40
Phe-Gly-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg-Arg-Ahx-Cys	41
Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys	42
D-Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys	
Orn-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Orn	43
Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys-Gly	44
Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys-Ahx	45
Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys-Gly-Gly-Gly	46
Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys	47
Ahx-Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys-Ahx	48
Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys-Ahx-Cys	49
Gly-Phe-Leu-Gly-Lys	50
Lys-Phe-Leu-Gly-Lys-Ahx	51
Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly	52
Gly-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Ahx	53
Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Cys	54
Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Ahx-Cys	55
Gly-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Ahx-Cys	56
Gly-Phe-Leu-Gly-Orn	57
Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys	58
His-Gly-Pro-Asn-Lys-His-Gly-Pro-Asn-βAla	59
His-Gly-Pro-Asn-Orn-His-Gly-Pro-Asn-βAla	60

ES 2 658 852 T3

Oligopéptido	SEQ ID NO.
His-Gly-Pro-Asn-Lys-His-Gly-Pro-Asn-βAla	61
Lys-His-Gly-Pro-Asn-Lys-His-Gly-Pro-Asn-βAla	62
Orn-His-Gly-Pro-Asn-Lys-His-Gly-Pro-Asn-βAla	63
Orn-His-Gly-Pro-Asn-Orn-His-Gly-Pro-Asn-βAla	64
Phe-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Asn-Lys-His-Gly-Pro-Asn-Ahx	65
His-Gly-Pro-Arg-Lys-His-Gly-Pro-Arg-βAla	66
His-Gly-Pro-Asn-Lys-His-Gly-Pro-Arg-βAla	67
His-Gly-Pro-Arg-Lys-His-Gly-Pro-Asn-βAla	68
His-Gly-Pro-Asn-Lys-His-Gly-Pro-Asn-Ahx	69
His-Gly-Pro-Arg-Lys-His-Gly-Pro-Arg-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly	70
His-Gly-Pro-Arg-Orn-His-Gly-Pro-Arg-βAla	71
His-Gly-Pro-Cit-Lys-His-Gly-Pro-Asn-βAla	72
His-Gly-Pro-Asn-Lys-His-Gly-Pro-Cit-βAla	73
His-Gly-Pro-Asn-Orn-His-Gly-Pro-Cit-βAla	74
His-Gly-Pro-Asn-Lys	75
His-Gly-Pro-Asn-Orn	76
Lys-His-Gly-Pro-Asn-Lys	77
Orn-His-Gly-Pro-Asn-Lys	78
His-Gly-Pro-Asn-Lys-Gly-Gly-Gly	79
His-Gly-Pro-Asn-Lys-Gln-Gly-Gly	80
His-Gly-Pro-Asn-Orn-Gly-Gly-Ahx	81
His-Gly-Pro-Asn-Lys-Arg-Arg-Arg-Ahx	82
His-Gly-Pro-Asn-Lys-Arg-Gly-Gly	83
Gly-Arg-Arg-Arg-Ahx-Orn-His-Gly-Pro-Asn-Lys-Gly	84
Gly-Arg-Arg-Arg-Ahx-D-Lys-His-Gly-Pro-Asn-Lys-Gly	
His-Gly-Pro-Arg-Lys	85

ES 2 658 852 T3

Oligopéptido	SEQ ID NO.
His-Gly-Pro-Arg-Orn	86
Lys-His-Gly-Pro-Arg-Lys	87
Orn-His-Gly-Pro-Arg-Lys	88
His-Gly-Pro-Arg-Lys-Ahx	89
His-Gly-Pro-Arg-Lys-Gly-Gly-Gly	90
His-Gly-Pro-Arg-Orn-Gly-Gly-Ahx	91
His-Gly-Pro-Arg-Lys-Arg-Arg-Arg-Ahx	92
His-Gly-Pro-Arg-Lys-Arg-Gly-Gly	93
Gly-Arg-Arg-Arg-Ahx-Lys-His-Gly-Pro-Arg-Lys-Gly	94
Gly-Lys-Arg-Arg-Ahx-Orn-His-Gly-Pro-Asn-Orn-Gly	95
Gly-Lys-Lys-Arg-Ahx-Orn-His-Gly-Pro-Asn-Orn-Gly	96
Gly-Arg-Arg-Arg-Lys-Ahx-His-Gly-Pro-Asn-Lys-Gly	97
Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys	98
Lys-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys	99
Ahx-Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys	100
Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys-Ahx	101
Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys-Gln-Ahx	102
Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Orn	103
Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly-D-Lys	
Orn-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Orn	104
Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys-Cys	105
Lys-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys-Cys	106
Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys-Gly-Gly-Gly	107
Lys-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys-Gly-Gly-Gly	108
Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys-Arg-Arg-Arg	109
Lys-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys-Arg-Arg-Arg	110

ES 2 658 852 T3

Oligopéptido	SEQ ID NO.
Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys	111
Lys-Gly-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys	112
Ahx-Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys	113
Ahx-D-Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-D-Lys	
Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys-Ahx	114
Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Orn	115
Orn-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Orn	116
Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys-Cys	117
Lys-Gly-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys-Cys	118
Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys-Gly-Gly-Gly	119
Lys-Gly-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys-Gly-Gly-Gly	120
Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys-Arg-Arg-Arg	12 <sup>1</sup>
Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys-Arg-Arg-Arg-D-Arg	
Lys-Gly-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys-Arg-Arg-Arg	122
Lys-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Gly-Lys	123
His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln	124
Lys-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Gly-Orn-Ahx	125
Gly-Lys-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Lys	126
Lys-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Lys	127
Lys-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Gly-Lys-Cys	128
Lys-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Lys-Gly-Gly	129
Lys-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Lys-Gly-Gly-Arg-Arg	130
Lys-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Lys-Gly-Arg-Arg-Arg	131
Lys-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Lys-Ahx-Arg-Arg-Arg-Cys-Gly	132
Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His	133
Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His	134

## ES 2 658 852 T3

Oligopéptido	SEQ ID NO.
Lys-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	135
Lys-Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	136
Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	137
Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	138
Thr-Pro-Phe-Ser-Gly-Gln	139
Glu-Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Gln	140
Leu-Val-Gly-Gly-Ala	141
Tyr-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln	142
Val-Ala-Asp-Cys-Ala-Asp-Gln	143
Val-Ala-Asp-Cys-Ala-Asp-Arg-Gln	144
Val-Ala-Asp-Cys-Ala-Asp-Asp-Gln	145
Val-Ala-Asp-Cys-Arg-Asp-Gln	146
Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Arg-Arg-Gln	147
Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln	148
Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Pro-Arg-Gln	149
Gly-Phe-Leu-Gly	150
Gly-Leu-Phe-Gly	151
Glu-Gly-Phe-Leu-Gly	152
Glu-Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys	153
Arg-Arg-Glu-Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys	154
Arg-Gly-Leu-Gly-Lys	155
Gly-Gly-Arg-Arg	156
Gly-Gly	
Gly-Phe-Cha-Gly	157
Arg-Leu-Val-Gly-Phe-Asp	158
Arg-Gly- Phe-Phe-Leu	159

## ES 2 658 852 T3

<b>Oligopéptido</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
Arg-Gly-Phe-Phe-Pro	160
Ala-Phe-Leu-Gly	161
Phe-Pro-Ala-Met	162
Glu-Ala-Ala-Ala	163
Gly-Gly-Arg	
Gly-Arg	
Phe-Arg	
Glu-Lys-Arg-Arg-Lys	164
Succinil-Glu-Lys-Arg-Arg-Lys	165
Val-Lys-Lys-Arg	166
Ala-Pro	
Ala-Ala-Lys His-Gly-Pro-Asn	167
His-Gly-Pro-Arg	168
Gly-Pro-Arg	
Gly-Pro-Arg-Lys	169
Gly-Pro-Asn	
Pro-Ala-Gly-Pro	170
Asn-Gly-Pro-Asn-Lys	171
His-Gly-Pro-Ile	172
His-Gly-Hyp-Asn	173
His-Gly-Pro-Cit	174
His-Gly-hPro-Asn-Pro-Leu-Gly-Val-Arg	175
Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg	176
Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Glu	177
Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Asp	178
Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg	179

ES 2 658 852 T3

Oligopéptido	SEQ ID NO.
Pro-Leu-Gly-Glu-Arg-Gly	180
Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Gly	181
Gly-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys	182
Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln	183
Val-Pro-Met-Ser-Met-Arg-Gly-Gly	184
Ile-Pro-Val-Ser-Leu-Arg-Ser-Gly	185
Arg-Pro-Phe-Ser-Met-Ile-Met-Gly	186
Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Thr-Met-Gly	187
Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ser-Gly	188
Ile-Pro-Glu-Ser-Leu-Arg-Ala-Gly	189
Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-D-Lys	
Lys(COR)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His -Lys; R = Me	190
Lys(COR)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His -Lys; R = CF <sub>3</sub>	191
Lys(COR)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His -Lys; R = Et	192
Lys(COR)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His -Lys; R = mPEG20k	193
[R'CO] Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His -Lys; R' = Me	194
[R'CO] Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His -Lys; R' = carboxietilo	195
Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Tyr-His-Lys	196
Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Tyr-His-Lys	197
Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Lys	198
Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Lys	199
Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Lys	200
Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Lys	201
Lys-His-Pro-Tyr(R)-His-Leu-Val-Ile-His-Lys; R = Me	202
Lys-His-Pro-Tyr(R)-His-Leu-Val-Ile-His-Lys; R = Et	203
Ile-His-Pro-Tyr(R)-His-Leu-Val-Ile-His-Lys; R = Me	204



Oligopéptido	SEQ ID NO.
Ile-His-Pro-Tyr(R)-His-Leu-Val-Ile-His-Lys; R = Et	205
Orn-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	206
Dap-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	207
Ahx-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	208
Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	209
Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	210
Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	211
Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys	212
Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Lys	213
Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Lys-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg	214
Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Orn	215
Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Orn-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg	216
Ser-Pro-Leu-Ala-Asn-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Lys	217
Pro-Leu-Ala-Asn-Ala-Val-Lys-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg	218
Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-Lys	219
Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Arg-Arg-Gln-Lys	220
Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Gln-Gln-Lys	221
Ile-Ser-Leu-Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe	222
Gly-Lys-Asp-Glu-Val-Asp	223
Lys-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys	451
Lys(COR)-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys; R = Me, CF3	452

Otro oligopéptido escindible enzimáticamente ejemplo incluye un resto Cys-S-S-Cys.

5 En una realización de la presente invención, el oligopéptido escindible enzimáticamente puede ser un péptido cíclico escindible enzimáticamente que, por ejemplo, puede incluir de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 aminoácidos. En una realización de la presente invención, el agente puede incluir 2-5 péptidos cíclicos. En otra realización de la presente invención, el péptido cíclico puede incluir un componente acíclico.

10 Péptidos cíclicos pueden prepararse por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la unión del extremo N terminal de un péptido lineal con el extremo C terminal del péptido lineal: ciclación cabeza a cola. Tales uniones pueden ser mediante un enlace, por ejemplo, un enlace amida o a través de un enlazador. En una realización, pueden prepararse péptidos cíclicos mediante la unión del extremo N terminal de un péptido lineal con el ácido carboxílico de cadena lateral de un péptido lineal, mediante la unión de la amina de cadena lateral de un

5 péptido lineal con el ácido carboxílico del extremo C terminal de un péptido lineal o mediante la unión de la amina de cadena lateral de un péptido lineal con el ácido carboxílico de cadena lateral de un péptido lineal. Por ejemplo, pueden prepararse péptidos cíclicos uniendo el grupo tiol de cadena lateral de un péptido lineal con el grupo tiol de cadena lateral de un péptido lineal; por ejemplo, formando un enlace disulfuro Cys-Cys. Pueden prepararse péptidos cíclicos en fase de solución o en fase sólida y dicha ciclación de péptidos lineales puede conseguirse en fase de solución o en fase sólida.

10 Péptidos cíclicos se describen usando la nomenclatura convencional. Por ejemplo un péptido cíclico cabeza a cola que contiene Arg, Gly, Asp, Phe, Lys puede indicarse como ciclo(Arg-Gly-Asp-Phe-Lys)(SEQ ID NO:224); un péptido cíclico que contiene Cys, Arg, Gly, Asp, Cys puede mostrarse como sigue: cabeza a cola: ciclo(Cys-Arg-Gly-Asp-Cys)(SEQ ID NO:225); disulfuro: Cys-Arg-Gly-Asp-Cys (SEQ ID NO:225).

15 En determinadas realizaciones, el oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente puede incluir oligo-L-arginina, oligo-L-lisina, oligo-L-ácido aspártico o oligo-L-ácido glutámico. En determinadas realizaciones, el oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente incluye lisina y arginina. En otra realización de la presente invención, el oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente incluye lisina, arginina y fenilalanina. En una realización, un oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente incluye lisina, fenilalanina y glicina, o incluye lisina, fenilalanina, leucina y glicina, o incluye ornitina, fenilalanina, leucina y glicina. En otra realización, el oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente comprende ácido diaminopropiónico, ornitina, fenilalanina, leucina y glicina.

En una realización de la presente invención, el oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente puede incluir una o más unidades de oligopéptido escindible enzimáticamente.

20 Oligopéptidos cíclicos escindibles enzimáticamente ejemplo incluyen los mostrados en la Tabla 5.

**Tabla 5**

Oligopéptido cíclico	SEQ ID NO.
ciclo(Lys-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg)	226
ciclo(D-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg)	
ciclo(Lys-Arg-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg)	227
ciclo(D-Phe-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg-Gly)	
ciclo(Phe-Lys-Arg-Arg-Phe-Lys-Arg-Arg)	228
ciclo(D-Phe-Lys-Arg-Arg-D-PheLys-Arg-Arg)	
ciclo(Cys-Lys-Arg-Arg-Cys-Lys-Arg-Arg)	229
ciclo(Phe-Lys-Arg-Arg-Phe-Lys-Arg-Arg-D-Lys)	
ciclo(Phe-Lys-Arg-Arg-Phe-Lys-Arg-Arg-Gly-Gly-Gly)	230
ciclo(Lys-His-Gly-Pro-Asn-Lys-His-Gly-Pro-Asn-Gly)	231
ciclo(D-Lys-His-Gly-Pro-Asn-D-Lys-His-Gly-Pro-Asn-Gly)	
ciclo(Ahx-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg)	232
ciclo(Lys-Arg-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Lys)	233
ciclo(Gly-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Lys-Gly)	234
ciclo(Gly-D-Lys-Arg-Arg-Lys-D-Lys-Arg-Arg-Lys-Gly)	

Tales ciclopéptidos pueden incluir estructuras peptídicas en las para la activación del agente puedan requerirse uno o dos eventos proteolíticos.

- 5 El oligopéptido escindible enzimáticamente es escindible por al menos una enzima elegida de hidrolasas, elastasas, catepsinas, metaloproteasas de la matriz, peptidasas, exopeptidasas, endopeptidasas, carboxipeptidasas, glucosidasas, lipasas, nucleasas, liasas, amilasas, fosfolipasas, fosfatasas, fosfodiesterasas, sulfatasas, serina proteasas, subtilisina, quimiotripsina, tripsina, treonina proteasas, cisteína proteasas, calpaínas, papaínas, caspasas, ácido aspártico proteasas, pepsinas, quimiosinas, ácido glutámico proteasas, renina, reductasas y enzimas parásitas, víricas y bacterianas.

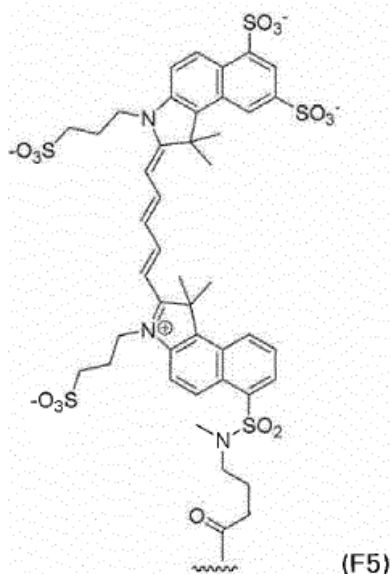
#### VI. Agentes de imaginología ejemplo

- 10 Agentes de imaginología útiles pueden crearse usando uno o más de los oligopéptidos escindibles enzimáticamente, fluoróforos, inactivadores (si es apropiado), modificadores biológicos e indicadores no fluorescentes descritos antes y acoplarse entre sí usando químicas convencionales conocidas en la técnica. Los agentes de imaginología pueden ser solubles en agua o dispersables en agua (es decir, suficientemente solubles o con capacidad de suspensión en soluciones acuosas o de medios fisiológicos). La semivida *in vivo* del agente puede diseñarse para que sea de al menos aproximadamente 10 minutos, pero más preferiblemente 30 minutos a varias horas. La semivida *in vivo* del agente es preferiblemente un tiempo (por ejemplo, al menos aproximadamente 30 minutos) suficiente para conseguir una buena exposición, unión a diana y señal para imaginología. En una realización preferida, la sonda del agente de imaginología es soluble en agua o dispersable en medio acuoso, y es biocompatible, es decir, no tóxica que tiene, por ejemplo, una  $DL_{50}$  mayor de aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Los agentes de imaginología tampoco tienen preferiblemente ninguna propiedad foto tóxica no deseada y/o presentan baja afinidad de proteínas séricas.

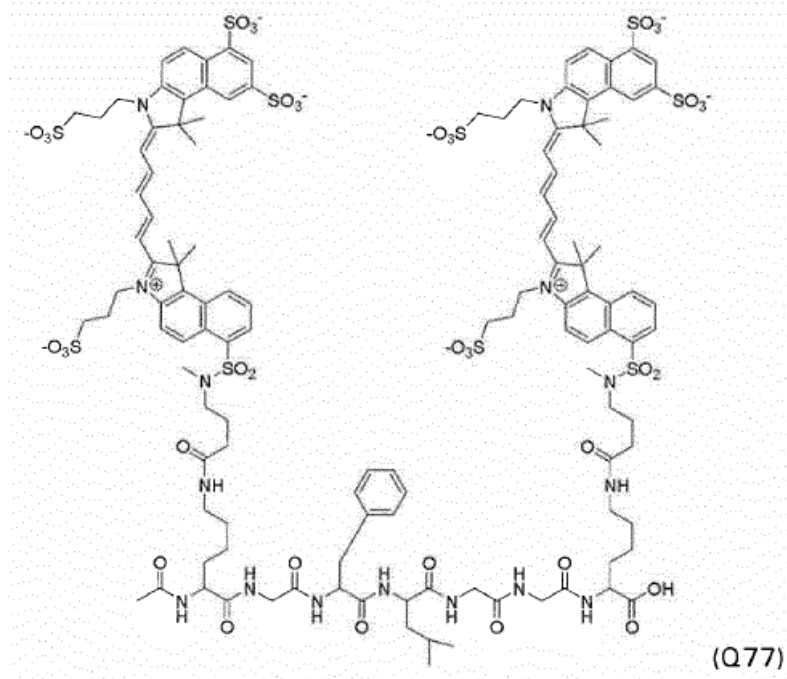
- 25 En determinadas realizaciones, los agentes descritos incluyen restos peptídicos o enlazadores capaces de liberar uno, dos o más fluoróforos del oligopéptido y/o modificador biológico al entrar en contacto con una enzima. Tales agentes de imaginología pueden incluir un modificador biológico que pueda liberarse de un oligopéptido escindible por una enzima que es diferente de aquella que escinde el péptido.

En las siguientes secciones se describen determinados agentes de imaginología preferidos.

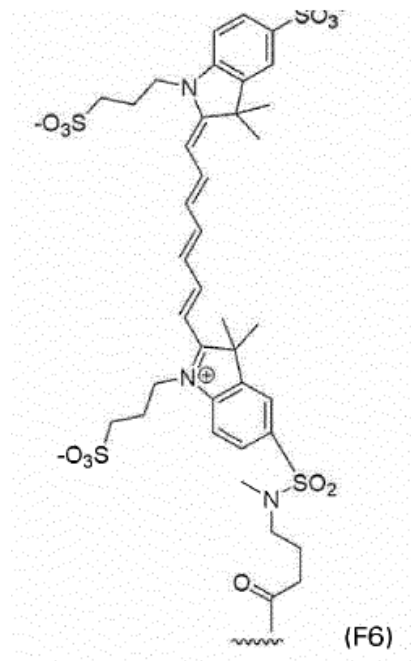
Un agente de imaginología ejemplo representado por la Fórmula Q77 incluye [Ac]-Lys(F5)-Gly-Phe-Leu-Gly-Gly-Lys(F5)-[OH] (SEQ ID NO:235), donde Ac es un grupo acetilo y F5 está representado por:



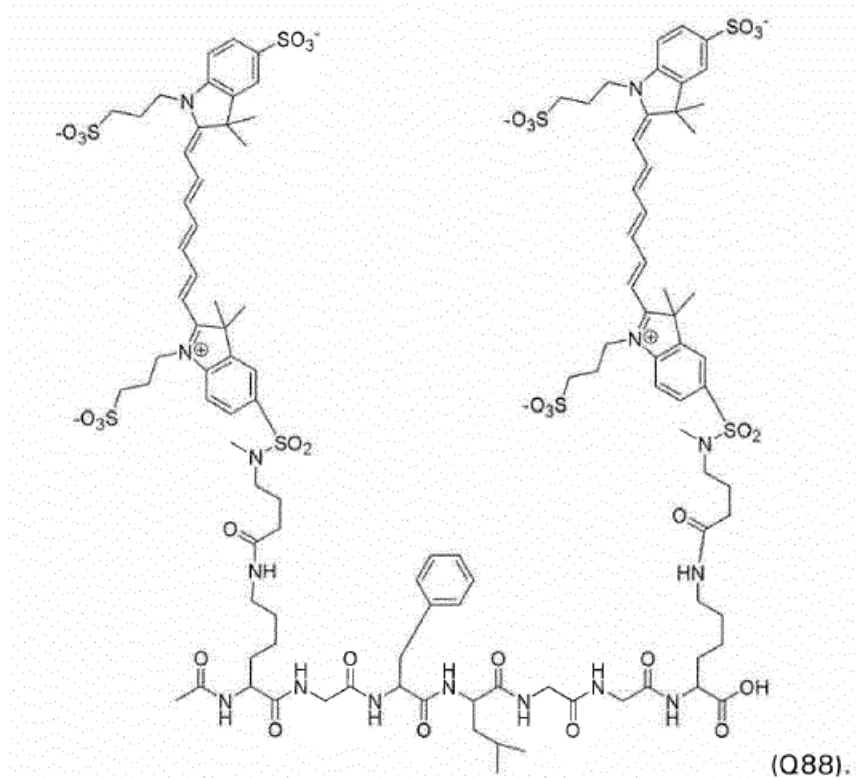
Un agente de imaginología ejemplo representado por la Fórmula Q77 incluye



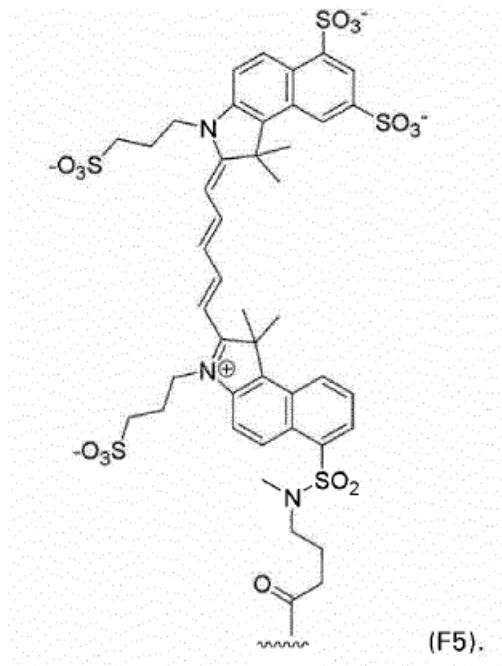
Un agente de imaginología ejemplo representado por la Fórmula Q88 incluye [Ac]-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Gly-Lys(F6)-[OH] (SEQ ID NO:236), donde Ac es un grupo acetilo y F6 es



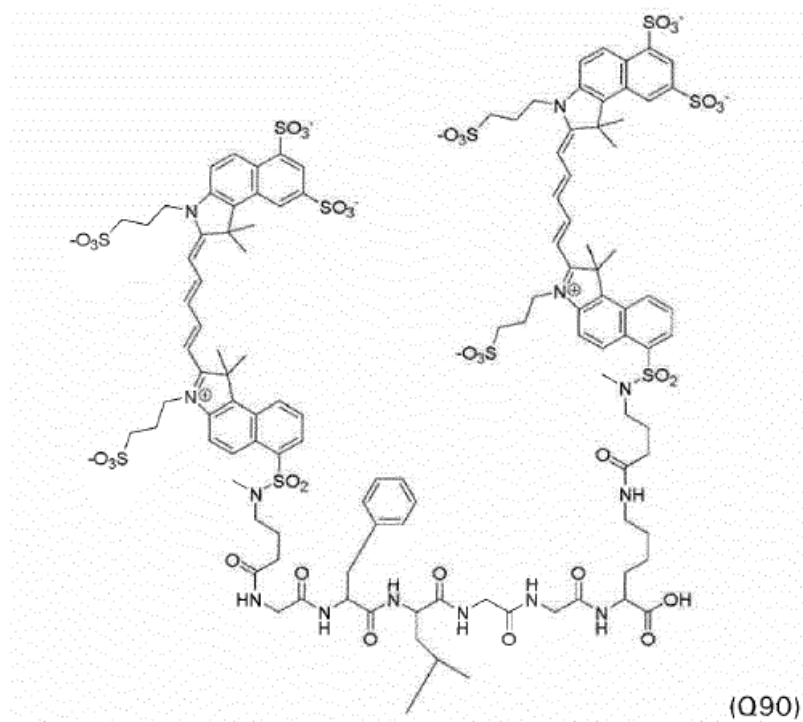
Un agente de imaginología ejemplo representado por la Fórmula Q88 incluye



Un agente de imaginología ejemplo representado por la Fórmula Q90 incluye [F5]-Gly-Phe-Leu-Gly-Gly-Lys(F5)-[OH] (SEQ ID NO:237), donde F5 es



Un agente de imaginología ejemplo representado por la Fórmula Q90 puede representarse como:



Otros agentes de imaginología ejemplo pueden incluir restos indicados en la Tabla 6.

**Tabla 6**

Agente de imaginología	SEQ ID NO.
[Acetil]-Lys(F5)-Lys-Lys-Lys(F5)-Lys-Lys-Gly-[OH]	238
[Acetil]-Lys(F5)-Lys-Lys-Lys(F5)-Gly-[OH]	239
[F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-[OH]	240
[F6]-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[OH]	241
[F5]-His-Gly-Pro-Arg-Lys(F5)-[OH]	242
[F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-His-Gly-Pro-Asn-βA-[OH]	243
[pentinoil]-Lys(F5)-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Lys(F5)-[OH]	244
[pentinoil]-Lys(F5)-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Gly-Lys(F5)-[OH]	245
[pentinoil]-Lys(F5)-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys(F5)-[OH]	246
[pentinoil]-Lys(F5)-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F5)-[OH]	247
[pentinoil]-Phe-Gly-Lys(F5)-Arg-Arg-Lys(F5)-[OH]	248
[pentinoil]-Phe-Arg-Lys(F5)-Gly-Gly-Arg-Lys(F5)-[OH]	249
[F5]-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F5)-[OH]	250

ES 2 658 852 T3

<b>Agente de imaginología</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
Acetil-Phe-Gly-Lys(F5)-Arg-Arg-Lys(F5)-Gly-[OH]	251
Acetil-Phe-Arg-Lys(F5)-Gly-Gly-Arg-Lys(F5)-[OH]	252
ciclo(Lys(F5)-Arg-Arg-Arg-Lys(F5)-Arg-Arg)	253
ciclo(Phe-Lys(F6)-Arg-Arg-Phe-Lys(F6)-Arg-Arg-Gly-Gly-Gly)	254
ciclo(Ahx-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-Arg-Arg)	255
[Acetil]-Lys(F5)-Lys-Lys-Lys(F5)-Lys-Lys-Gly-[mPEG20K]	256
[Acetil]-Lys(F5)-Lys-Lys-Lys(F5)-Gly-[mPEG20K]	257
[F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-[mPEG20K]	258
[F6]-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[mPEG20K]	259
[F5]-His-Gly-Pro-Arg-Lys(F5)-[mPEG20K]	260
[F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-His-Gly-Pro-Asn-βA-[mPEG20K]	261
[F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-[dPEG-1.1k]	262
[F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-[mPEG-5k]	263
[F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-[mPEG-10k]	264
[pentinoil]-Lys(F5)-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Lys(F5)-[mPEG20K]	265
[pentinoil]-Lys(F5)-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Gly-Lys(F5)-[mPEG20K]	266
[pentinoil]-Lys(F5)-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys(F5)-[mPEG20K]	267
[pentinoil]-Lys(F5)-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F5)-[mPEG20K]	268
[pentinoil]-Phe-Gly-Lys(F5)-Arg-Arg-Lys(F5)-[mPEG20K]	269
[pentinoil]-Phe-Arg-Lys(F5)-Gly-Gly-Arg-Lys(F5)-[mPEG20K]	270
[F5]-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F5)-OH	271
[succinil]-Lys(F5)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F5)-[NH <sub>2</sub> ]	272
[mPEG-20k]-(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	273
[mPEG-40k]-(F5)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F <sub>5</sub> )-[NH <sub>2</sub> ]	274
[difenilpropilamina]-(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	275
[dPEG-1.1k]-(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	276

ES 2 658 852 T3

Agente de imaginología	SEQ ID NO.
[succinil]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	277
[mPEG-20k-succinil]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	278
[difenilpropilamina-succinil]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	279
[dPEG-1,1k-succinil]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	280
[succinil]-Lys(F6)-Ala-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	281
[mPEG-20k]-Lys(F6)-Ala-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	282
[succinil]-Lys(F6)-Arg-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	283
[mPEG-20k-succinil]-Lys(F6)-Ala-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	284
[succinil]-Lys(F5)-Lys-Lys-Lys(F5)-[NH <sub>2</sub> ]	285
[mPEG-20k]-Lys(F5)-Lys-Lys-Lys(F5)-[NH <sub>2</sub> ]	286
[palmitoil]-Lys(F5)-Phe-Arg-Lys(F5)-[NH <sub>2</sub> ]	287
[Ac]-Lys(F5)-Lys-Lys-Lys(F5)-Gly-[Nanopartícula de óxido de hierro]	288
[F6]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F6)-[mPEG-20k]	289
[F6]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F6)-[mPEG-40k]	290
[F6]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F6)-[Y-PEG-40k]	291
[F6]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F6)-[eda]	292
[F6]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F6)-[PVP-6k]	293
[F6]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F6)-[Dextrano-10k]	294
[F6]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F6)-Glu(mPEG-20k)-[mPEG-20k]	295
Ac-Phe-Gly-Lys(F5)-Arg-Arg-Lys(F5)-Gly-[mPEG20K]	296
Ac-Phe-Arg-Lys(F5)-Gly-Gly-Arg-Lys(F5)-[mPEG20K]	297
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[OH]	298
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = H	299
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = Me	300
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = Et	301
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = mPEG20k	302



ES 2 658 852 T3

<b>Agente de imagenología</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = mPEG10k	303
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = mPEG5k	304
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = dPEG24	305
[F5]Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[OH]	306
[F5]Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = H	307
[F5]Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = Me	308
[F5]Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = Et	309
[F5]Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = mPEG20k	310
[F5]Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = mPEG10k	311
[F5]Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = mPEG5k	312
[F5]Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R = dPEG24	313
[F5]Lys (COR)- His- Pro- Phe-His-Leu-Val- Ile-His-Lys(F5)- [OH]; R= Me	314
[F5]Lys (COR)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[OH]; R= CF3	315
[F5]Lys (COMe)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R= mPEG20k	316
[F5]Lys (COCF3)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHR]; R= mPEG20k	317
[RCO]Lys (F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NH2]; R= carboxietilo	318
[RCO]Lys (F5)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NH2]; R= carboxietilo	319
[RCO]Lys (F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NH2]; R= Me	320
[RCO]Lys (F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NH2]; R= mPEG5k	321
[RCO]Lys (F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NH2]; R= mPEG20k	322
[RCO]Lys (F5)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NH2]; R= Me	323
[RCO]Lys (F5)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NH2]; R= mPEG5k	324
[RCO]Lys (F5)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NH2]; R= mPEG20k	325
[F5]Orn-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	326
Orn(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	327
[F5]Orn-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = H	328

## ES 2 658 852 T3

<b>Agente de imaginología</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
[F5]Orn-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = Me	329
[F5]Orn-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG5k	330
[F5]Orn-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG20k	331
Orn(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR] R = H	332
Orn(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR] R = Me	333
Orn(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR] R = mPEG5k	334
Orn(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR] R = mPEG20k	335
[F5]Dap-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	336
Dap(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	337
[F5]Dap-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = H	338
[F5]Dap-His-Pro-Phe-His-Leu- Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = Me	339
[F5]Dap-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG5k	340
[F5]Dap-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG20k	341
Dap(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR] R = H	342
Dap(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR] R = Me	343
Dap(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR] R = mPEG5k	344
Dap(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu- Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR] R = mPEG20k	345
[F5]Ahx-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	346
Ahx(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	347
[F5]Ahx-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = H	348
[F5]Ahx-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = Me	349
[F5]Ahx-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG5k	350
[F5]Ahx-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG20k	351
Ahx(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = H	352
Ahx(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = Me	353
Ahx(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG5k	354

ES 2 658 852 T3

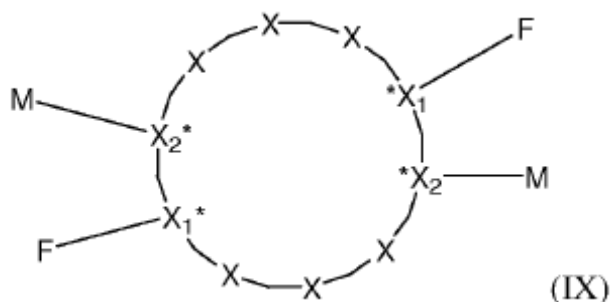
<b>Agente de imaginología</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
Ahx(F5)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG20k	355
[F5]Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	356
[F5]Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = H	357
[F5]Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = Me	358
[F5]Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG5k	359
[F5]Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG20k	360
[F5]Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	361
[F5]Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R =H	362
[F5]Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = Me	363
[F5]Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR];R = mPEG5k	364
[F5]Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG20k	365
[F5]Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	366
[F5]Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = H	367
[F5]Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = Me	368
[F5]Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG5k	369
[F5]Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG20k	370
[F5]Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	371
[F5]Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = H	372
[F5]Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = Me	373
[F5]Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG5k	374
[F5]Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG20k	375
[F5]Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Lys(F5)	376
[F5]Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Lys(F5)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg	377
[F5]Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Orn(F5)	378
[F5]Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Orn(F5)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg	379
[F5]Ser-Pro-Leu-Ala-Asn-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Lys(F5)	380

Agente de imaginología	SEQ ID NO.
[F5]Pro-Leu-Ala-Asn-Ala-Val-Lys(F5)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg	381
[F5]Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-Lys(F5)	382
[F5]Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Arg-Arg-Gln-Lys	383
[F5]Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Gln-Gln-Lys	384
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]	453
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG5k	454
[F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys(F5)[NHR]; R = mPEG20k	455
[F5]Lys(COR)-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]; R = Me	456
[F5]Lys(COR)-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys(F5)[OH]; R = CF3	457

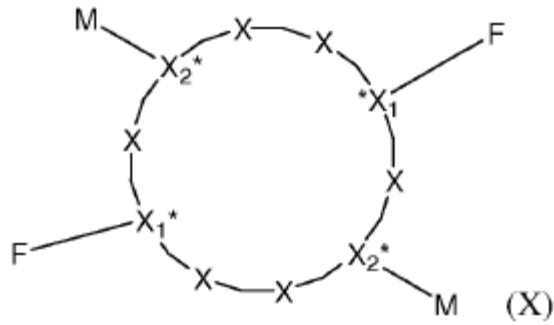
Tal como se usa en la Tabla 6, F5 es el fluoróforo que se describe antes en el agente Q77, F6 es el fluorocromo que se describe antes en el agente Q88, MPEG es metoxipolietilenglicol de un peso molecular especificado (por ejemplo, mPEG20K es un metoxipolietilenglicol de 20 kDa ). Ahx es ácido aminohexanoico, Orn es ornitina, y DAP es ácido 2,3-diaminopropionico.

La Figura 10 es una representación esquemática de un agente de imaginología cíclico ejemplo. El agente de imaginología cíclico comprende dos péptidos conectados en cada extremo a un fluoróforo. Un primer péptido tiene un primer fluoróforo unido en la proximidad de su extremo N terminal y un segundo fluoróforo unido en la proximidad de su extremo C terminal, y un segundo oligopéptido tiene el primer fluoróforo unido en la proximidad de su extremo C terminal y el segundo fluoróforo unido en la proximidad de su extremo N terminal. Cuando está intacto, el fluoróforo inactiva el otro fluoróforo y, más preferiblemente cada fluoróforo inactiva el otro fluoróforo. Sin embargo, se sobreentiende, que uno de los fluoróforos puede reemplazarse por un inactivador no fluorescente adecuado. Aunque ambos péptidos, como se muestra, contienen un sitio de escisión proteolítico, se sobreentiende que, en determinadas circunstancias, solo uno de los dos péptidos puede tener un sitio de escisión proteolítico. Tras la escisión del sitio o sitios de escisión proteolíticos, los fluoróforos ya no está impedidos mutuamente por proximidad de inactivación de la fluorescencia y los fluoróforos pueden ahora emitir fluorescencia tras la excitación después de exponerse a una luz de una longitud de onda apropiada.

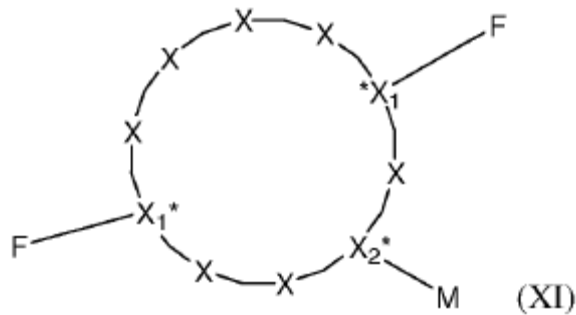
Ejemplos de agentes de imaginología pueden incluir un oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente, por ejemplo, un agente representado por la Fórmula IX, en la que, para cada aparición, X es un residuo aminoacídico, M es un modificador biológico, F es un fluoróforo o inactivador, X<sub>1</sub>\* es X-L, X<sub>2</sub>\* es X-L, y L es un resto enlazador o un enlace:



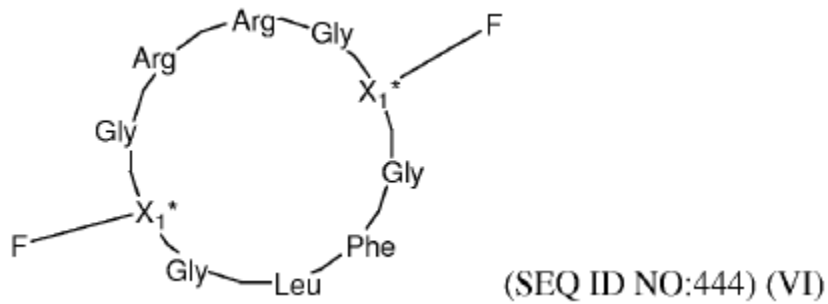
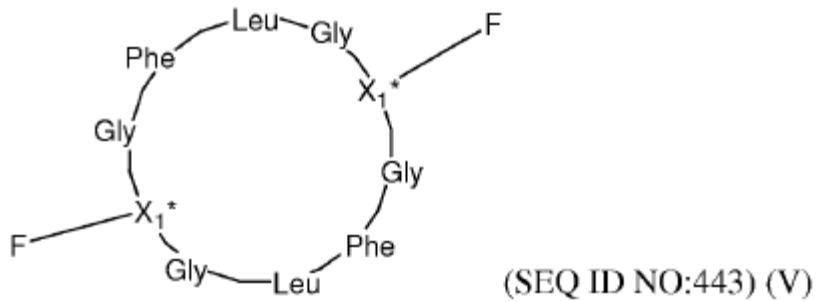
Otro oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente ejemplo está representado por la Fórmula X en la que cada uno de X, M, F, X<sub>1</sub><sup>\*</sup> y X<sub>2</sub><sup>\*</sup> es como se define para la Fórmula IX:

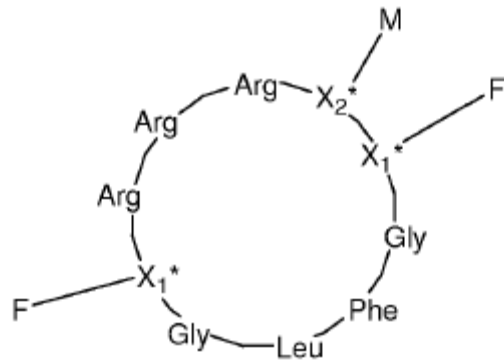


5 En otra realización, un oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente está representado por la Fórmula XI, en la que cada uno de X, M, F, X<sub>1</sub><sup>\*</sup> y X<sub>2</sub><sup>\*</sup> es como se define en la Fórmula II, anterior:

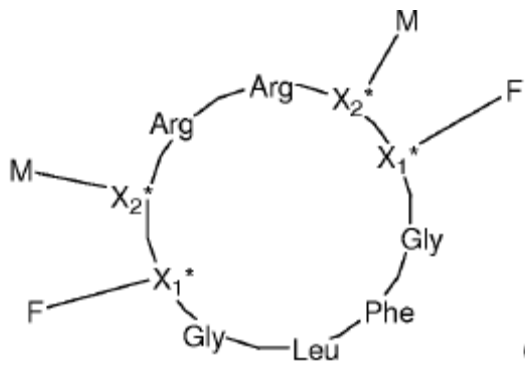


Otros oligopéptidos cíclicos escindibles enzimáticamente ejemplo están representados por las Fórmulas V, VI, y XII-XVII en las que, cada uno de F, M, X<sub>1</sub><sup>\*</sup>, y X<sub>2</sub><sup>\*</sup> es como se define en la Fórmula IX:

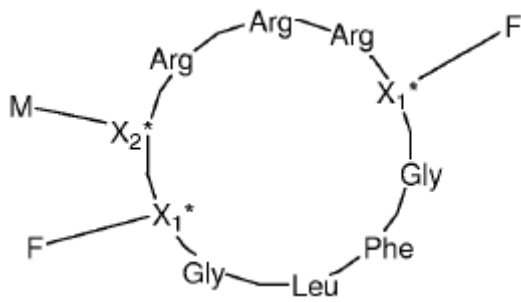




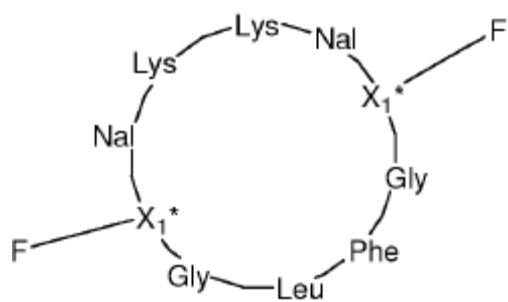
(SEQ ID NO:445) (XII)



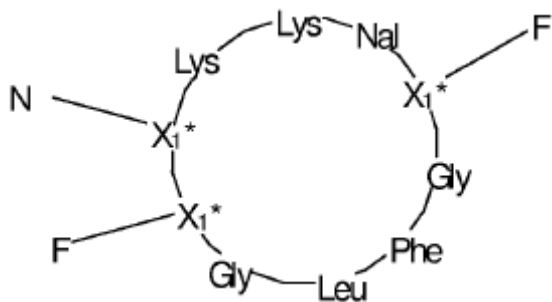
(SEQ ID NO:446) (XIII)



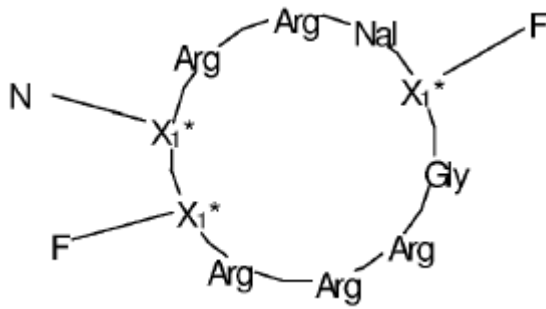
(SEQ ID NO:447) (XIV)



(SEQ ID NO:448) (XV)

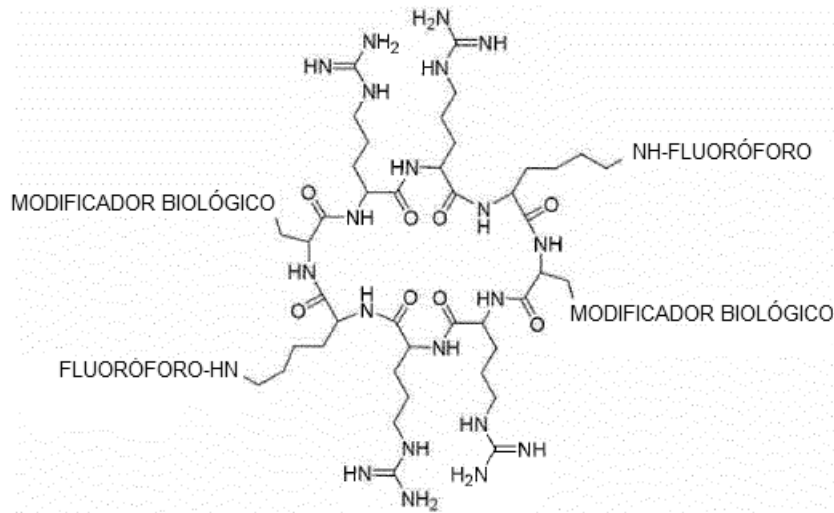


(SEQ ID NO:449) (XVI)



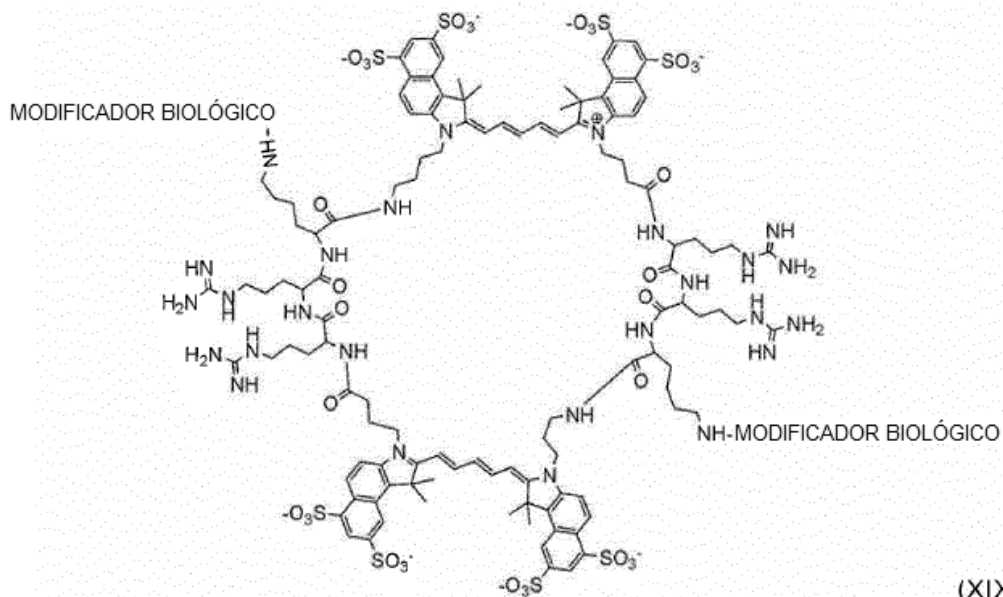
(SEQ ID NO:450) (XVII)

Un oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente está representado por la Fórmula XIII, en la que el fluoróforo y los modificadores son como se describen antes en la presente memoria:



(XIII)

- 5 En una realización ejemplo, un agente de imaginología de oligopéptido cíclico escindible enzimáticamente también puede estar representado por la Fórmula XIX en la que los modificadores biológicos son como se describen antes en la presente memoria:



(XIX)

- 10 Los agentes de imaginología resultantes tienen preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 60 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, tal como de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 40 kDa, o de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 30 kDa.

En determinadas realizaciones, el agente de imaginología puede tener un peso molecular de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 50 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 45 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 35 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 30 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 25 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 10 kDa, o tal como de aproximadamente 2 kDa a 5 kDa. En otras determinadas realizaciones, el agente de imaginología puede tener un peso molecular de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 45 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 35 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 30 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 25 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa, tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 15 kDa, o tal como de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa.

## VII. Formulaciones

Los agentes de imaginología descritos en la presente memoria pueden formularse en una composición farmacéutica adecuada para administración a un sujeto, por ejemplo, un animal y/o un ser humano. La composición farmacéutica puede incluir uno o más agentes de imaginología y uno más excipientes, por ejemplo, un estabilizador en un vehículo fisiológicamente relevante.

Para su uso *in vivo*, las composiciones de la presente invención pueden proporcionarse en una formulación adecuada para administración a un sujeto, por ejemplo, un animal o un ser humano. En consecuencia, las formulaciones incluyen los agentes junto con un vehículo fisiológicamente relevante adecuado para la forma y/o dosis de administración deseadas. La expresión, "vehículo fisiológicamente relevante" se sobreentiende que se refiere a un vehículo en el que los agentes están dispersados, disueltos, suspendidos, mezclados y fisiológicamente tolerable, es decir, puede administrarse al, en el, o sobre el cuerpo del sujeto sin malestar o irritación o toxicidad indeseadas. El vehículo preferido es un fluido, preferiblemente un líquido, más preferiblemente una solución acuosa; sin embargo, también están contemplados en el ámbito de la invención vehículos para formulaciones sólidas, formulaciones tópicas, formulaciones inhaladas, formulaciones oftálmicas y formulaciones transdérmicas.

Está contemplado que los agentes puedan administrarse por vía oral o parenteral. Para administración parenteral, los agentes pueden administrarse por vía intravenosa, intramuscular, cutánea, percutánea, subcutánea, rectal, nasal, vaginal y ocular. Así, la composición puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos sólidos, cápsulas, pastillas, polvos incluyendo polvos liofilizados, suspensiones coloidales, microesferas, granulados de liposomas, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles, incluyendo hidrogeles, ungüentos, pomadas, cremas, emplastos, soluciones para irrigación, empapamiento, dispositivos de liberación osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizadores o aerosoles. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000, ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

Se sobreentiende que la formulación de los agentes, la elección del modo de administración, las dosis de agentes administradas al sujeto y los intervalos entre administración de los agentes y la imaginología pertenece al conocimiento del experto en la técnica.

## VIII. Procedimientos de imaginología

La presente invención proporciona procedimientos para imaginología *in vitro* e *in vivo* usando los agentes de imaginología descritos en la presente memoria. Para una revisión de técnicas de imaginología óptica véase, por ejemplo, Alfano et al., Ann. NY Acad. Sci. 820:248-270 (1997); Weissleder, Nature Biotechnology 19, 316 - 317 (2001); Ntziachristos et al., Eur. Radiol. 13:195-208 (2003); Graves et al., Curr. Mol. Med. 4:419-430 (2004); Citrin et al., Expert Rev. Anticancer Ther. 4:857-864 (2004); Ntziachristos, Ann. Rev. Biomed. Eng. 8:1-33 (2006); Koo et al., Cell Oncol. 28:127-139 (2006); y Rao et al., Curr. Opin. Biotechnol. 18:17-25 (2007).

La imaginología óptica incluye todos los procedimientos de visualización directa sin uso de ningún dispositivo y el uso de dispositivos tales como diversos endoscopios, catéteres y equipo de imaginología óptica, por ejemplo, hardware basado en ordenador para presentaciones tomográficas. Los agentes de imaginología son útiles con modalidades de imaginología óptica y técnicas de medida que incluyen, aunque sin quedar limitadas a: endoscopia; endoscopia por fluorescencia; imaginología por luminiscencia; imaginología por transmitancia resuelta en el tiempo; imaginología por transmitancia; microscopía no lineal; imaginología confocal; imaginología acusto-óptica; imaginología fotoacústica; espectroscopía por reflectancia; espectroscopía; interferometría de coherencia; interferometría; tomografía de coherencia óptica; tomografía óptica difusa y tomografía molecular mediada por fluorescencia (onda continua, sistemas de dominio de la frecuencia y dominio del tiempo y fotones tempranos) y medida de la dispersión de luz, absorción, polarización, luminiscencia, tiempo de vida de la fluorescencia, rendimiento cuántico e inactivación.

Un sistema de imaginología útil en la práctica de la invención incluye típicamente tres componentes básicos: (1) una



fente lumínica apropiada para inducir excitación del agente de imaginología, (2) un sistema para separar o distinguir emisiones de luz usadas para la excitación de fluoróforos, y (3) un sistema de detección. El sistema de detección puede ser manual o estar incorporado en otros dispositivos de imaginología, tales como microscopios intraoperatorios. Sistemas de detección ejemplo incluyen un endoscopio, catéter, sistema de tomografía, sistema de imaginología manual y microscopio intraoperatorio.

Preferiblemente, la fuente lumínica proporciona luz monocromática (o sustancialmente monocromática). La fuente lumínica puede ser una luz blanca adecuadamente filtrada, es decir, luz paso banda de una fuente de banda ancha. Por ejemplo, luz de una bombilla halógena de 150 vatios puede pasar a través de un filtro paso banda adecuado disponible comercialmente de Omega Optical (Brattleboro, VT). Dependiendo del sistema, la fuente lumínica puede ser un láser. Véase, por ejemplo, Boas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4887-4891, 1994; Ntziachristos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2767-2772, 2000; y Alexander, J. Clin. Laser Med. Surg. 9:416-418, 1991. Puede encontrarse información de láseres para imaginología, por ejemplo, en Imaging Diagnostic Systems, Inc., Plantation, FL y en otras fuentes. Puede usarse un filtro de paso alto o de paso banda para separar emisiones ópticas de la luz de excitación. Un filtro de paso alto o de paso banda adecuado está disponible de Omega Optical, Burlington, VT.

En general, el sistema de detección lumínico puede visualizarse al incluir un componente de captación de luz/formación de imágenes y un componente de detección de luz/señal/lectura de imagen. Aunque el sistema de detección lumínico puede ser un dispositivo sencillo integrado que incorpore ambos componentes, el componente de captación de luz/formación de imágenes y el componente de detección de luz/lectura de imágenes se describen por separado.

Un componente de captación de luz/formación de imágenes particularmente útil es un endoscopio. Dispositivos y técnicas endoscópicas que se han usado para la imaginología óptica *in vivo* de numerosos tejidos y órganos, incluyendo el peritoneo (Gahlen et al., J. Photochem. Photobiol. B 52:131-135, 1999), cáncer de ovario (Major et al., Gynecol. Oncol. 66:122-132, 1997), colon y recto (Mycek et al., Gastrointest. Endosc. 48:390-394, 1998; y Stepp et al., Endoscopy 30:379-386, 1998), conductos biliares (Izuishi et al., Hepatogastroenterology 46:804-807, 1999), estómago (Abe et al., Endoscopy 32:281-286, 2000), vejiga (Kriegmair et al., Urol. Int. 63:27-31, 1999; y Riedl et al., J. Endourol. 13:755-759, 1999), pulmón (Hirsch et al., Clin Cancer Res 7:5-220, 2001), cerebro (Ward, J. Laser Appl. 10:224-228, 1998), esófago y regiones de la cabeza y cuello pueden emplearse en la práctica de la presente invención.

Otros tipos de componentes para captación de luz son dispositivos basados en catéteres, incluyendo dispositivos de fibra óptica. Tales dispositivos son particularmente adecuados para imaginología intravascular. Véase, por ejemplo, Tearney et al., Science 276:2037-2039, 1997; y Circulation 94:3013, 1996.

Otras tecnologías para imaginología, incluyendo la tecnología Phased array (Boas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4887-4891, 1994; Chance, Ann. NY Acad. Sci. 838:29-45, 1998), tomografía óptica (Cheng et al., Optics Express 3:118-123, 1998; y Siegel et al., Optics Express 4:287-298, 1999), microscopia intravital (Dellian et al., Br. J. Cancer 82:1513-1518, 2000; Monsky et al., Cancer Res. 59:4129-4135, 1999; y Fukumura et al., Cell 94:715-725, 1998), imaginología confocal (Korlach et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8461-8466, 1999; Rajadhyaksha et al., J. Invest. Dermatol. 104:946-952, 1995; y Gonzalez et al., J. Med. 30:337-356, 1999) y tomografía molecular de fluorescencia (FMT) (Ntziachristos et al., Nature Medicine 8:757-760, 2002; patente de Estados Unidos n.º 6,615,063, documentos PCT WO 03/102558 y PCT WO 03/079015) pueden usarse con los agentes de imaginología de la invención. De igual forma, los agentes de imaginología pueden usarse en una diversidad de sistemas de imaginología, por ejemplo, (1) los Sistemas de Imaginología IVIS®: Serie 100, Serie 200 (Xenogen, Alameda, CA), (2) SPECTRUM y LUMINA (Xenogen, Alameda, CA), (3) el SoftScan® o el explore Optix™ (GE Healthcare, Reino Unido), (4) Sistemas Maestro™ y Nuance™-2 (CRi, Woburn, MA), (5) Image Station In-Vivo FX de Carestream Molecular Imaging, Rochester, NY (antiguamente Kodak Molecular Imaging Systems), (6) OV100, IV 100 (Olympus Corporation, Japón), (7) Cellvizio Mauna Kea Technologies, Francia), (8) NanoSPECT/CT o HiSPECT (Bioscan, Washington, DC), (9) CTLM®o LILA™ (Imaging Diagnostic Systems, Plantation, FL), (10) DYNOT™ (NIRx Medical Technologies, Glen Head, NY) y (11) NightOWL Imaging Systems de Berthold Technologies, Alemania.

En tales sistemas pueden usarse una diversidad de componentes de detección de luz/registro de imágenes, por ejemplo, sistemas de dispositivo acoplado a carga (CCD) o película fotográfica. La elección de la detección de luz/registro de imágenes depende de factores que incluyen el tipo de componente de captación de luz/formación de imagen que se use. Se sobreentiende, sin embargo, que la selección de componentes adecuados, el ensamblaje de los mismos en un sistema de tratamiento óptico y el funcionamiento del sistema está habitualmente dentro de los conocimientos de un experto medio en la técnica.

Para agentes que tienen propiedades magnéticas, también puede aplicarse en la práctica de la invención la imaginología de IRM, bien conocida en la técnica. Para una revisión de técnicas de IRM véase Westbrook, Handbook of MRI Technique, 2ª Edición, 1999, Blackwell Science. Es posible que las imágenes obtenidas, por ejemplo, por imaginología óptica o por imaginología por resonancia magnética puedan registrarse juntas o fusionarse entre sí para proporcionar información adicional acerca del objeto que se está visualizando. Además, para crear imágenes de RM ópticas combinadas pueden usarse sistemas de imaginología multimodalidad (es decir, sistemas combinados de imaginología óptica y de RM).

Además, las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden usarse para otras composiciones y procedimientos de imaginología. Por ejemplo, los agentes de la presente invención pueden visualizarse por otras modalidades de imaginología, tales como rayos X, tomografía computarizada (CT), imaginología por RM, ultrasonidos, tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada monofotónica (SPECT).

- 5 Además, las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden usarse en combinación con otras composiciones y procedimientos. Por ejemplo, los agentes de la presente invención pueden visualizarse por otros protocolos de imaginología óptica bien solos o en combinación con otras modalidades de imaginología tradicionales, tales como rayos X, tomografía computarizada (CT), imaginología por RM, ultrasonidos, tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada monofotónica (SPECT). Por ejemplo, las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden usarse en combinación con TC e IRM para obtener simultáneamente información anatómica y molecular, por ejemplo, registrando al mismo tiempo una imagen generada por otra modalidad de imaginología. Las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden usarse en combinación con rayos X, TC, PET, ultrasonidos, SPECT y otros agentes de contraste ópticos y para RM o, de forma alternativa, los agentes de la presente invención pueden incluir también agentes de imaginología, tales como átomos de yodo, gadolinio e isótopos radiactivos, que pueden detectarse usando modalidades de imaginología como TC, PET, SPECT y MR en combinación con imaginología óptica. Los agentes de imaginología pueden estar unidos o incorporados a los agentes.

**(A) Imaginología *in vivo***

- 20 En lo que se refiere a la imaginología óptica *in vivo*, dicho procedimiento comprende (a) administrar a un sujeto uno o más agentes de imaginología; (b) dejar que el agente o agentes se distribuyan por el sujeto; (c) exponer el sujeto a luz de una longitud de onda absorbible por al menos un fluoróforo en el agente de imaginología; y (d) detectar una señal óptica emitida por el fluoróforo. La señal óptica emitida puede usarse para construir una imagen. La imagen puede ser una imagen tomográfica. Además, se sobreentiende que las etapas (a)-(d) o las etapas (c)-(d) pueden repetirse en intervalos predeterminados, permitiendo de este modo la evaluación del sujeto en el tiempo.

- 25 Las etapas de iluminación y/o detección (etapas (c) y (d), respectivamente) pueden llevarse a cabo usando un endoscopio, catéter, sistema de tomografía, sistema planar, sistema de imaginología manual, gafas o un sistema de imaginología intraoperatorio o microscopio.

- Antes o durante estas etapas, puede posicionarse un sistema de detección alrededor de, o en las proximidades de un sujeto (por ejemplo, un animal o un ser humano) para detectar señales emitidas desde el sujeto. Las señales emitidas pueden procesarse para construir una imagen, por ejemplo, una imagen tomográfica. Además, las señales procesadas pueden mostrarse como imágenes solas o como imágenes fusionadas (combinadas).

- 35 Además, es posible llevar a la práctica un procedimiento de imaginología *in vivo* que detecte de forma selectiva y permita visualizar una o más sondas de imaginología molecular, incluyendo los agentes de imaginología simultáneamente. En dicha técnica, por ejemplo, en la etapa (a) indicada antes, se administran al sujeto, bien al mismo tiempo o de forma secuencial, dos o más sondas de imaginología cuyas propiedades de señal son distinguibles entre sí, donde al menos una de las sondas de imaginología molecular es un agente. El uso de varias sondas permite registrar varios procesos biológicos, funciones o dianas.

- 40 El sujeto puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano. El sujeto puede también ser un no vertebrado (por ejemplo, *C. elegans*, *Drosophila*, u otro organismo de investigación modelo, etc.) usado en investigación de laboratorio.

- 45 La información proporcionada por dichas técnicas de imaginología *in vivo*, por ejemplo, la presencia, ausencia, o nivel de señal emitida puede usarse para detectar y/o monitorizar una enfermedad en el sujeto. Enfermedades ejemplo incluyen, sin limitación, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad ósea, cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedad ambiental, enfermedad dermatológica, enfermedad inmunológica, enfermedad hereditaria, enfermedad infecciosa, enfermedad metabólica, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad oftálmica y enfermedad respiratoria. Además, la imaginología *in vivo* puede usarse para valorar el efecto de un compuesto o terapia usando los agentes de imaginología, donde el sujeto se visualiza antes de, o después del tratamiento con el compuesto o terapia, y se comparan las correspondientes señales/imágenes.

- 50 La invención también presenta un procedimiento de imaginología *in vivo* en el que se administran células marcadas al receptor. Las células pueden marcarse con los agentes de imaginología *ex vivo*. Las células pueden derivar directamente de un sujeto o de otra fuente (por ejemplo, de otro sujeto, cultivo celular, etc.). Los agentes de imaginología pueden mezclarse con las células para marcar de forma eficaz las células y las células marcadas resultantes administrarse al sujeto en un sujeto en la etapa (a). Las etapas (b)-(d) siguientes son seguidas como se ha descrito antes. Este procedimiento puede usarse para monitorizar el tráfico y localización de determinados tipos de células, incluyendo linfocitos T, células tumorales, células inmunitarias y células madre, y otros tipos de células. En particular, este procedimiento puede usarse para monitorizar terapias basadas en células.

- 55 Los procedimientos de la invención pueden usarse para determinar una serie de indicios, incluyendo el seguimiento de la localización del agente en el sujeto en el tiempo o valorar cambios o alteraciones en el metabolismo y/o

excreción del agente en el sujeto en el tiempo. Los procedimientos también pueden usarse para seguir la terapia para tales enfermedades por eventos moleculares de imaginología y rutas biológicas moduladas por dicha terapia, incluyendo, aunque sin quedar limitadas a las mismas, determinar la eficacia, tiempos óptimos, niveles de dosificación óptimos (incluyendo para pacientes individuales y sujetos bajo ensayo), y efectos sinérgicos de combinaciones de terapia.

Los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria pueden usarse para ayudar al médico o cirujano a identificar y caracterizar áreas de enfermedad, tales como artritis, cánceres y pólipos de colon específicamente, o placas vulnerables o inestables, aterosclerosis, para distinguir tejido enfermo de tejido normal, por ejemplo, en cirugía del cerebro, para ayudar a dictar una intervención terapéutica o quirúrgica, por ejemplo, determinando si una lesión es cancerosa y se deberá extirpar o no cancerosa y dejar, o en estadificar quirúrgicamente una enfermedad, por ejemplo, estadificación intraoperatoria de ganglio linfático, mapeo de ganglio linfático centinela, o valoración de hemorragia intraoperatoria.

Los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria también pueden usarse en la detección, caracterización y/o determinación de la localización de una enfermedad, en especial enfermedad temprana, la gravedad de una enfermedad o un estado patológico asociado con una enfermedad, la estadificación de una enfermedad y/o controlar una enfermedad. La presencia, ausencia o nivel de una señal emitida puede ser indicativa de un estado de enfermedad.

Los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria también pueden usarse para monitorizar y/o guiar diversas intervenciones terapéuticas, tales como procedimientos quirúrgicos y monitorizar una terapia con fármaco, incluyendo terapias basadas en células. Los procedimientos pueden usarse también en el pronóstico de una enfermedad o estado patológico de una enfermedad.

Con respecto a cada uno de los anteriores, ejemplos de tales enfermedades o estados patológicos de enfermedad que pueden detectarse o monitorizarse (antes, durante o después de la terapia) incluyen inflamación (por ejemplo, inflamación causada por artritis, por ejemplo, artritis reumatoide), cáncer (por ejemplo, colorectal, de ovario, pulmón, mama, próstata, cervical, testicular, de piel, de cerebro, gastrointestinal, pancreático, de hígado, riñón, vejiga, estómago, leucemia, de boca, esofágico, de hueso), enfermedad cardiovascular (por ejemplo, aterosclerosis y estados patológicos inflamatorios de los vasos sanguíneos, isquemia, hipertensión, apoplejía, coagulación intravascular diseminada), enfermedad dermatológica (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, psoriasis, dermatitis alérgica), enfermedad oftálmica (por ejemplo, degeneración macular, retinopatía diabética), enfermedad infecciosa (por ejemplo, infección bacteriana, vírica, fúngica y parásita, incluyendo síndrome de inmunodeficiencia adquirida, malaria, enfermedad de Chagas, esquistosomiasis), enfermedad inmunológica (por ejemplo, un trastorno autoinmunitario, linfoma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes mellitus, lupus eritematoso, miastenia grave, enfermedad de Graves), enfermedad del sistema nervioso central (por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa tal como enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de priones), enfermedades hereditarias, enfermedades metabólicas, enfermedades ambientales (por ejemplo, envenenamiento por plomo, mercurio o radiactivo, cáncer de piel), enfermedad relacionada con los huesos (por ejemplo, osteoporosis, tumores óseos primarios y metastásicos, osteoartritis), enfermedad neurodegenerativa y complicaciones relacionadas con la cirugía (tales como rechazo de injerto, rechazo de órgano, alteraciones en la cicatrización de heridas, fibrosis u otras complicaciones relacionadas con los implantes quirúrgicos).

Los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria, por tanto, pueden usarse, por ejemplo, para determinar la presencia y/o localización de células tumorales, la presencia y/o localización de inflamación, incluyendo la presencia de macrófagos activados, por ejemplo, en aterosclerosis o artritis, la presencia y localización de enfermedad vascular incluyendo áreas con riesgo de oclusión aguda (es decir, placas vulnerables) en arterias coronarias y periféricas, regiones de aneurismas en expansión, placa inestable en arterias carótidas y áreas isquémicas. Los procedimientos y composiciones de la invención también pueden usarse en la identificación y evaluación de muerte celular, lesiones, apoptosis, necrosis, hipoxia y angiogénesis. Los procedimientos y composiciones de la invención también pueden usarse para liberar fármacos y monitorizar la liberación de fármacos, en especial, cuando los fármacos o moléculas tipo fármaco están químicamente unidos a los agentes de imaginología.

### **(B) Procedimientos *in vitro***

En lo que se refiere a la imaginología *in vitro*, los agentes de imaginología pueden usarse en una diversidad de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, un procedimiento de imaginología *in vitro* ejemplo comprende: (a) poner en contacto una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, con uno o más agentes de imaginología de la invención; (b) dejar que el agente o agentes interaccionen con una diana biológica en la muestra; (c) opcionalmente, retirar los agentes no unidos; (d) en el caso de agentes fluorescentes, iluminar la muestra con luz de una longitud de onda absorbible por un fluoróforo de los agentes; y (e) detectar una señal emitida desde el fluoróforo para determinar de este modo si el agente ha sido activado por, o se ha unido a la diana biológica.

Después de que un agente se ha diseñado, sintetizado y opcionalmente formulado, este puede ensayarse *in vitro*

- 5 por un experto en la técnica para valorar sus características biológicas y de comportamiento. Por ejemplo, pueden usarse diferentes tipos de células reproducidas en cultivo para valorar las características biológicas y de comportamiento del agente. La captación celular, unión o localización celular del agente puede valorarse usando técnicas conocidas incluyendo, por ejemplo, microscopía de fluorescencia, análisis FACS, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, hibridación in situ y transferencia de energía de resonancia de Forster (FRET) o transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. A modo de ejemplo, los agentes pueden ponerse en contacto con una muestra durante un período de tiempo y luego lavarse para eliminar los agentes libres. La muestra puede visualizarse a continuación usando un dispositivo de detección apropiado tal como un microscopio de fluorescencia equipado con filtros apropiados acordes con las propiedades ópticas de un agente fluorescente. La microscopía de fluorescencia de células en cultivo o recuento por centelleo también es un medio conveniente para determinar si se ha producido captación y unión. También pueden usarse tejidos, secciones de tejido y otros tipos de muestras tal como muestras con Cytospin de una forma similar para valorar las características biológicas y de comportamiento de los agentes. También pueden usarse otros procedimientos de detección incluyendo, aunque sin quedar limitados a los mismos, citometría de flujo, inmunoensayos, ensayos de hibridación y análisis de Microarray.
- 10
- 15 La invención se ilustrará ahora por los siguientes ejemplos, que se aportan con el único propósito de ilustrar y sin ninguna intención de limitar el ámbito de la presente invención.

### Ejemplos

- A continuación se describen materiales y procedimientos representativos que pueden usarse en la preparación de materiales de la invención. Todos los productos químicos y disolventes (calidad reactivo) se usaron tal como se obtuvieron comercialmente sin purificación adicional. Análisis HPLC: Se llevó a cabo una HPLC de fase inversa analítica en un sistema Waters 2695 usando una columna Phenomenex Fenil-Hexil (3 $\mu$ , 100 x 4,6 mm) o columna C18 (5 $\mu$ , 50 x 4,6 mm) con un caudal de 1 a 2 ml/min. Los cromatogramas se monitorizaron a 254 nm y 675 nm. La HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema Varian usando una columna Phenomenex Fenil-Hexil o una columna Phenomenex C18 (250 x 10 mm) a 4,7 ml/min usando un gradiente similar al de la analítica.
- 20

### 25 Ejemplo 1: Síntesis de la forma éster succinimidilo de péptidos conjugados con fluoróforo

Los agentes de imaginología mostrados en la Tabla 7 se prepararon de acuerdo con los principios descritos en este Ejemplo.

**Tabla 7**

Agente de imaginología	SEQ ID NO.
Acetil-Phe-Arg-Lys(F5)-Gly-Gly-Arg-Lys(F5)-OH	385
Acetil-Phe-Gly-Lys(F5)-Arg-Arg-Lys(F5)-Gly-OH	386
F5-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F5)-OH	387
Acetil-Phe-Arg-Lys(F5)-Gly-G-Arg-Lys(F5)-[OH]	388
pentinoil-Phe-Arg-Lys(F5)-Gly-Gly-Arg-Lys(F5)-[OH]	389
pentinoil-Phe-Gly-Lys(F5)-Arg-Arg-Lys(F5)-[OH]	390
pentinoil-Lys(F5)-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F5)-[OH]	391
pentinoil-Lys(F5)-Gly-Phe-Leu-Gly- $\beta$ A-Lys(F5)-[OH]	392
pentinoil-Lys(F5)-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys(F5)-[OH]	393
pentinoil-Lys(F5)-Gly-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Gly-Lys(F5)-[OH]	394
pentinoil-Lys(F5)-His-Pro-Gly-Gly-Pro-Gln-Lys(F5)-[OH]	395
[F5]-His-Gly-Pro-Arg-Lys(F5)-[OH]	242

Agente de imaginología	SEQ ID NO.
[F5]-Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NH <sub>2</sub> ]	396
[F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-[OH]	240
[F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-His-Gly-Pro-Asn-βA-[OH]	243
[F5]-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Tyr-His-Lys(F5)-[OH]	397
[F5]-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Lys(F5)-[OH]	398
Acetil-Lys(F5)-Lys-Lys-Lys(F5)-Gly-[OH]	399
Acetil-Lys(F5)-Lys-Lys-Lys(F5)-Lys-Lys-Gly-[OH]	400
[F5]-Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[OH]	401
Succinil-Lys(F5)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F5)-[NH <sub>2</sub> ]	402
Succinil-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	403
Succinil-Lys(F5)-Arg-Arg-Lys(F5)-[NH <sub>2</sub> ]	404
Succinil-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	405
Succinil-Lys(F6)-Ala-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	406
Succinil-Lys(F5)-Lys-Lys-Lys(F5)-[NH <sub>2</sub> ]	407
Succinil-Lys(F6)-Arg-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH <sub>2</sub> ]	408
[F5]-His-Gly-Pro-Ile-Lys-[OH]	409
[F5]-Asn-Gly-Pro-Ile-Lys-[OH]	410
[F6]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F6)-[OH]	411
[F5]-Gly-Val-Arg-Leu-Gly-Pro-Lys(F5)-[OH]	412
[F5]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F5)-[OH]	413
[F6]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F6)-[OH]	414

en la que F5 era el fluoróforo descrito en el agente de imaginología de Fórmula Q77, y F6 era el fluoróforo descrito en el agente de imaginología de Fórmula Q88.

#### Parte A. Preparación del péptido conjugado con fluoróforo

- 5 Se combinaron péptido individual (como se muestra en la Tabla 7; 0,45 μmol) y fluoróforo número 3 de la Tabla 2 (1,0 μmol) en 100 μl de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1 μl de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 μl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC usando un gradiente de 10% a 35% de acetronitrilo en acetato de trietilamonio 25 mM, pH 7, en una columna C18 de 10 mm X 250 mm 300 Å. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.
- 10

**Parte B. Preparación del éster succinimidilo del péptido marcado en el extremo C terminal**

El péptido marcado con fluoróforo (0,25  $\mu\text{mol}$ ) se disolvió en 50  $\mu\text{l}$  de DMF que contenía 0,5 mg de carbonato de disuccinimidilo (DSC) y 0,5  $\mu\text{l}$  de NMM. La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 4 horas. El éster succinimidilo del péptido se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante y se secó rápidamente a vacío.

**Ejemplo 2: Síntesis del péptido conjugado con mPEG-5kDa**

Se disolvió metoxipolietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, peso molecular 5 kDa, 2,5 mg, 0,50  $\mu\text{mol}$ ) en 100  $\mu\text{l}$  de DMF y 1  $\mu\text{l}$  de NMM. La solución se añadió a 0,25  $\mu\text{mol}$  del éster succinimidilo del péptido marcado (del Ejemplo 1) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu\text{l}$  de agua y se purificó por HPLC en una columna C18 de 10 mm X 250 mm 300 Å. El péptido pegilado se caracterizó por HPLC RP-18 (HPLC de fase inversa-18) y HPLC SEC (HPLC Cromatografía de Exclusión Molecular).

**Ejemplo 3: Síntesis del péptido conjugado con mPEG-20kDa**

Se disolvió metoxipolietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, peso molecular 20 kDa, 10 mg, 0,50  $\mu\text{mol}$ ) en 100  $\mu\text{l}$  de DMF y 1  $\mu\text{l}$  de NMM. La solución se añadió a 0,25  $\mu\text{mol}$  del éster succinimidilo del péptido marcado (del Ejemplo 1) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu\text{l}$  de agua y se purificó por HPLC en una columna C18 de 10 mm X 250 mm 300 Å. El péptido pegilado se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**Ejemplo 4: Síntesis del péptido conjugado con mPEG-30kDa**

Se disolvió metoxipolietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, peso molecular 30 kDa, 15 mg, 0,50  $\mu\text{mol}$ ) en 100  $\mu\text{l}$  de DMF y 1  $\mu\text{l}$  de NMM. La solución se añadió a 0,25  $\mu\text{mol}$  del éster succinimidilo del péptido marcado (del Ejemplo 1) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu\text{l}$  de agua y se purificó por HPLC en una columna C18 de 10 mm X 250 mm 300 Å. El péptido pegilado se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**Ejemplo 5: Síntesis de péptido conjugado con poli-L-lisina pegilada**

El éster succinimidilo del péptido (0,25  $\mu\text{mol}$ ) del Ejemplo 1, se disolvió en 50  $\mu\text{l}$  de DMSO y se añadió a una solución que contenía poli-L-lisina pegilada aproximadamente 400.000-500.000 Da (0,17  $\mu\text{mol}$ ) en 1,5 ml de tampón HEPES, pH 7. La solución se hizo girar a temperatura ambiente durante 4 horas, luego se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de anhídrido acético y 1,0 ml de tampón carbonato/bicarbonato, pH 9 y la rotación continuó durante 2 horas. El péptido conjugado con polímero se purificó del péptido sin reaccionar por exclusión molecular usando gel P-100 (BioRad) y elución con 1xPBS. La pureza del producto se valoró por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**Ejemplo 6: Síntesis de péptido conjugado con poli-D-lisina pegilada**

El éster succinimidilo del péptido (0,25  $\mu\text{mol}$ ) del Ejemplo 1, se disuelve en 50  $\mu\text{l}$  de DMSO y se añade a una solución que contenía poli-L-lisina pegilada aproximadamente 300.000-500.000 Da (0,17  $\mu\text{mol}$ ) en 1,5 ml de tampón HEPES, pH 7. La solución se hace girar a temperatura ambiente durante 4 horas, luego se añaden 20  $\mu\text{l}$  de anhídrido acético y 1,0 ml de tampón carbonato/bicarbonato, pH 9 y la rotación continuó durante 2 horas. El péptido conjugado con polímero se purifica del péptido sin reaccionar por exclusión molecular usando gel P-100 (BioRad) y eluye con 1xPBS. La pureza del producto se valoró por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**Ejemplo 7: Síntesis de un conjugado de péptido con PEG ramificado**

Se disolvió metoxipolietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, peso molecular 20 kDa, 100 mg, 5,0  $\mu\text{mol}$ ) en 1000  $\mu\text{l}$  de DMF. La solución se añadió a 175  $\mu\text{l}$  de DMF que contenía ácido N-fmoc glutámico (0,9 mg, 2,5  $\mu\text{mol}$ ) y hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio (HATU, 1,9 mg, 5  $\mu\text{mol}$ ) seguido de adición de 2,1  $\mu\text{l}$  (12  $\mu\text{mol}$ ) de diisopropilamina. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, y el producto resultante se precipitó por adición de 10 ml de metil terc-butil éter. El disolvente se decantó y el PEG ramificado se purificó por HPLC en una columna C18 de 21 mm X 250 mm 300 Å.

El grupo fmoc del producto purificado se desprotegió con dietilamina al 20% v/v en DMF durante 30 minutos, seguido de precipitación con metil terc-butil éter para proporcionar el PEG funcionalizado con la amina. El PEG ramificado funcionalizado con amina (15 mg, 0,50  $\mu\text{mol}$ ) se disolvió en 100  $\mu\text{l}$  de DMF y 1  $\mu\text{l}$  de NMM. La solución se añadió a 0,25  $\mu\text{mol}$  del péptido marcado (del Ejemplo 1) junto con hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)

carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3  $\mu$ mol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5  $\mu$ mol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 h. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu$ l de agua y se purificó por HPLC usando un gradiente de 10% a 85% de acetonitrilo en bicarbonato de trietilamonio 25 mM, pH 8,5, en una columna C18 de 21 mm X 250 mm 300 Å. El péptido conjugado con PEG ramificado se purificó adicionalmente por cromatografía de intercambio aniónico fuerte. El péptido conjugado con PEG ramificado se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

#### Ejemplo 8: Síntesis de un péptido conjugado con polivinilpirrolidona

Se disolvió polivinilpirrolidona funcionalizada con carboxi (6 kDa, Polimersource, 20 mg, 3,3  $\mu$ mol) en 200  $\mu$ l de DMF con carbonato de disuccinimidilo (5 mg, 20  $\mu$ mol) y DMAP (0,5 mg, 5  $\mu$ mol) y se hizo girar a temperatura ambiente durante 4 horas. La polivinilpirrolidona funcionalizada con éster succinimidilo se precipitó con 1,5 ml de acetato de etilo.

El péptido marcado del Ejemplo 1A anterior (0,75  $\mu$ mol) junto con hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 2,5 mg, 13  $\mu$ mol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 2,5 mg, 19  $\mu$ mol) se disolvieron en 750  $\mu$ l de tampón MES 0,1 M, pH 6. A la solución se añadieron 200  $\mu$ l de hidrocloreuro de etilendiamina 1 M en tampón HEPES 1 M, pH 7 y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido funcionalizado con amina se purificó por HPLC.

El péptido funcionalizado con amina (0,5  $\mu$ mol) descrito en el párrafo anterior se disolvió en 200  $\mu$ l de DMF que contenía 20 mg de la polivinilpirrolidona funcionalizada con éster succinimidilo descrita antes junto con DMAP (0,5 mg, 5  $\mu$ mol). La solución se hizo girar a TA durante 24 horas. El péptido conjugado con polivinilpirrolidona se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE y se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu$ l de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con polivinilpirrolidona se purificó seguidamente por cromatografía de intercambio aniónico fuerte. El péptido conjugado con polivinilpirrolidona se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

#### Ejemplo 9: Síntesis de péptido conjugado con aminodextrano

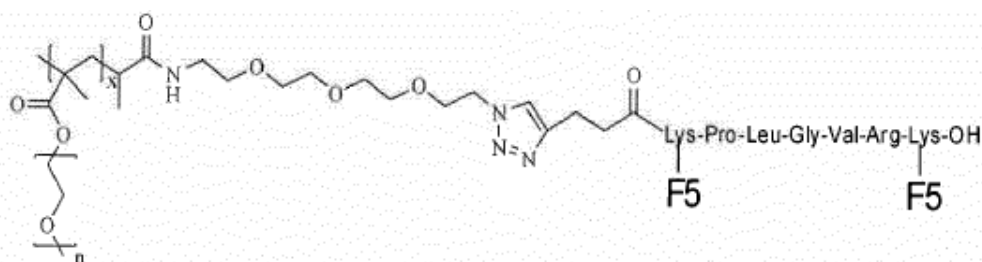
Se disolvió aminodextrano (Invitrogen, peso molecular 10 kDa, 19 mg, 1,9  $\mu$ mol) en 150  $\mu$ l de MES 0,1 mM pH 6. La solución se añadió a 0,75  $\mu$ mol del péptido marcado (del Ejemplo 1) junto con hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 2 mg, 10  $\mu$ mol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 2 mg, 15  $\mu$ mol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido conjugado con aminodextrano se purificó por HPLC. El péptido conjugado con aminodextrano se purificó seguidamente por cromatografía de exclusión molecular usando Biogel P10 (Biorad) y eluyendo con 1XPBS. El péptido conjugado con aminodextrano se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

#### Ejemplo 10: Síntesis de un péptido conjugado con nanopartículas de óxido de hierro

Se combinó una solución de nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con amina (16 mg total de hierro) en 8 ml de MES 0,1 mM pH 6 con 0,5  $\mu$ mol del péptido marcado (del Ejemplo 1A anterior) junto con hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 5 mg, 25  $\mu$ mol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 5 mg, 38  $\mu$ mol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido conjugado con nanopartículas de óxido de hierro se purificó por cromatografía de exclusión molecular usando Biogel P100 (Biorad) y eluyendo con 1XPBS. El péptido conjugado con aminodextrano se caracterizó por HPLC SEC.

#### Ejemplo 11: Síntesis de un agente de imaginología ejemplo

Este ejemplo describe la síntesis de un agente de imaginología ejemplo denotado por la Fórmula XXII.



(XXII)

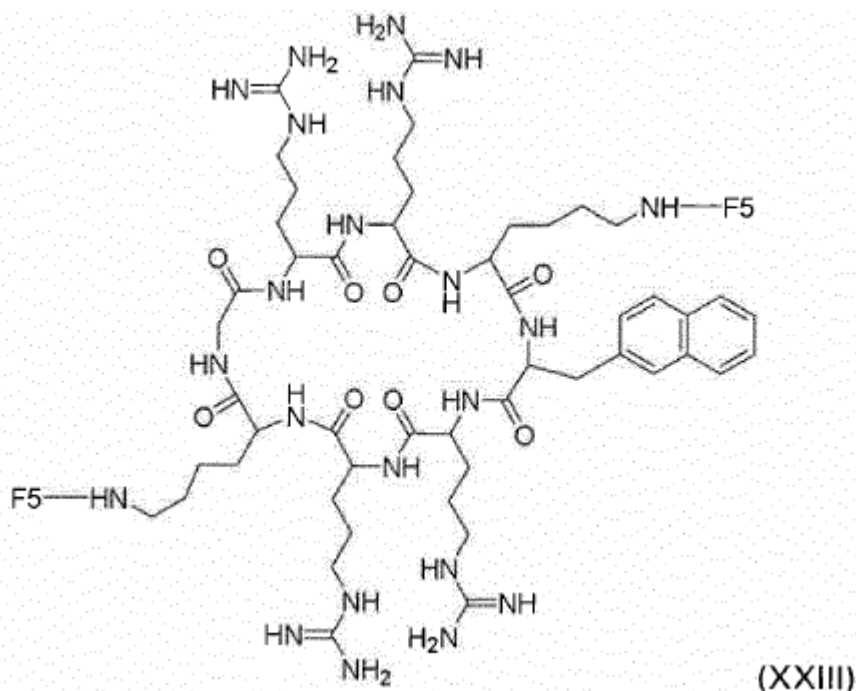
El péptido modificado con alquino, marcado con fluoróforo Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys (SEQ ID NO:415) (400  $\mu$ mol) se combinó con la azida 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amina (azido-PEG-amina, n=3) en 200  $\mu$ l de cloruro de trietilamonio 65 mM, fosfato de sodio 25 mM, pH 5 al que se añadieron 0,2 mg de polvo de cobre nanométrico. La

mezcla se hizo girar a temperatura ambiente durante 1 hora, se filtró y se purificó por HPLC en una columna C18 de 10 mm X 250 mm 300 Å. El péptido purificado se caracterizó por EM MALDI (calculado 3135,05, encontrado 3135,13).

5 El péptido funcionalizado con amina resultante (0,16  $\mu\text{mol}$ ) se disolvió en 200  $\mu\text{l}$  de DMSO con 0,35  $\mu\text{mol}$  de poliPEG NHS éster (Warwick Effect Polymers) y 0,2  $\mu\text{l}$  de diisopropiletilamina. La solución se hizo girar a TA durante 24 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu\text{l}$  de agua y se purificó por HPLC en una columna C18 de 10 mm X 250 mm 300 Å. El péptido pegilado se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

#### 10 Ejemplo 12: Agente de imaginología de péptido cíclico

Este ejemplo describe la síntesis del agente de imaginología cíclico representado por la Fórmula XXIII.



15 El péptido Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Lys(boc)-Nal-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Lys(boc)-Gly-OH (SEQ ID NO:416) se prepara usando síntesis en fase sólida como se conoce en la técnica de síntesis en fase sólida de péptidos usando la estrategia de protección/desprotección Fmoc. La resina usada es resina Fmoc-Gly-HMPB-MBHA que está disponible comercialmente. El péptido se escinde de la resina usando TFA al 1% en cloruro de metileno para retener los grupos protectores de cadena lateral lábiles a ácidos. Se efectúa una ciclación cabeza-cola calentando la solución del péptido en DMF en presencia de base de Hunig y HBTU. Después de conseguir la ciclación, se retiran los grupos protectores de cadena lateral en condiciones ácidas tales como TFA al 95%-agua al 5% u otros cócteles de desprotección similares conocidos en la técnica. El fluoróforo 3 de la Tabla 2 se acopla a las dos aminas de cadena lateral lisina y el producto se aísla y purifica por HPLC de fase inversa.

20

#### Ejemplo 13: Síntesis de agente de imaginología ejemplo

Este ejemplo describe la síntesis del agente de imaginología ejemplo [F5]Lys(COCF<sub>3</sub>)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[OH] (SEQ ID NO:417).

25 Se combinaron péptido material de partida Lys(COCF<sub>3</sub>)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys-(OH) (SEQ ID NO:418) (6  $\mu\text{mol}$ ) y fluoróforo número 3 de la Tabla 2 (20  $\mu\text{mol}$ ) en 2 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) con 6  $\mu\text{l}$  de N-metilmorfolina (NMM). La solución se protegió de la luz y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 2 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 1,2 ml de bicarbonato de sodio 0,1 M y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla se purificó seguidamente por HPLC Fenil-Hexil de 10 mm X 250 mm. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM (ESI+, (M+3)/3: 1.131,02).

30

#### Ejemplo 14: Síntesis de agente de imaginología ejemplo

Este ejemplo describe la síntesis del agente de imaginología ejemplo [F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-



Lys(F5)-[OH] (SEQ ID NO:298) (agente R20).

Se disolvió el agente producto del Ejemplo 13 (2  $\mu$ mol) en 0,9 ml de agua y 0,3 ml de hidróxido de amonio concentrado. La solución se protegió de la luz y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se purificó seguidamente por HPLC en una columna Fenil-Hexil de 10 mm X 250 mm. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM (ESI+, (M+3)/3: 1.099,03)

#### Ejemplo 15: Síntesis de agente de imaginología ejemplo

Este ejemplo describe la síntesis del agente de imaginología [F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHmPEG20k] (SEQ ID NO:419) (agente R21).

Se disolvió una mezcla del agente producto del Ejemplo 13 (9  $\mu$ mol), metoxipoli-etilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, peso molecular 20 kDa, 220 mg, 11  $\mu$ mol), EDC (52  $\mu$ mol), HOBt (74  $\mu$ mol), NMM (40  $\mu$ l) en 6 ml de DMF y se protegió de la luz y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 3 días. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 20 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se disolvió en 3 ml de bicarbonato de sodio acuoso 0,1 M y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió hidróxido de amonio concentrado (1,2 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se purificó por HPLC. El péptido pegilado se purificó seguidamente por cromatografía de intercambio aniónico y se caracterizó por HPLC RP.

#### Ejemplo 16: Síntesis de agente de imaginología ejemplo

Este ejemplo describe la síntesis del agente de imaginología [F5]Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Lys(F5)-[OH] (SEQ ID NO:420).

Se combinaron péptido material de partida, Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Lys(OH) (SEQ ID NO:421) (1,9  $\mu$ mol) y fluoróforo número 3 de la Tabla 2 (9  $\mu$ mol) en 900  $\mu$ l de N,N-dimetilformamida (DMF) con 5  $\mu$ l de N-metilmorfolina (NMM). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 0,9 ml de hidroxilamina 0,1 M y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A esta solución se añadieron 0,3 ml de bicarbonato de sodio acuoso 0,1 M y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM (ESI+, (M+3)/3: 1,124,03).

#### Ejemplo 17: Síntesis de agente de imaginología ejemplo

Este ejemplo describe la síntesis del agente de imaginología [F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHmPEG5k] (SEQ ID NO:304) (Agente R27)

Una mezcla del producto del Ejemplo 13 (2,5  $\mu$ mol), metoxipoli-etilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, peso molecular 5 kDa, 30 mg, 6  $\mu$ mol), EDC (78  $\mu$ mol), HOBt (111  $\mu$ mol), NMM (15  $\mu$ l) en 2 ml de DMF se protegió de la luz y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 10 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se disolvió en 0,8 ml de bicarbonato de sodio acuoso 0,1 M y se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadió hidróxido de amonio concentrado (0,6 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se purificó por HPLC usando un gradiente de 10% a 85% de acetonitrilo en bicarbonato de trietilamonio 25 mM, pH 8,5, en una columna C18 de 10 mm X 250 mm 300 Å. El péptido pegilado se caracterizó por HPLC RP.

#### Ejemplo 18: Síntesis de agente de imaginología ejemplo

Este ejemplo describe la síntesis del agente de imaginología [F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHdPEG<sub>24</sub>] (SEQ ID NO:305) (Agente R26)

Se protegió de la luz una mezcla del agente producto del Ejemplo 13 (1,0  $\mu$ mol), metil-PEG<sub>24</sub>-Amina (MA(PEG)<sub>24</sub> Thermo Scientific, 5,5  $\mu$ mol), EDC (15  $\mu$ mol), HOBt (17  $\mu$ mol), NMM (20  $\mu$ l) en 1 ml de DMF y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 10 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se disolvió en 0,7 ml de bicarbonato de sodio acuoso 0,1 M y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El componente principal de la mezcla se aisló por HPLC preparativa usando un gradiente de 10% a 85% de acetonitrilo en bicarbonato de trietilamonio 25 mM, pH 8,5, en una columna C18. Las fracciones combinadas se trataron con hidróxido de amonio (1,0 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. La mezcla se purificó por HPLC usando un gradiente de 10% a 35% de acetonitrilo en bicarbonato de trietilamonio 25 mM, pH 8,5 en una columna C18. El péptido pegilado se caracterizó por HPLC RP.

#### Ejemplo 19: Síntesis de agente de imaginología ejemplo

Este ejemplo describe la síntesis del agente de imaginología [F5]Lys(Ac)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-

[OH] (SEQ ID NO:314) (Agente R23)

5 A una solución del agente producto del Ejemplo 14 (1,0  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (1 ml) se añadió N-metilmorfolina (30  $\mu\text{l}$ ) y una solución de acetato de succinimidilo (2,8  $\mu\text{mol}$ ) en ácido acético (4  $\mu\text{l}$ ). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 17 horas. El péptido se precipitó mediante adición de éter seguido de centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El producto bruto se disolvió en 1 ml de bicarbonato de sodio acuoso 0,1 M y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se purificó seguidamente por HPLC usando un gradiente de 20% a 35% de acetonitrilo en bicarbonato de trietilamonio 25 mM, pH 8,5 en una columna Fenil-Hexil. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM (ESI+, (M+3)/3: 1.113,03).

#### Ejemplo 20: Síntesis de agente de imaginología ejemplo

10 Este ejemplo describe la síntesis del agente de imaginología ejemplo [F5]Lys(COCF<sub>3</sub>)-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys(F5)-[OH] (SEQ ID NO:458).

15 Se combinaron péptido material de partida Lys(COCF<sub>3</sub>)-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys-(OH) (7,8  $\mu\text{mol}$ ) y un fluoróforo número 3 de la Tabla 2 (20  $\mu\text{mol}$ ) en 2 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) con 100  $\mu\text{l}$  de N-metilmorfolina (NMM). La solución se protegió de la luz y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 20 ml de éter seguido de centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 1,2 ml de bicarbonato de sodio 0,1 M y se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla se purificó seguidamente por HPLC usando un gradiente de 10% a 40% de acetonitrilo en bicarbonato de trietilamonio 25 mM, pH 8,5 en una columna Fenil-Hexil. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM (ESI+, (M+3)/3: 1.144,37).

#### 20 Ejemplo 21: Síntesis de agente de imaginología ejemplo

Este ejemplo describe la síntesis del agente de imaginología ejemplo [F5]Lys-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys(F5)-[OH] (SEQ ID NO:430) (Agente R24).

25 Las fracciones puras reunidas del producto del Ejemplo 20 (1  $\mu\text{mol}$ , en 4 ml de disolvente de HPLC) se combinaron con 0,4 ml de hidróxido de amonio concentrado. La solución se protegió de la luz y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se concentró a vacío y se purificó seguidamente por HPLC usando un gradiente de 10% a 40% de acetonitrilo en bicarbonato de trietilamonio 25 mM, pH 8,5 en una columna Fenil-Hexil. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM (ESI+, (M+3)/3: 1,112,37).

#### Ejemplo 22: Síntesis de agentes de imaginología ejemplo

30 Este ejemplo describe la síntesis de los agentes de imaginología denotados como Q65, Q66, Q91, Q92, Q93, Q94, R22, R51, R52, R53, R55, R56, R57, R58 y R59.

#### (Agente Q65) Pentinoil-Lys(F5)-Gly-Phe-Leu-Gly- $\beta$ Ala-Lys(F5)-PEG20kDa (SEQ ID NO:422)

35 El péptido [pentinoil]-Lys-Gly-Phe-Leu-Gly- $\beta$ Ala-Lys-[OH] (SEQ ID NO:459) (Tufts University Core Facility, 0,45  $\mu\text{mol}$ ) y fluoróforo número 3 de la Tabla 2 (1,0  $\mu\text{mol}$ ) se combinaron en 100  $\mu\text{l}$  de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1  $\mu\text{l}$  de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200  $\mu\text{l}$  de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

40 El péptido marcado (25  $\mu\text{mol}$ ) se combinó seguidamente con metoxi polietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, 10 mg, 0,50  $\mu\text{mol}$ ) y se disolvió en 100  $\mu\text{l}$  de DMF con 1  $\mu\text{l}$  de NMM. Se añadieron hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3  $\mu\text{mol}$ ) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5  $\mu\text{mol}$ ) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu\text{l}$  de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con mPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

#### (Agente Q66) Pentinoil-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly- $\beta$ Ala-Lys(F6)-PEG20kDa (SEQ ID NO:423)

50 El péptido [pentinoil]-Lys-Gly-Phe-Leu-Gly- $\beta$ Ala-Lys-[OH] (SEQ ID NO:460) (Tufts University Core Facility, 0,45  $\mu\text{mol}$ ) y fluoróforo número 2 (Tabla 2, 1,0  $\mu\text{mol}$ ) se combinaron en 100  $\mu\text{l}$  de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1  $\mu\text{l}$  de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200  $\mu\text{l}$  de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

El péptido marcado (25  $\mu\text{mol}$ ) se combinó seguidamente con metoxi polietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio,

10 mg, 0,50  $\mu$ mol) y se disolvió en 100  $\mu$ l de DMF con 1  $\mu$ l de NMM. Se añadieron hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3  $\mu$ mol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5  $\mu$ mol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu$ l de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con mPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**(Agente 91) Pentinoil-Lys(F5)-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F5)-PEG20kDa (SEQ ID NO:424)**

El péptido [pentinoil]-Lys-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys (SEQ ID NO:461) (Tufts University Core Facility, 0,45  $\mu$ mol) y fluoróforo número 3 de la Tabla 2) (1,0  $\mu$ mol) se combinaron en 100  $\mu$ l de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1  $\mu$ l de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200  $\mu$ l de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

El péptido marcado (25  $\mu$ mol) se combinó seguidamente con metoxi polietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, 10 mg, 0,50  $\mu$ mol) y se disolvió en 100  $\mu$ l de DMF con 1  $\mu$ l de NMM. Se añadieron hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3  $\mu$ mol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5  $\mu$ mol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu$ l de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con mPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**(Agente Q92) [F5]-His-Gly-Pro-Arg-Lys(F5)-[PEG20kDa] (SEQ ID NO:425)**

El péptido [H]-His-Gly-Pro-Arg-Lys-[OH] (SEQ ID NO:85) (Tufts University Core Facility, 0,45  $\mu$ mol) y fluoróforo 3 (Tabla 2, 1,0  $\mu$ mol) se combinaron en 100  $\mu$ l de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1  $\mu$ l de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200  $\mu$ l de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC en una columna C18 de 10 mm X 250 mm 300 Å. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

El péptido marcado (25  $\mu$ mol) se combinó seguidamente con metoxi polietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, 10 mg, 0,50  $\mu$ mol) y se disolvió en 100  $\mu$ l de DMF con 1  $\mu$ l de NMM. Se añadieron hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3  $\mu$ mol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5  $\mu$ mol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 h. El péptido pegilado se precipitó por adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu$ l de agua y se purificó por HPLC en una columna C18 de 21 mm X 250 mm 300 Å. El péptido conjugado con mPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**(Agente Q93) [F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-His-Gly-Pro-Asn- $\beta$ A-[PEG20kDa] (SEQ ID NO:426)**

El péptido [H]-His-Gly-Pro-Asn-Lys-His-Gly-Pro-Asn-[OH] (SEQ ID NO:462) (Tufts University Core Facility, 0,45  $\mu$ mol) y fluoróforo número 3 de la Tabla 2 (1,0  $\mu$ mol) se combinaron en 100  $\mu$ l de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1  $\mu$ l de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200  $\mu$ l de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

El péptido marcado (25  $\mu$ mol) se combinó seguidamente con metoxi polietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, 10 mg, 0,50  $\mu$ mol) y se disolvió en 100  $\mu$ l de DMF con 1  $\mu$ l de NMM. Se añadieron hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3  $\mu$ mol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5  $\mu$ mol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 h. El péptido pegilado se precipitó por adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350  $\mu$ l de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con mPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**(Agente Q94) [F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-[PEG20kDa] (SEQ ID NO:427)**

El péptido [H]-His-Gly-Pro-Asn-Lys-[OH] (SEQ ID NO:75) (Tufts University Core Facility, 0,45  $\mu$ mol) y fluoróforo número 3 de la Tabla 2 (1,0  $\mu$ mol) se combinaron en 100  $\mu$ l de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1  $\mu$ l de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de

1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 µl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

5 El péptido marcado (25 µmol) se combinó seguidamente con metoxi polietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, 10 mg, 0,50 µmol) y se disolvió en 100 µl de DMF con 1 µl de NMM. Se añadieron hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3 µmol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5 µmol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350 µl de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con mPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**(Agente R22) [F6]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F6)-[YPEG 2x20kDa] (SEQ ID NO:434)**

15 El péptido [H]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys-[OH] (SEQ ID NO:463) (Tufts University Core Facility, 0,45 µmol) y fluoróforo número 2 de Tabla 2 (1,0 µmol) se combinaron en 100 µl de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1 µl de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 µl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

20 El péptido marcado (25 µmol) se combinó seguidamente con Y-PEG-amina 2X20k (PEG Amina con forma de Y, MW 40000, JenKem USA, 40 mg, 0,50 µmol) y se disolvió en 100 µl de DMF con 1 µl de NMM. Se añadieron hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3 µmol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5 µmol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350 µl de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con Y-PEG se purificó adicionalmente por cromatografía de intercambio aniónico fuerte. El péptido conjugado con Y-PEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**(Agente R51) [mPEG-20kDa-Suc]-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:435)**

30 El péptido [succinil]-Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:464) (Tufts University Core Facility, 0,45 µmol) y fluoróforo número 2 de Tabla 2 (1,0 µmol) se combinaron en 100 µl de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1 µl de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 µl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

35 El péptido marcado (25 µmol) se combinó seguidamente con metoxi polietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, 10 mg, 0,50 µmol) y se disolvió en 100 µl de DMF con 1 µl de NMM. Se añadieron hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3 µmol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5 µmol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350 µl de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con mPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**(Agente R52) [dPEG-1kDa-Suc]-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:436)**

45 El péptido [succinil]-Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:465) (Tufts University Core Facility, 0,45 µmol) y fluoróforo número 2 de Tabla 2 (1,0 µmol) se combinaron en 100 µl de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1 µl de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 µl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

50 El péptido marcado (25 µmol) se combinó seguidamente con Metil-PEG<sub>24</sub>-Amina (MA(PEG)<sub>24</sub> Thermo Scientific, 0,54 mg, 0,50 µmol) y se disolvió en 100 µl de DMF con 1 µl de NMM. Se añadieron hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3 µmol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5 µmol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado discreto se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado discreto se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350 µl de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con dPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y CL-EM

**(Agente R53) [dppa-Suc]-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:437)**

El péptido [succinil]-Lys-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:466) (Tufts University Core Facility, 0,45 μmol) y fluoróforo número 2 de (Tabla 2, 1,0 μmol) se combinaron en 100 μl de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1 μl de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 μl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC en una columna C18 de 10 mm X 250 mm 300 Å. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

El péptido marcado (25 μmol) se combinó a continuación con 3,3-difenilpropilamina (dppa, 0,11 mg, 0,50 μmol) y se disolvió en 100 μl de DMF con 1 μl de NMM. Se añadieron hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3 μmol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5 μmol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 h. El péptido conjugado con dppa se precipitó por adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido conjugado con dppa se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350 μl de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con dppa se caracterizó por HPLC RP-18 y CL-EM.

**(Agente R55) [mPEG-20kDa-Suc]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:438)**

El péptido [succinil]-Lys-Arg-Arg-Lys-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:467) (Tufts University Core Facility, 0,45 μmol) y fluoróforo número 2 de Tabla 2 (1,0 μmol) se combinaron en 100 μl de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1 μl de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 μl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

El péptido marcado (25 μmol) se combinó seguidamente con metoxi polietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, 10 mg, 0,50 μmol) y se disolvió en 100 μl de DMF con 1 μl de NMM. Se añadieron hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3 μmol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5 μmol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350 μl de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con mPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**(Agente R56) [dPEG-1kDa-Suc]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:439)**

El péptido [succinil]-Lys-Arg-Arg-Lys-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:468) (Tufts University Core Facility, 0,45 μmol) y fluoróforo número 2 de Tabla 2 (1,0 μmol) se combinaron en 100 μl de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1 μl de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 μl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

El péptido marcado (25 μmol) se combinó seguidamente con Metil-PEG<sub>24</sub>-Amina (MA(PEG)<sub>24</sub> Thermo Scientific, 0,54 mg, 0,50 μmol) y se disolvió en 100 μl de DMF con 1 μl de NMM. Se añadieron hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3 μmol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5 μmol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado discreto se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado discreto se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350 μl de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con dPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y CL-EM.

**(Agente R57) [dppa-Suc]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:440)**

El péptido [succinil]-Lys-Arg-Arg-Lys-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:469) (Tufts University Core Facility, 0,45 μmol) y fluoróforo número 2 de Tabla 2 (1,0 μmol) se combinaron en 100 μl de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1 μl de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 μl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

El péptido marcado (25 μmol) se combinó a continuación con 3,3-difenilpropilamina (dppa, 0,11 mg, 0,50 μmol) y se disolvió en 100 μl de DMF con 1 μl de NMM. Se añadieron hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3 μmol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5 μmol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido conjugado con dppa se

precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido conjugado con dppa se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350 µl de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con dppa se caracterizó por HPLC RP-18 y CL-EM

**(Agente R58) [mPEG-20kDa-Suc]-Lys(F6)-Ala-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:441)**

- 5 El péptido [succinil]-Lys-Ala-Arg-Arg-Lys-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:470) (Tufts University Core Facility, 0,45 µmol) y fluoróforo número 2 de Tabla 2 (1,0 µmol) se combinaron en 100 µl de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1 µl de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 µl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

- 15 El péptido marcado (25 µmol) se combinó seguidamente con metoxi polietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, 10 mg, 0,50 µmol) y se disolvió en 100 µl de DMF con 1 µl de NMM. Se añadieron hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3 µmol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5 µmol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350 µl de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con mPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**(Agente R59) [mPEG-20kDa-Suc]-Lys(F6)-Arg-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:442)**

- 20 El péptido [succinil]-Lys-Ala-Arg-Arg-Lys-[NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:471) (Tufts University Core Facility, 0,45 µmol) y fluoróforo número 2 de Tabla 2 (1,0 µmol) se combinaron en 100 µl de N,N-dimetilformamida (DMF) con 1 µl de N-metilmorfolina (NMM) y 0,25 mg de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido marcado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de metil-t-butil éter (MTBE) seguido de centrifugación o decantación del líquido sobrenadante. El péptido sólido se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 200 µl de bicarbonato de sodio 0,1 M y se purificó por HPLC. El péptido purificado se caracterizó por CL-EM.

- 30 El péptido marcado (25 µmol) se combinó seguidamente con metoxi polietilenglicol amina (mPEG-NH<sub>2</sub>, Laysan Bio, 10 mg, 0,50 µmol) y se disolvió en 100 µl de DMF con 1 µl de NMM. Se añadieron hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0,25 mg, 1,3 µmol) e hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,2 mg, 1,5 µmol) y la solución se colocó en un rotor protegido de la luz y se hizo girar a temperatura ambiente durante 16 horas. El péptido pegilado se precipitó mediante adición de 1,5 ml de MTBE, se aisló por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. El péptido pegilado se secó rápidamente a vacío, se disolvió en 350 µl de agua y se purificó por HPLC. El péptido conjugado con mPEG se caracterizó por HPLC RP-18 y HPLC SEC.

**Ejemplo 23: Imaginología de tumor**

- 35 Se inyectaron a ratones NU/NU de 6-8 semanas (Charles River Laboratory, Wilmington, MA) por vía SC 2 x 10<sup>6</sup> células 4T-1 o HT-29 bilateralmente en cada almohadilla grasa mamaria. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 3 x 3 mm (alrededor de 7 días después de la inyección celular), se inyectaron a los ratones por vía intravenosa 2-4 nmol de cada agente de imaginología (5 ratones/sonda y 2 ratones/sin sonda como control) en un volumen de 100 µl a través de la vena de la cola. La imaginología se llevó a cabo a las 24 horas usando un sistema de Tomografía Molecular de Fluorescencia (VisEn Medical, Woburn MA).

Se usó pentinol-Lys(F5)-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys(F5)-PEG20kDa (SEQ ID NO:422) (Agente Q65) para visualizar los tumores *in vivo*. La Figura 1 muestra la imagen plana de tumores 4T1 bilaterales 6 horas después de la administración del agente. La Figura 2 muestra una imagen bilateral de tomografía molecular de fluorescencia de tumores 4T1 6 horas después de la administración del agente Q65.

- 45 También se usó pentinoil-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys(F6)-PEG20kDa (SEQ ID NO:423) (Agente Q66) para visualizar tumores *in vivo*. La Figura 3 muestra la imagen de los tumores 4T1 a las 5, 24 y 52 horas después de la administración del Agente Q66.

- 50 También se usó pentinoil-Lys(F5)-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F5)-PEG20kDa (SEQ ID NO:424) (Agente Q91) para visualizar los tumores *in vivo*. La Figura 4 muestra imágenes planas de reflectancia de fluorescencia de tumores de xenoinjerto HT-29 a las 2, 6 y 24 horas después de la administración del Agente Q91.

**Ejemplo 24: Perfil de activación enzimática del agente de imaginología Q65**

En este Ejemplo, se caracterizó el perfil de activación enzimática del agente de imaginología pentinoil-Lys(F5)-Gly-Phe-Leu-Gly-βAla-Lys(F5)-PEG20kDa (SEQ ID NO:422) (Agente Q65).

Las reacciones se llevaron a cabo con tampón apropiado a temperatura ambiente en una placa de 96 pocillos con un

volumen de ensayo final de 250  $\mu$ l y concentraciones de sonda y enzima de 0,5  $\mu$ M y 0,05  $\mu$ M, respectivamente. El tampón para Catepsina B fue MES 25 mM (pH 5,0), DTT 1 mM. Se activó Catepsina B humana recombinante (R&D Systems) en tampón de MES 25 mM (pH 5,0) y DTT 5 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se activó Catepsina L humana recombinante (R&D Systems) en tampón de MES 50 mM (pH 6,0), DTT 5 mM, durante 15 minutos en hielo. Se activó Catepsina Z de ratón recombinante (R&D Systems) en tampón de NaOAc 25 mM (pH 3,0), DTT 5 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tampón para plasmina (CalBiochem) y tripsina (Sigma) fue PBS a pH 7,4.

La placa se incubó a temperatura ambiente y se monitorizó la actividad a 0, 1, 3, 5, y 24 horas con un lector de placas Gemini (Molecular Devices) a una longitud de onda de excitación de 663 nm, emisión 690 nm, y corte 665 nm. La actividad se calculó como la multiplicidad de la activación comparando la fluorescencia de la enzima con sonda con la fluorescencia de la sonda sola.

Los resultados se muestran en la Figura 5, que muestra que el agente de imaginología Q65 es activado por Catepsina B pero no por plasmina, tripsina y Catepsina Z.

#### **Ejemplo 25: Perfiles de activación enzimática de los agentes de imaginología Q92 y Q93**

En este Ejemplo, se caracterizaron los perfiles de activación enzimática de los agentes de imaginología [F5]-His-Gly-Pro-Arg-Lys(F5)-[PEG20kDa] (SEQ ID NO:425) (Agente Q92) y [F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-His-Gly-Pro-Asn- $\beta$ A-[PEG20kDa] (SEQ ID NO:426) (Agente Q93).

Las reacciones se llevaron a cabo con tampón apropiado a temperatura ambiente en una placa de 96 pocillos con un volumen de ensayo final de 250  $\mu$ l y concentraciones de sonda y enzima de 0,5  $\mu$ M y 0,05  $\mu$ M, respectivamente. El tampón para Catepsina K de conejo humanizada activada (Merck) fue MES 50 mM (pH 5,0), EDTA 2,5 mM, DTT 2,5 mM. El tampón para Catepsina B fue MES 25 mM (pH 5,0), DTT 1 mM. Se activó Catepsina B humana recombinante (R&D Systems) en tampón de MES 25 mM (pH 5,0) y DTT 5 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se activó Catepsina L humana recombinante (R&D Systems) en tampón de MES 50 mM (pH 6,0), DTT 5 mM, durante 15 minutos en hielo. El tampón para MMP-2 (BIOMOL) y MMP-9 (BIOMOL) fue Tris 50 mM (pH 7,5), CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM y detergente Brij-35 0,05%. La placa se incubó a temperatura ambiente y se monitorizó la actividad a 0, 1, 3, 5, y 24 horas con un lector de placas Gemini (Molecular Devices) a una longitud de onda de excitación de 663 nm, emisión 690 nm, y corte 665 nm. La unidad fluorescente liberada se determinó restando de la fluorescencia total la fluorescencia de la sonda sola.

Los resultados para Q92 se presentan en la Figura 6A y los resultados para Q93 se muestran en la Figura 6B, que muestra que tanto Q92 como Q93 son activados principalmente por Catepsina K.

#### **Ejemplo 26: Imaginología ósea**

Se sometieron ratones hembra BALB/c de 7 semanas (Charles River Laboratory, Wilmington, MA) a ovariectomía o cirugía simulada para inducir osteoporosis. De una a dos semanas después de la cirugía, se inyectó a los ratones intravenosamente el agente de imaginología [F5]-His-Gly-Pro-Asn-Lys(F5)-[PEG20kDa] (SEQ ID NO:427) (Agente Q94). La imaginología se llevó a cabo en diversos puntos temporales usando un sistema de Tomografía Molecular de Fluorescencia (VisEn Medical, Bedford, MA). Los resultados se muestran en la Figura 7.

La Figura 7A muestra imágenes de un ratón ovariectomizado (OVX) comparado con un ratón control (simulado) a las 4 y 24 horas después de la inyección. La cuantificación de la fluorescencia absoluta de la osteoporosis para los ratones simulado y ovariectomizado se muestra en la Figura 7B. La mayor señal de sonda detectada en la región de la tibia parece ser debida a los mayores niveles de Catepsina K en la pérdida ósea inducida por el procedimiento de ovariectomía.

#### **Ejemplo 27: Imaginología de enfermedad cardiovascular**

Este ejemplo muestra la imaginología de enfermedad cardiovascular usando el agente de imaginología Pentinoil-Lys(F5)-Gly-Phe-Leu-Gly- $\beta$ Ala-Lys(F5)-PEG20kDa) (SEQ ID NO:422) (Agente Q65).

Se inyectaron 2 nmol de agente de imaginología a ratones apoE<sup>-/-</sup> alimentados con un elevado nivel de colesterol y se llevó a cabo la imaginología *in vivo* con imaginología de reflectancia de fluorescencia *ex vivo*. La Figura 8 muestra la imaginología de reflectancia de fluorescencia de enfermedad cardiovascular en placas ateroscleróticas inflamadas de ratones 24 horas después de la inyección del agente Q65. La fluorescencia se detectó en secciones vasculares cargadas con placa en la raíz aórtica, el cayado aórtico y las carótidas.

#### **Ejemplo 28: Imaginología de la inflamación (Edema de pata inducido por carragenano)**

Este Ejemplo muestra la imaginología de la inflamación en un modelo de ratón. De forma resumida, se inyectó a ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas (Charles River Laboratory, Wilmington, MA) por vía subcutánea una solución al 1% de carragenano en PBS. 1 minuto después de la inyección, se inyectó a los ratones el agente de imaginología Q91. La imaginología se llevó a cabo en diversos puntos temporales usando un sistema de Tomografía

Molecular de Fluorescencia (VisEn Medical, Woburn, MA). En la Figura 9 se muestra una imagen, que presenta que se observa significativamente más fluorescencia en el ratón al que se inyectó carragenano comparado con el control (sin inyección).

#### **Ejemplo 29: Perfiles de activación enzimática de los agentes R20, R21, R23, R24 y R27**

- 5 En este Ejemplo, se caracterizaron los perfiles de activación enzimática de los agentes ([F5]-Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[OH]) (SEQ ID NO:401) (R20), ([F5]-Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHmPEG20k]) (SEQ ID NO:428) (R21), ([F5]-Lys(Ac)-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[OH]) (SEQ ID NO:429) (R23), ([F5]-Lys-His-Pro-Phe-His-Cha-Val-Ile-His-Lys(F5)-[OH]) (SEQ ID NO:430) (R24) y ([F5]-Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHmPEG5k]) (SEQ ID NO:433) (R27).
- 10 Las reacciones se llevaron a cabo con tampón apropiado en una placa de 96 pocillos con un volumen de ensayo final de 250  $\mu$ l y concentraciones de sonda y enzima de 1  $\mu$ M y 100 nM, respectivamente. Las reacciones se incubaron a 37°C para Renina y a temperatura ambiente para el resto de proteasas. El tampón para Catepsina G de neutrófilos humana (BIOMOL) fue Tris 100 mM (pH 7,5), NaCl 1,6 M. El tampón para Catepsina D (BIOMOL) fue ácido fórmico 100 mM (pH 3,3). El tampón para elastasa de neutrófilos humana recombinante (Innovative Research)
- 15 fue Tris 100 mM (pH 7,5). El tampón para plasmina (CalBiochem) y tripsina (Sigma) fue solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS) (pH 7,4). El tampón para renina humana recombinante (rhRenin) (Proteos) y retina de rata recombinante (rrRenin) (Proteos) fue MOPS 50 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, con Tween-20 al 0,002% recién preparado. La placa se incubó a la temperatura apropiada y se monitorizó la actividad a las 24 horas con un lector de placas Gemini (Molecular Devices) a una longitud de onda de excitación de 663 nm, emisión 690 nm, y corte 665 nm. La unidad fluorescente liberada se determinó restando la fluorescencia de la sonda sola de la fluorescencia total.

Los resultados se muestran en la Figura 11, que muestra que los agentes R20, R23, y R24 fueron activados principalmente por renina humana recombinante. Los agentes R21 y R27 fueron activados por renina humana recombinante, elastasa de neutrófilos humana, catepsina de neutrófilos humana y tripsina.

#### **25 Ejemplo 30: Imaginología renal**

Este ejemplo muestra la imaginología *in vivo* de riñones en ratones en una dieta control frente a una dieta baja en sodio.

- 30 Se alimentaron ratones C57BL6 (Jackson Laboratories) con una dieta deficitaria en sodio (0,02% de Na) y se reemplazó el agua por una solución de amilorida (0,1 mg/5ml o 5 mg/kg/día) durante 2 días. Los ratones C57BL6 control se alimentaron con dieta habitual y agua. Los agentes de imaginología [FS]-Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(FS)-[OH] (SEQ ID NO:401) (R20) y ([F5]-Lys-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys(F5)-[NHmPEG20k]) (SEQ ID NO:428) (R21) se inyectaron intravenosamente en diferentes concentraciones (0,2, 0,7, 2 y 4 nmol/ratón) después de 2 días en la dieta con bajo contenido en sal. La imaginología se llevó a cabo a las 24 horas usando un sistema de Tomografía Molecular de Fluorescencia (VisEn Medical, Woburn MA).
- 35 Los resultados se muestran en la Figura 12, que demuestra que para ambos agentes de imaginología, los riñones de los ratones en la dieta baja en sodio (Figuras 12B y 12D) aportaron una mayor señal relativa respecto a los riñones de los ratones en la dieta control (Figuras 12A y 12C).

#### **Ejemplo 31: Activación enzimática del agente de imaginología R22**

- 40 En este Ejemplo, se caracterizó el perfil de activación enzimática del agente de imaginología [F6]-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Lys(F6)-[YPEG 2x20kDa] (SEQ ID NO:434) (R22).
- Se llevó a cabo una activación por enzimas recombinantes en volúmenes de 250  $\mu$ l dispuestos en placas de 96 pocillos. Se activaron MMP antes de la reacción de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las reacciones contenían 0,5  $\mu$ M de R22 y 0,05  $\mu$ M de enzima activada en el tampón de activación apropiado para cada enzima y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Las placas se leyeron a las 24 horas con longitudes de onda de excitación/emisión de 740/770 nm. Las lecturas de fluorescencia se llevaron a cabo usando un Lector de Placas de Fluorescencia Gemini (Molecular Devices). Los pocillos en los que no se añadió enzima se usaron como controles. La multiplicidad de la activación se obtuvo dividiendo la lectura activada por enzima (en unidades de fluorescencia relativas) por su correspondiente pocillo control.
- 45

- 50 Un ejemplo de la activación de R22 por MMP y otras proteasas se muestra en la Figura 13, que muestra que R22 es activado principalmente por MMP-13 humana recombinante y tripsina.

#### **Ejemplo 32: Imaginología de tumor con agente R22**

Este Ejemplo describe la imaginología de tumores *in vivo* usando el agente de imaginología R22.

Se inyectaron a ratones macho y hembra NU/NU (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), de 6-8 semanas células tumorales bilateralmente en las almohadillas grasas mamarias primera y segunda (línea de cáncer colorectal



humano HT-29:  $3 \times 10^6$  células/sitio). Una vez que los tumores alcanzaron los volúmenes deseados, medidos con calibres ( $100 \text{ mm}^3$ ) se inyectaron a los ratones intravenosamente 2 nmol de compuesto R22. La imaginología se llevó a cabo a las 6 y 24 horas después usando el Sistema de Tomografía de Fluorescencia (FMT2500) (VisEn Medical, Bedford, MA). Para la imaginología *in vivo*, los ratones se anestesiaron con anestesia gaseosa (mezcla de isoflurano/oxígeno), dispuesta en la cámara de imaginología de un sistema FMT2500 al mismo tiempo y se visualizó usando los modos de reflectancia y tomográfico. En la Figura 14 se muestran Ejemplos de imaginología con el agente en el modelo de tumor HT-29.

Imágenes tomadas por imaginología de reflectancia después de 6 horas se muestran en la Figura 14A y después de 24 horas en la Figura 14B. Imágenes tomográficas tomadas después de 6 horas se muestran en la Figura 14C y después de 24 horas en la Figura 14D.

### Ejemplo 33: Perfiles de activación enzimática de los agentes R51, R52, R55, R56, R57, R58 y R59

Este ejemplo muestra los perfiles de activación enzimática para compuestos ([mPEG-20kDa-Suc]-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>]) (SEQ ID NO:435) (R51), ([dPEG-1kDa-Suc]-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>]) (SEQ ID NO:436) (R52), ([dppa-Suc]-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>]) (SEQ ID NO:437) (R53), ([mPEG-20kDa-Suc]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>]) (SEQ ID NO:438) (R55), ([dPEG-1kDa-Suc]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>]) (SEQ ID NO:439) (R56), ([dppa-Suc]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>]) (SEQ ID NO:440) (R57), ([mPEG-20kDa-Suc]-Lys(F6)-Ala-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>]) (SEQ ID NO:441) (R58) y ([mPEG-20kDa-Suc]-Lys(F6)-Arg-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>]) (SEQ ID NO:442) (R59).

Se incubaron compuestos a una concentración de 0,5 uM con Catepsina B, Catepsina K, Catepsina L o Catepsina S a una concentración de 0,05 uM. Los tampones de reacción usados fueron los siguientes: Catepsina K - MES 50 mM, pH 5,0, EDTA 2,5 mM, DTT 2,5 mM; Catepsina B - MES 25 mM, pH 5,0, DTT 1 mM; Catepsina S - NaOAc 50 mM, pH 4,5, DTT 5 mM, NaCl 0,25M; Catepsina L - MES 50 mM, pH 6, DTT 5 mM. La actividad se monitorizó durante 24 horas con un lector de placas de fluorescencia Gemini (Molecular Devices) a una excitación de 663 nm y emisión de 690 nm con un corte de 690 nm. La Figura 15 indica que la activación del agente de imaginología R51 por diversas proteasas Catepsinas es mayor que el de otros agentes de imaginología.

### Ejemplo 34: Imaginología de la actividad de macrófagos en placas ateroscleróticas

Se alimentaron ratones hembra de tipo silvestre agrupados por edad C57BL6 (Charles river Laboratories) con dieta normal y se alimentaron ratones hembra modificados genéticamente ApoE *-/-* (Jackson Laboratories) con dieta rica en colesterol durante 10-20 semanas. Se inyectaron a los ratones intravenosamente compuestos de fórmula R51 ([mPEG-20kDa-Suc]-Lys(F6)-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>]) (SEQ ID NO:435) y R55 ([mPEG-20kDa-Suc]-Lys(F6)-Arg-Arg-Lys(F6)-[NH<sub>2</sub>]) (SEQ ID NO:438). Los ratones se visualizaron a continuación a las 6 y 24 horas por tomografía molecular de fluorescencia y por reflectancia de fluorescencia usando un FMT2500 (VisEn Medical, Bedford, MA).

La Figura 16 muestra un ejemplo de la imaginología de fluorescencia usando el compuesto R51. La Figura 16A muestra la imaginología de fluorescencia del arco aórtico en ratones ApoE *-/-* y de tipo silvestre a las 6 horas después de la inyección. La Figura 16B compara la fluorescencia cuantificada de ratones tipo silvestre frente a ratones ApoE *-/-* con modificación génica a las 6 horas después de la inyección con el compuesto R51. La Figura 16C muestra la imaginología de reflectancia de los mismos ratones con compuesto R51 a las 6 horas. La Figura 16D compara la fluorescencia cuantificada de ratones tipo silvestre frente a ratones ApoE *-/-* con modificación génica a las 6 horas después de la inyección con el compuesto R51. El agente de imaginología R51 produjo una mayor señal de fluorescencia en los ratones ApoE con modificación génica sobre los controles, demostrando el uso de R51 en la imaginología de modelos de enfermedad cardiovascular.

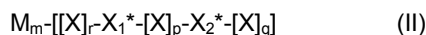
La Figura 17A muestra un ejemplo de imaginología de tomografía molecular de fluorescencia de ratones a las 6 horas después de la inyección con R55. La Figura 17B compara la fluorescencia cuantificada de ratones tipo silvestre frente a ratones ApoE *-/-* con modificación génica a las 6 horas después de la inyección con el compuesto R55. El agente de imaginología R51 produjo una mayor señal de fluorescencia en los ratones ApoE con modificación génica sobre los controles, demostrando el uso de R51 en la imaginología de modelos de enfermedad cardiovascular.

### Equivalentes

La invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o las características esenciales de la misma. Por tanto, las anteriores realizaciones deben considerarse, en todos los aspectos, ilustrativas y no limitantes de la invención descrita en la presente memoria. El ámbito de la invención viene así indicado por las reivindicaciones adjuntas y no por la anterior descripción y, por tanto, todos los cambios que estén incluidos en el significado de las reivindicaciones pretenden estar abarcados por estas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un agente de imagenología inactivado intramolecularmente, representado por la Fórmula II:



en la que:

5 X, independientemente, para cada aparición, es un residuo aminoacídico;

X<sub>1</sub>\* y X<sub>2</sub>\* son cada uno independientemente X-L-F;

L, independientemente, para cada aparición, es un resto enlazador o un enlace;

F es un fluoróforo, donde el agente de imagenología contiene no más de dos fluoróforos y un fluoróforo inactiva al otro fluoróforo;

10 M es un modificador biológico que tiene un peso molecular entre aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 35 kDa;

m es 1 o 2;

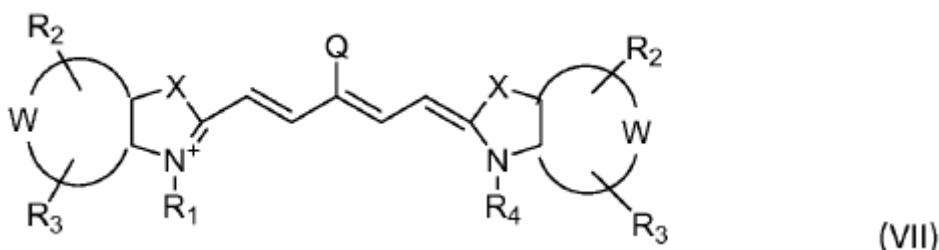
r es un número entero de 0 a 28;

p es un número entero de 1 a 28;

15 q es un número entero de 0 a 28; donde la suma de r, p y q no es mayor de 28,

donde el fluoróforo está, o se queda químicamente unido al oligopéptido a través de una reacción química con un compuesto de

(a) Fórmula VII:



20 o una sal del mismo, en la que:

X está seleccionado independientemente, para cada aparición, del grupo que consiste en C(CH<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>)(CH<sub>2</sub>Y<sub>2</sub>), O, S, y Se;

Y<sub>1</sub> y Y<sub>2</sub> están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H y un grupo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> opcionalmente sustituido con -OR\*, N(R\*)<sub>2</sub> o -SR\*, donde R\* es H o alquilo;

25 W representa un anillo benzo-condensado, nafto-condensado o pirido-condensado;

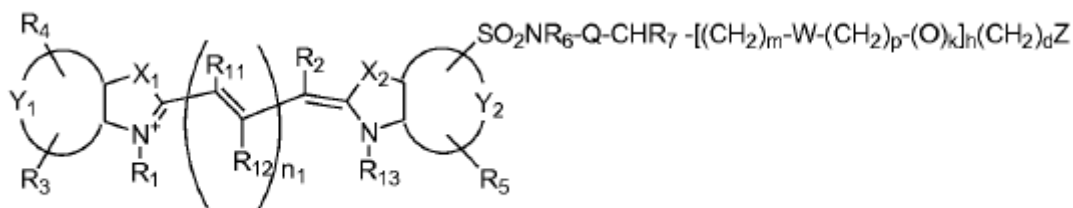
R<sub>1</sub> está seleccionado del grupo que consiste en (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y (CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>SO<sub>3</sub>H, donde x es un número entero seleccionado de 0 a 6 e y es un número entero seleccionado de 2 a 6;

30 R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> están seleccionados, independientemente, para cada aparición, del grupo que consiste en H, carboxilato, ácido carboxílico, éster carboxílico, amina, amida, sulfonamida, hidroxilo, alcoxilo, un resto ácido sulfónico y un resto sulfonato;

R<sub>4</sub> está seleccionado del grupo que consiste en (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>H, donde x es un número entero seleccionado de 0 a 6 e y es un número entero seleccionado de 2 a 6; y

Q está seleccionado de un grupo que consiste en un anillo heteroarilo sustituido con un grupo carboxilo o un anillo heteroarilo de 6 miembros sustituido con un grupo carbonilo, o

35 (b) Fórmula VIII:



(VIII)

o una sal del mismo, en la que:

$X_1$  y  $X_2$  están seleccionados independientemente, para cada aparición del grupo que consiste en  $C(CH_2K_1)(CH_2K_2)$ , O, S y Se;

5  $K_1$  y  $K_2$  están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, un grupo alifático  $C_1-C_{20}$  opcionalmente sustituido con  $-OR^*$ ,  $N(R^*)_2$  o  $SR^*$ ; o  $K_1$  y  $K_2$  juntos forman parte de un anillo carbocíclico o heterocíclico sustituido o no sustituido;

$Y_1$  y  $Y_2$  son cada uno independientemente un anillo benzo-condensado, un anillo nafto-condensado o un anillo pirido-condensado;

10  $n_1$  es 1, 2, o 3;

$R_2$ ,  $R_{11}$  y  $R_{12}$  están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, F, Br, Cl, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ , ariloxi, un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno, un anillo heteroaromático que contiene nitrógeno, un sulfonato, un ion iminio, o dos sustituyentes  $R_{12}$  y  $R_{11}$  o sustituyentes  $R_2$  y  $R_{11}$  adyacentes cualesquiera, cuando se toman combinados, forman un anillo carbocíclico de 4, 5 o 6 miembros sustituido o no sustituido, un anillo carbocíclico no aromático sustituido o no sustituido o un anillo arilo carbocíclico sustituido o no sustituido, donde los anillos carbocíclicos están cada uno, independientemente, sustituidos opcionalmente una o más veces con alquilo  $C_1-C_6$ , halógeno, o  $OR^*$  o  $SR^*$ ;

15  $R_1$  y  $R_{13}$  son  $(CH_2)_xCH_3$ , cuando x es un número entero seleccionado de 0 a 6; o  $R_1$  y  $R_{13}$  son independientemente  $(CH_2)_nSO_3^-$  o  $(CH_2)_nSO_3H$  cuando n es un número entero seleccionado de 2 a 6;

20  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, carboxilato, ácido carboxílico, éster carboxílico, amina, amida, sulfonamida, hidroxilo, alcoxilo, un resto ácido sulfónico y un resto sulfonato;

25 Q está ausente, o está seleccionado de un resto carbonilo o un grupo alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, donde 0-2 de los grupos metileno del grupo alquilo pueden estar opcionalmente reemplazados por NH, O o S, o un anillo carbocíclico  $C_1-C_6$ , carbocíclico no aromático, heterocíclico o heterocíclico no aromático sustituido o no sustituido en el que los anillos heterocíclicos contienen 1-2 heteroátomos;

30  $R_6$  está seleccionado del grupo que consiste en H, un grupo alifático  $C_1-C_{20}$  sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido, donde  $R_6$  está opcionalmente sustituido con halógeno,  $OR^*$ ,  $N(R^*)_2$  o  $SR^*$ , cuando Q está ausente, un grupo carbonilo, un grupo alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, donde 0-2 de los grupos metileno del grupo alquilo están reemplazados por NH, O o S, o un anillo carbocíclico  $C_1-C_6$ , carbocíclico no aromático, heterocíclico o heterocíclico no aromático sustituido o no sustituido en el que los anillos heterocíclicos contienen 1-2 heteroátomos; o

$R_6$  es H, cuando Q es un carbonilo; y

35  $R_7$  está seleccionado del grupo que consiste en H, un grupo alifático  $C_1-C_{20}$  sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido, donde  $R_7$  está opcionalmente sustituido con halógeno,  $OR^*$ ,  $N(R^*)_2$  o  $SR^*$ ; o

$R_6$  y  $R_7$ , tomados juntos forman un anillo heterocíclico o heterocíclico no aromático de 4, 5, 6 o 7 miembros opcionalmente sustituido con halógeno,  $OR^*$ ,  $N(R^*)_2$  o  $SR^*$ ; o

40  $NR_6$ , Q y  $CHR_7$  forman juntos un sistema de anillo heterocíclico o heterocíclico no aromático sustituido o no sustituido en el que los anillos contienen 1 o 2 heteroátomos, donde los anillos están opcionalmente sustituidos con  $-OR^*$ ,  $N(R^*)_2$  o  $SR^*$ ; y

W está ausente o es un grupo seleccionado del grupo que consiste en  $-SO_2NR_6-Q-CHR_7-$ ,  $-O-$ ,  $-COO-$ , y  $-CONH-$ ;

$h = 0-70$ ;  $k = 0$  o  $1$ ;  $d = 0-12$ ;  $m = 0-12$ ;  $p = 0-12$ ;

Z es un resto con funcionalidad nucleófila N, O o S o es, o contiene una funcionalidad capaz de reaccionar con nucleófilos N, O o S; y

cada R\* es independientemente H o alquilo C<sub>1-20</sub>, donde el agente de imaginología tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa y comprende un sitio de escisión enzimática de modo que tras la escisión enzimática al menos un fluoróforo se queda inactivado y produce una mayor señal fluorescente cuando es excitado por radiación electromagnética que antes de la escisión enzimática.

2. El agente de imaginología según la reivindicación 1, en el que el residuo aminoacídico X<sub>2</sub>\* es lisina, y/o el residuo aminoacídico X<sub>1</sub>\* es lisina.

3. El agente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que L comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amido, amino-polietilenglicol-ácido carboxílico, amino-polietilenglicol azida, diaminoPEG, ácido cisteico, ácido glutámico, ácido aminocaproico, etilendiamina, propilendiamina, espermidina, espermina, hexanodiamina y una diamina-aminoácido.

4. El agente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

a) el modificador biológico tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 35 kDa, y/o

b) el modificador biológico está seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, metoxipolietilenglicol, polipropilenglicol ramificado, polipropilenglicol, un copolímero de injerto de poli-lisina y metoxipolietilenglicol, un ácido graso, un lípido y un fosfolípido, o

c) el modificador biológico está seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido, un péptido, un carbohidrato, un dextrano, un sulfonato y un polisulfonato, o

d) el modificador biológico está seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido cisteico, naftilalanina, fenilalanina, difenilpropilamina, 4,4-difenilciclohexanol, glucosamina, manosamina, galactosamina, arginina, lisina, homolisina y leucina, y/o

e) el modificador biológico está unido covalentemente al péptido escindible enzimáticamente en una posición que no está entre dos aminoácidos unidos covalentemente a un fluoróforo o un inactivador, y/o

f) los fluoróforos son iguales, o

g) los fluoróforos son distintos, y/o

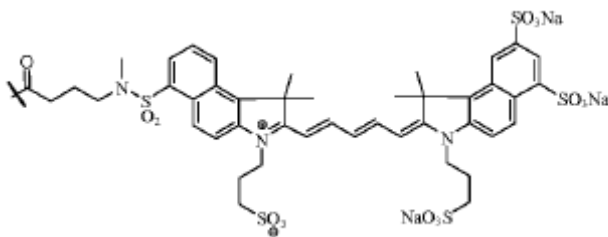
h) el modificador biológico está unido covalentemente al oligopéptido escindible enzimáticamente a través de un resto acilo, o

i) el modificador biológico está unido covalentemente al oligopéptido escindible enzimáticamente por una reacción de acoplamiento de amida entre el modificador biológico y el extremo C terminal del oligopéptido escindible enzimáticamente, o

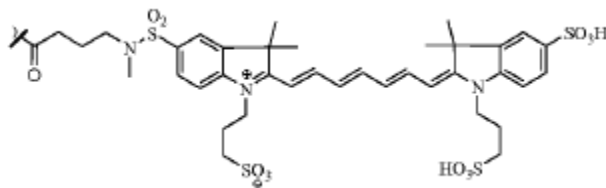
j) el modificador biológico está unido covalentemente al oligopéptido escindible enzimáticamente por una reacción de acoplamiento de tiol entre el modificador biológico y el extremo C terminal del oligopéptido escindible enzimáticamente, y/o

k) el oligopéptido escindible enzimáticamente es escindible por al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en una catepsina, una metaloproteinasas de la matriz, una peptidasa, una carboxipeptidasa, una glicosidasa, una lipasa, una fosfolipasa, una fosfatasa, una fosfodiesterasa, una sulfatasa, una reductasa y una enzima bacteriana.

5.-El agente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos un fluoróforo, cuando está unido covalentemente al oligopéptido es:



o



6. El agente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en imaginología óptica *in vivo*, en el que la imaginología comprende:
- (a) administrar a un sujeto un agente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
  - 5 (b) dejar que el agente se distribuya en el sujeto;
  - (c) exponer el sujeto a luz de una longitud de onda absorbible por al menos un fluoróforo en el agente; y
  - (d) detectar una señal emitida por el fluoróforo.
7. El agente según la reivindicación 6, en el que la señal emitida se usa para construir una imagen.
8. El agente según la reivindicación 6, en el que la imagen es una imagen tomográfica.
- 10 9. El agente según la reivindicación 8, en el que las etapas (c) - (d) se repiten a intervalos predeterminados para permitir de este modo la evaluación de las señales emitidas desde el agente en el sujeto en el tiempo.
10. El agente según la reivindicación 6, en el que
- i) las etapas (a) - (d) se repiten a intervalos predeterminados para permitir de este modo la evaluación de las señales emitidas desde el agente en el sujeto en el tiempo, o
  - 15 ii) el sujeto es un animal o un ser humano.
11. El agente según la reivindicación 6, en el que
- i) en la etapa (a), se administran a un sujeto dos o más agentes de imaginología cuyas propiedades de señal son distinguibles entre sí, o
  - 20 ii) las etapas de exposición y detección se llevan a cabo usando un endoscopio, catéter, sistema tomográfico, sistema de imaginología óptica manual, o un microscopio intraoperatorio.
12. El agente según la reivindicación 6, en el que
- i) la presencia, ausencia o nivel de señal emitida es indicativo de un estado de enfermedad, o
  - 25 ii) el agente se usa para detectar y/o monitorizar una enfermedad, tal como en la que la enfermedad está seleccionada del grupo que consiste en enfermedad ósea, cáncer, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, reestenosis, isquemia cardíaca, lesión por reperfusión miocárdica, enfermedad ambiental, enfermedad dermatológica, enfermedad inmunológica, enfermedad hereditaria, enfermedad infecciosa, enfermedad inflamatoria, enfermedad metabólica, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad oftálmica y enfermedad respiratoria.
13. El agente según la reivindicación 6, en el que en la etapa (a), se administran al sujeto células marcadas con el agente, tal como en la que la señal emitida por el agente se usa para monitorizar el tráfico y localización de las células.
- 30 14. Un procedimiento de imaginología *in vitro*, comprendiendo el procedimiento:
- (a) poner en contacto una muestra con un agente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
  - (b) dejar que el agente se una a, o se asocie con una diana biológica;
  - 35 (c) opcionalmente, retirar el agente no unido; y
  - (d) detectar una señal emitida desde el fluoróforo para determinar de este modo si el agente ha sido activado por, o se ha unido a la diana biológica.
15. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que la muestra es una muestra biológica.

FIGURA 1

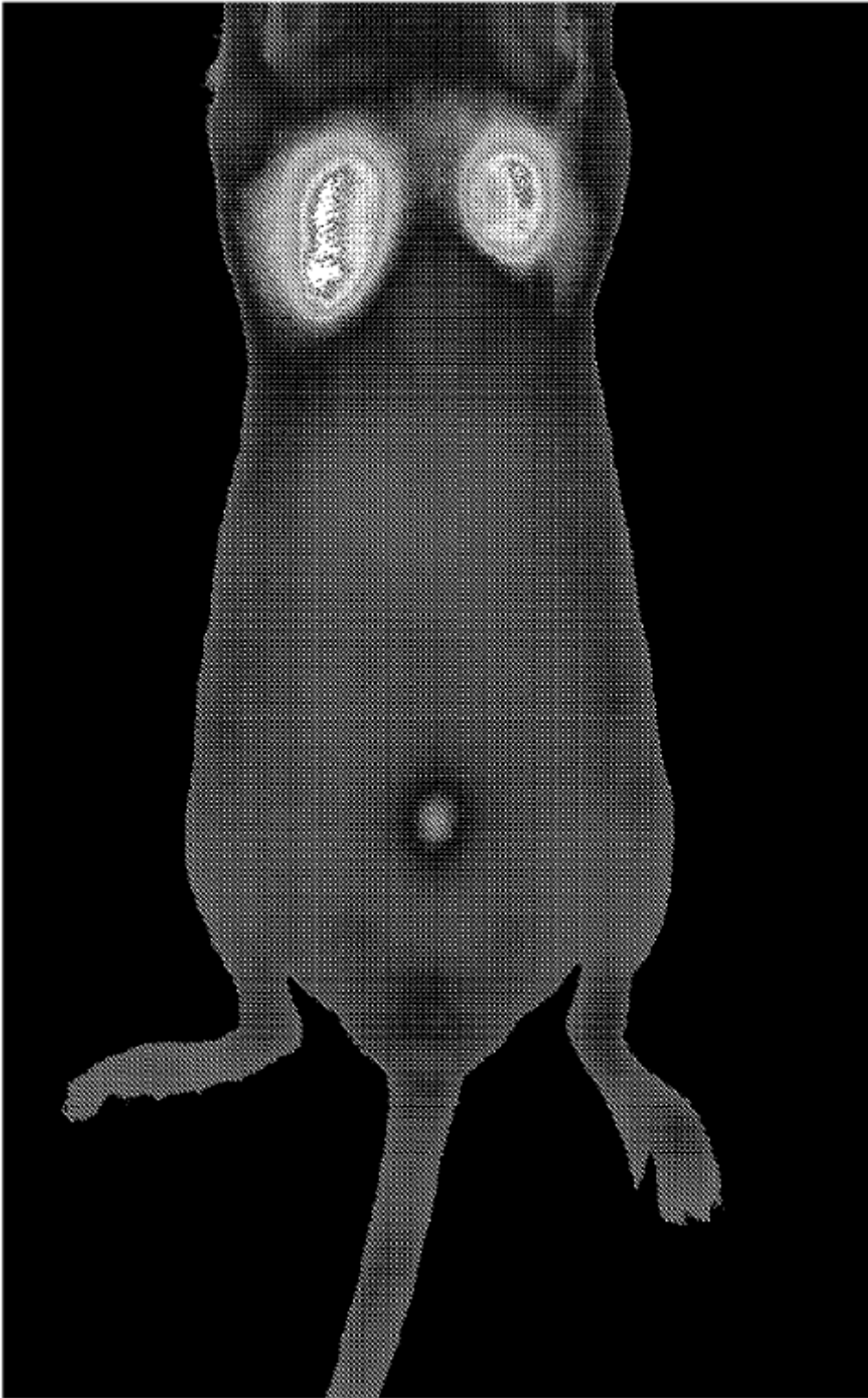


FIGURA 2

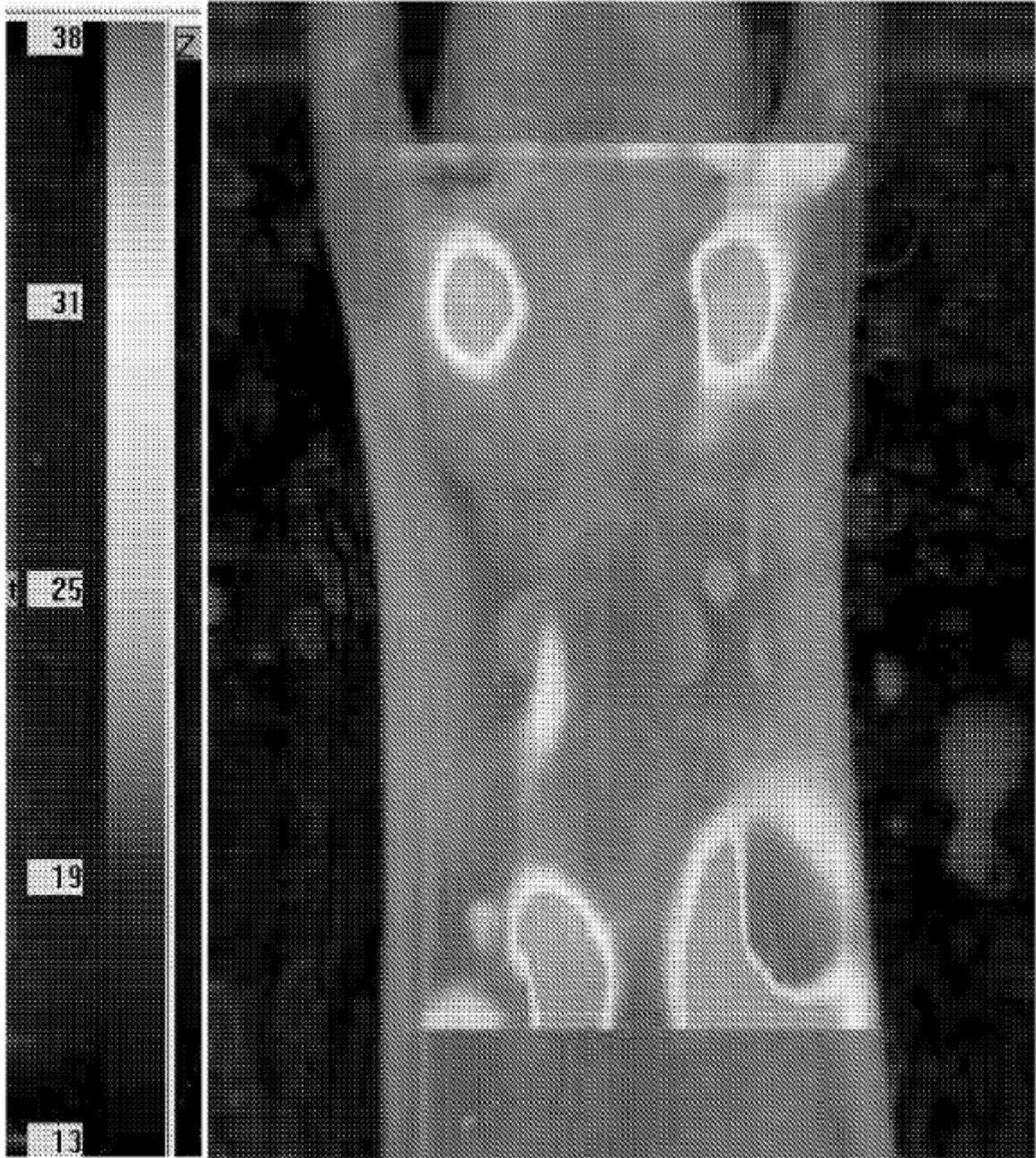


FIGURA 3

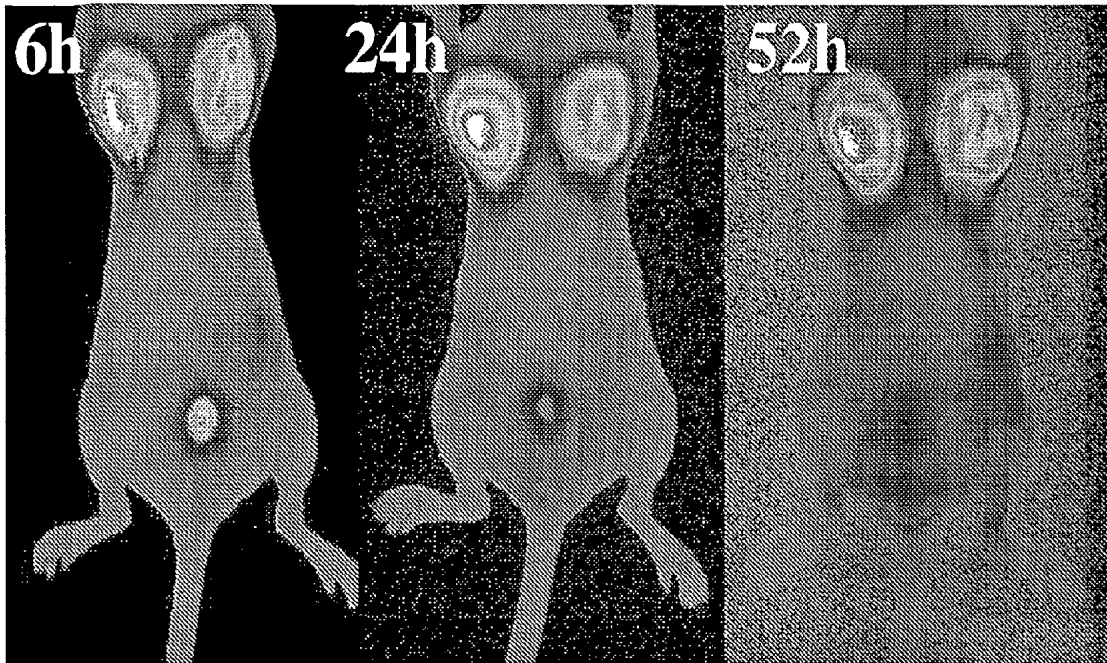
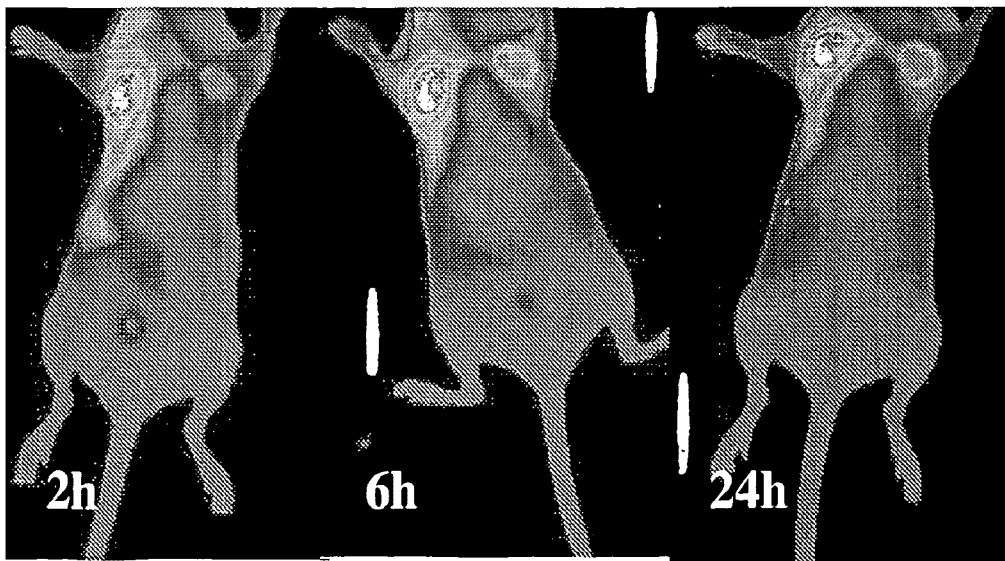
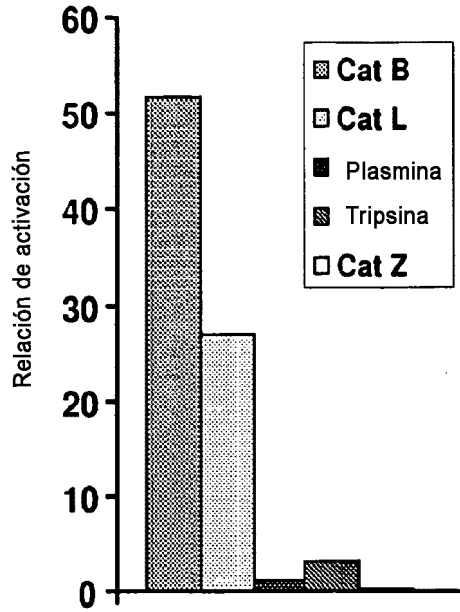


FIGURA 4





**FIGURA 5**  
**Activación enzimática**



**FIGURA 6**

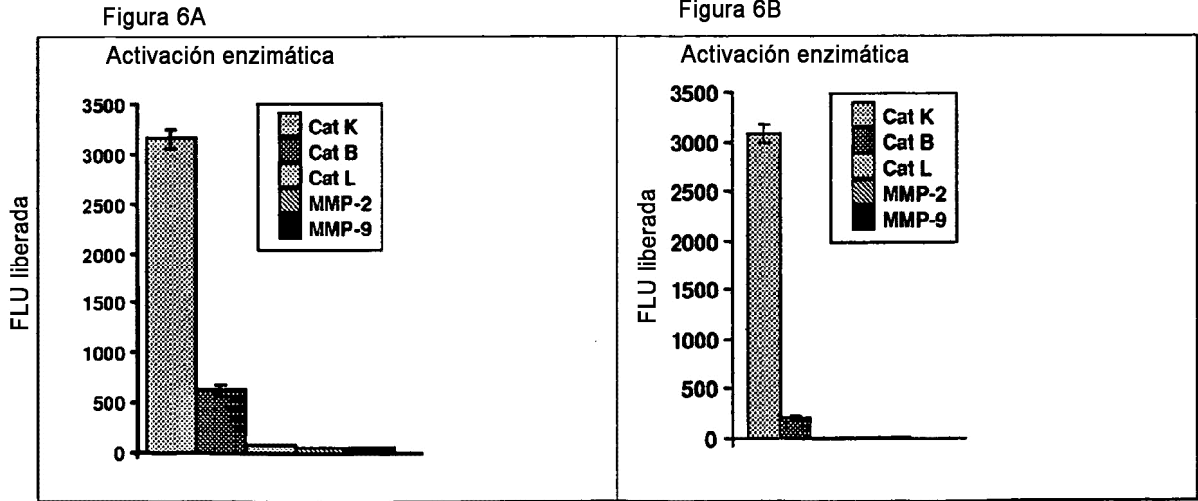


FIGURA 7

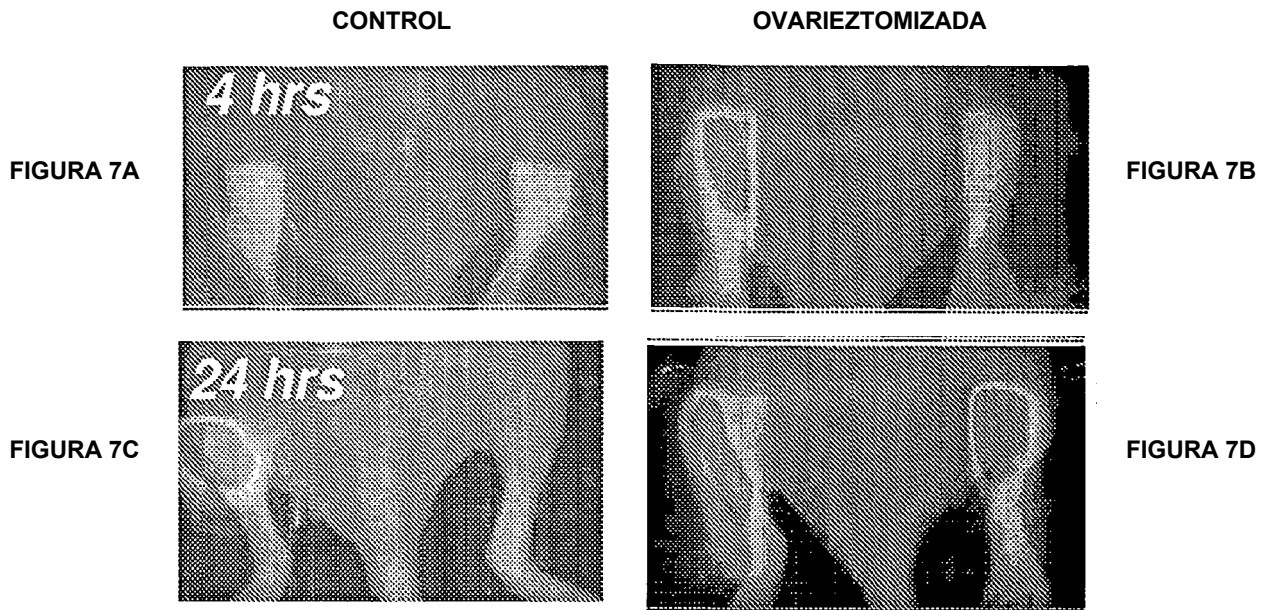


FIGURA 7E

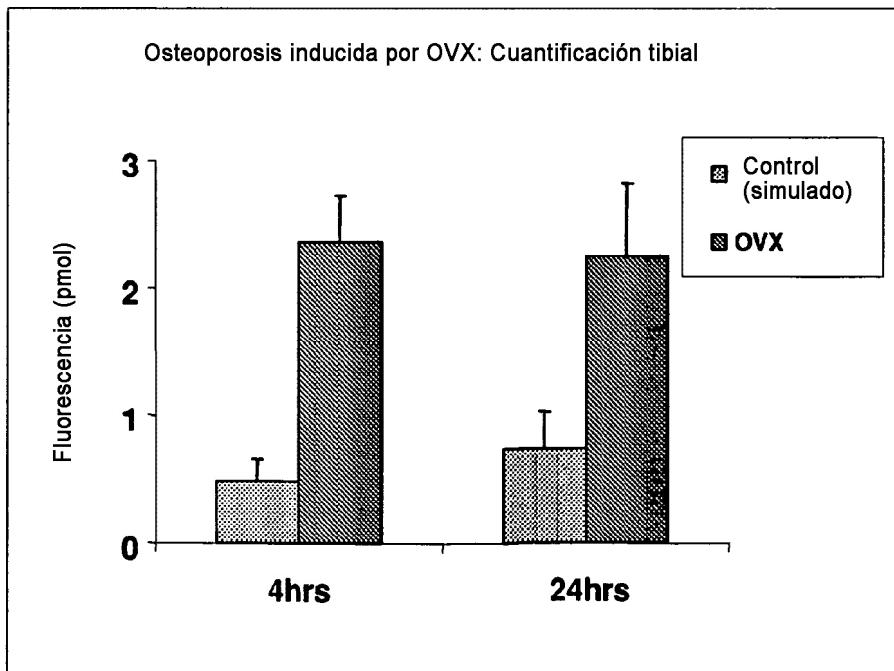


FIGURA 8

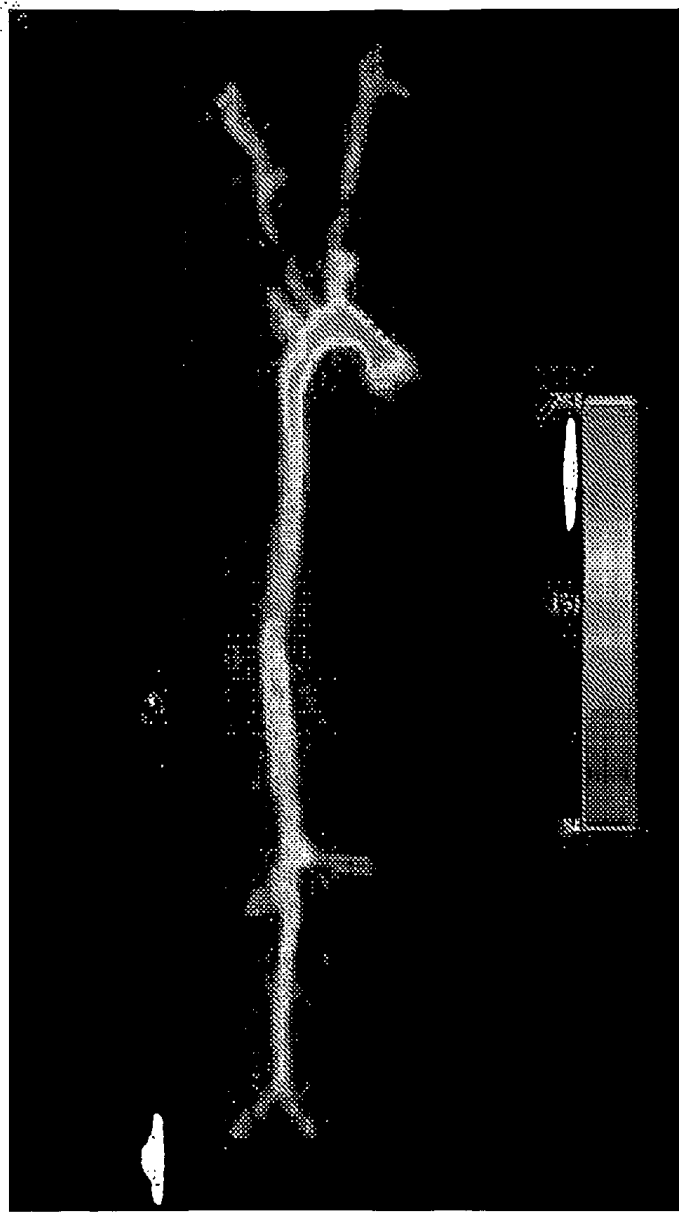


FIGURA 9

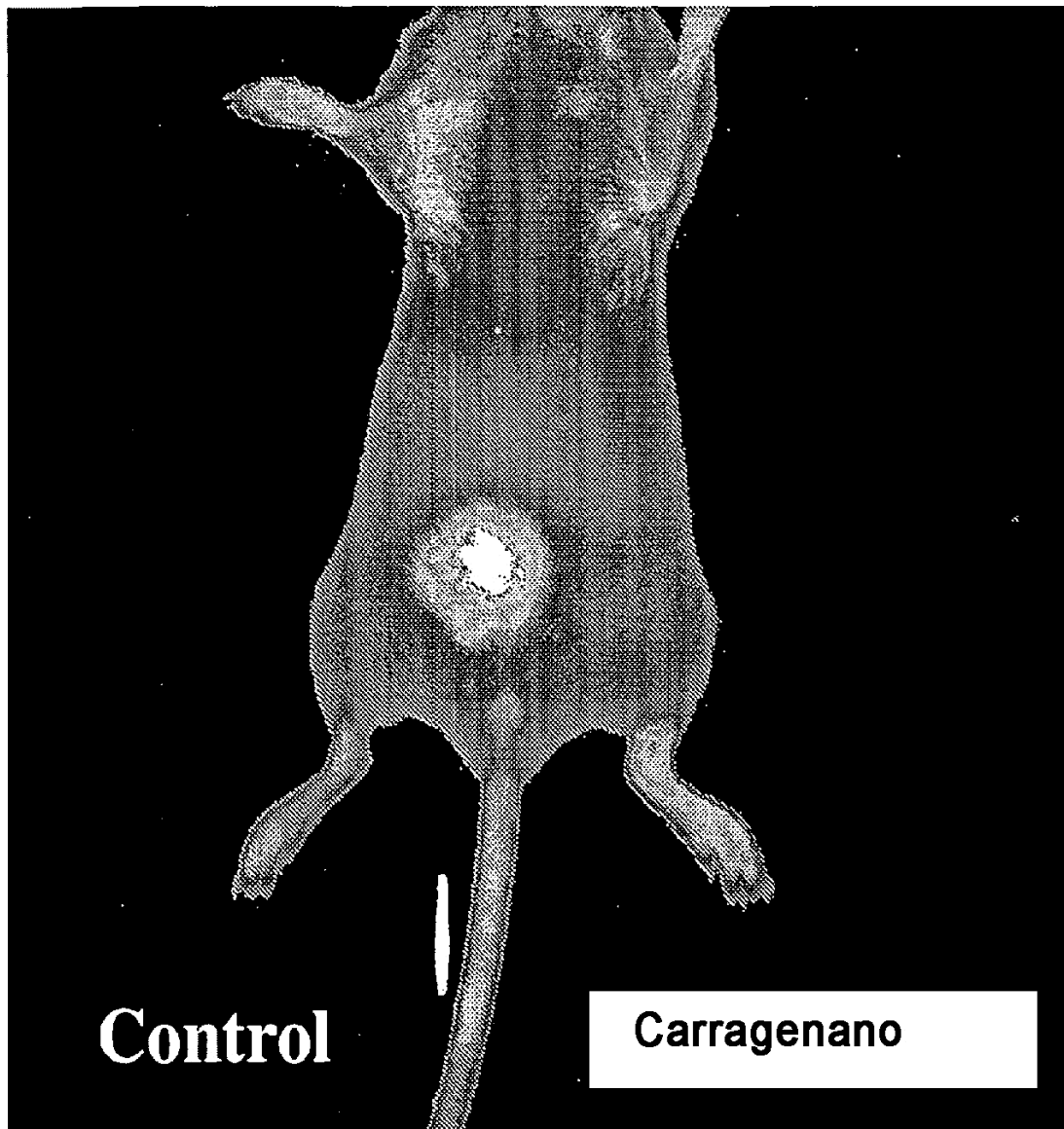


FIGURA 10

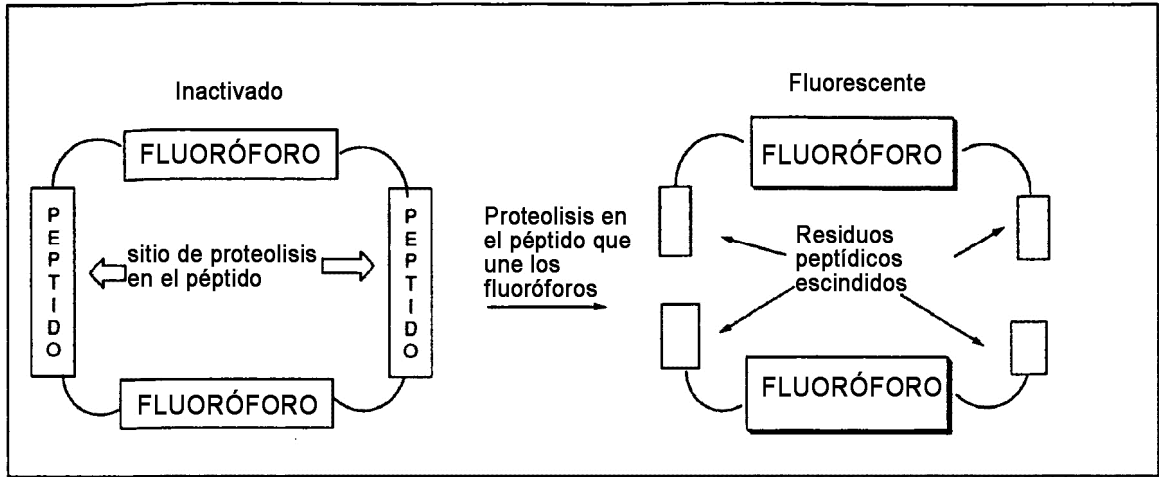


FIGURA 11

FIGURA 11A

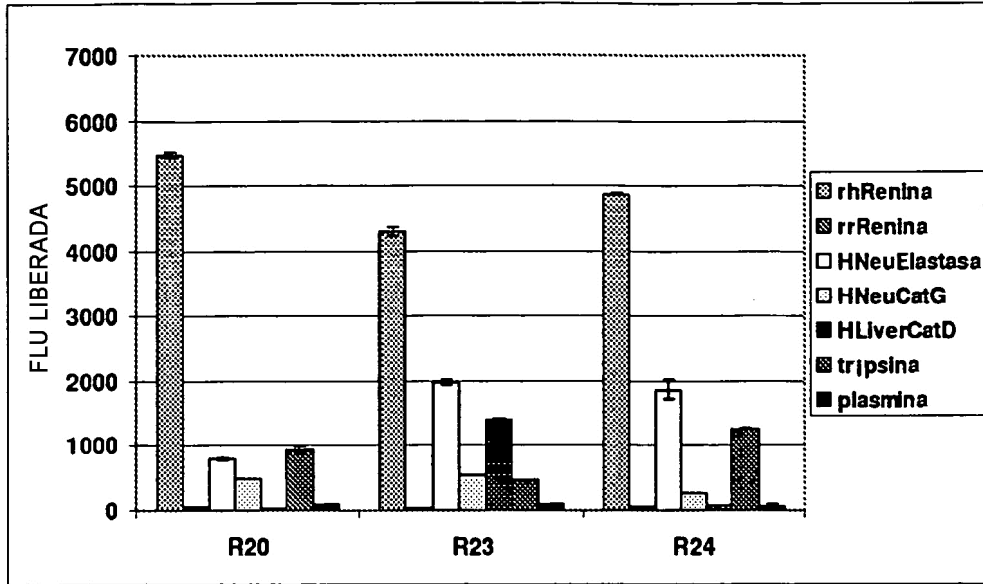


FIGURA 11B

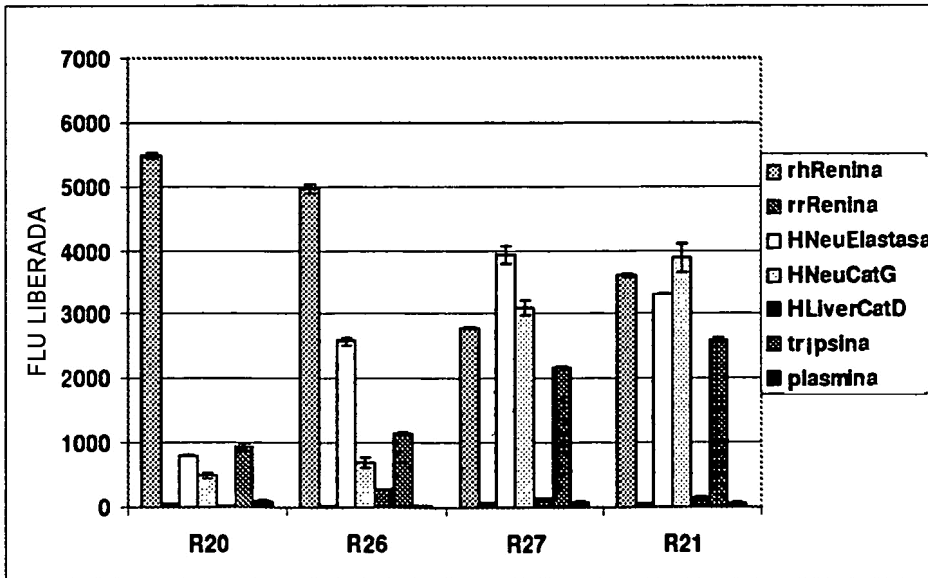


FIGURA 12

DIETA CONTROL

DIETA CON BAJO CONTENIDO EN SODIO

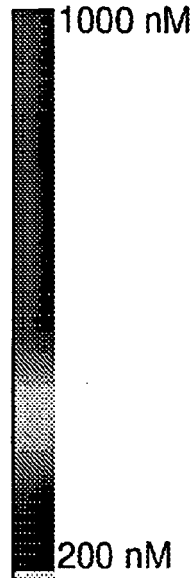
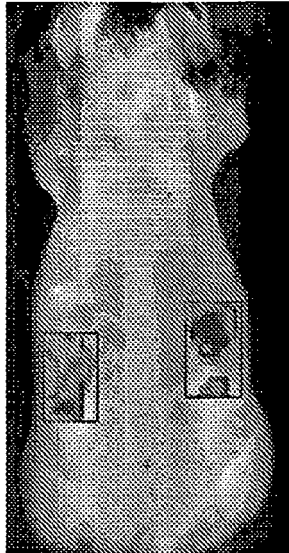
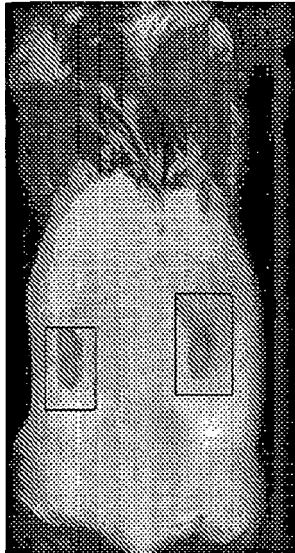


FIGURA 12A

FIGURA 12 B

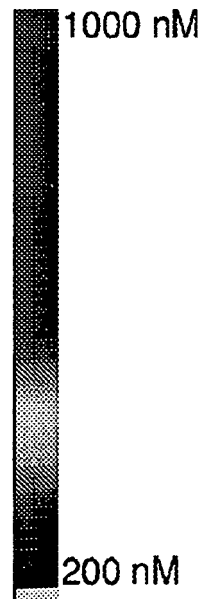
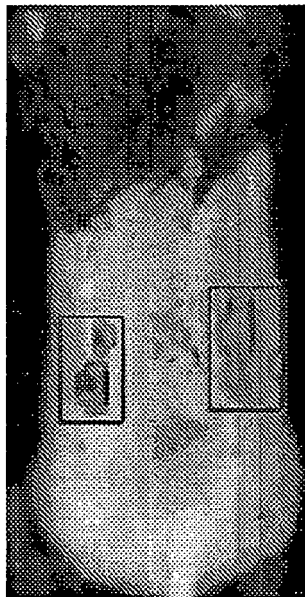
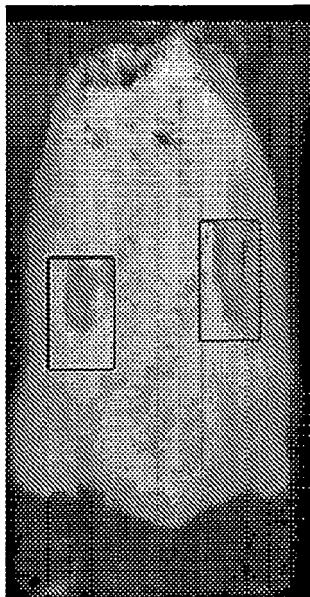
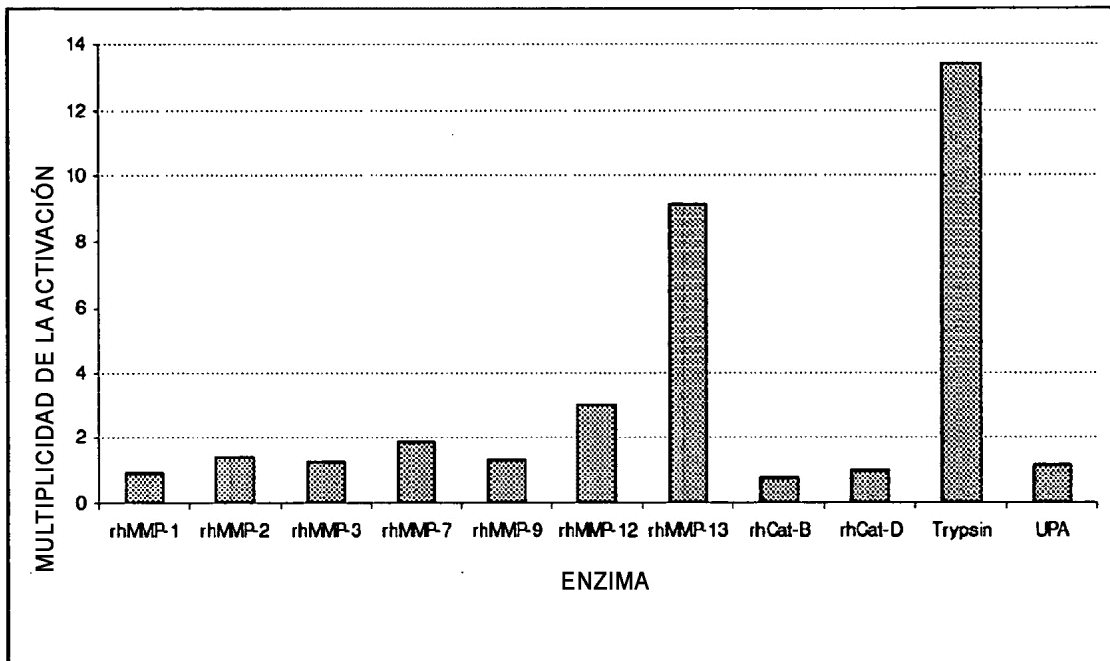


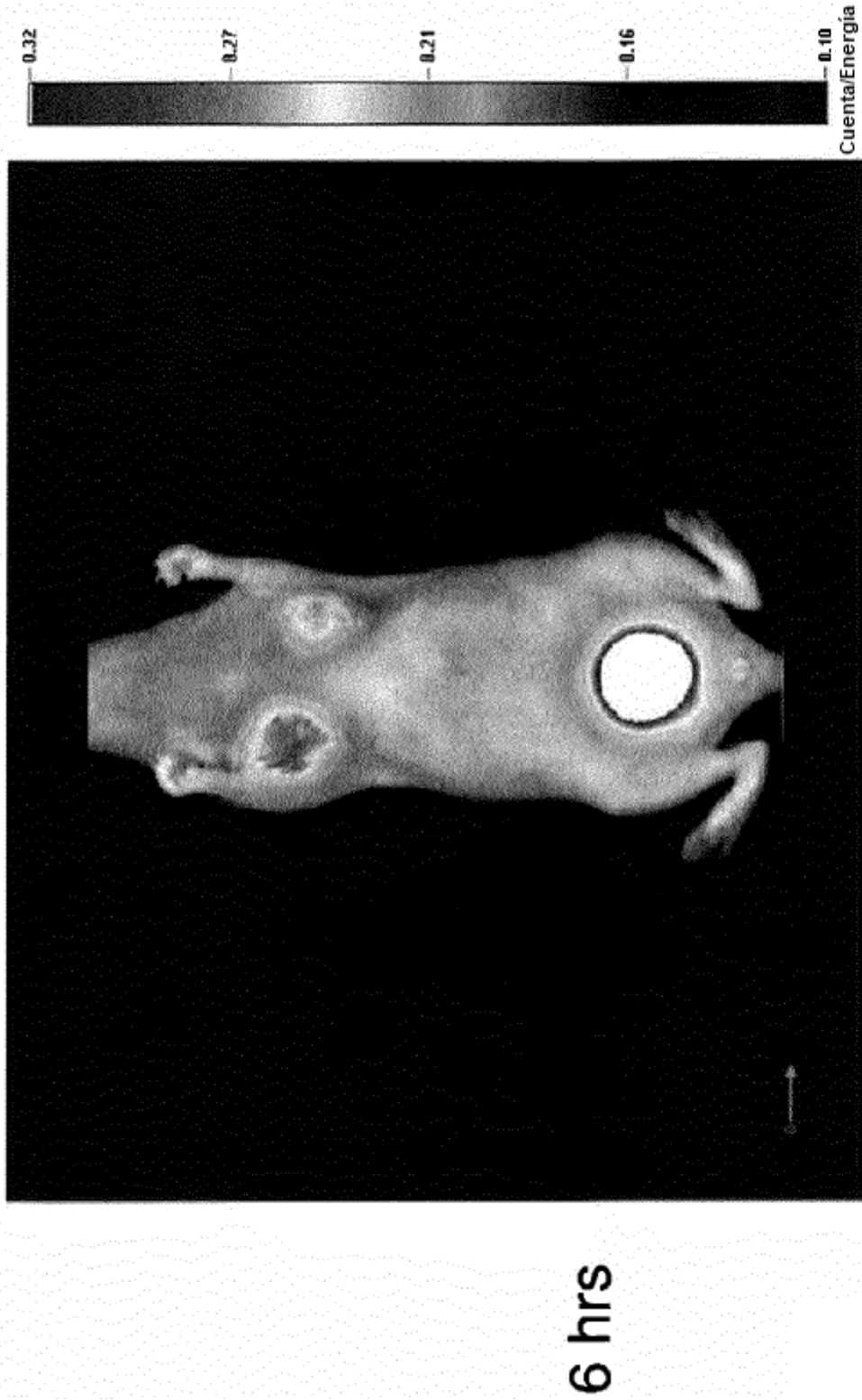
FIGURA 12C

FIGURA 12 D

FIGURA 13







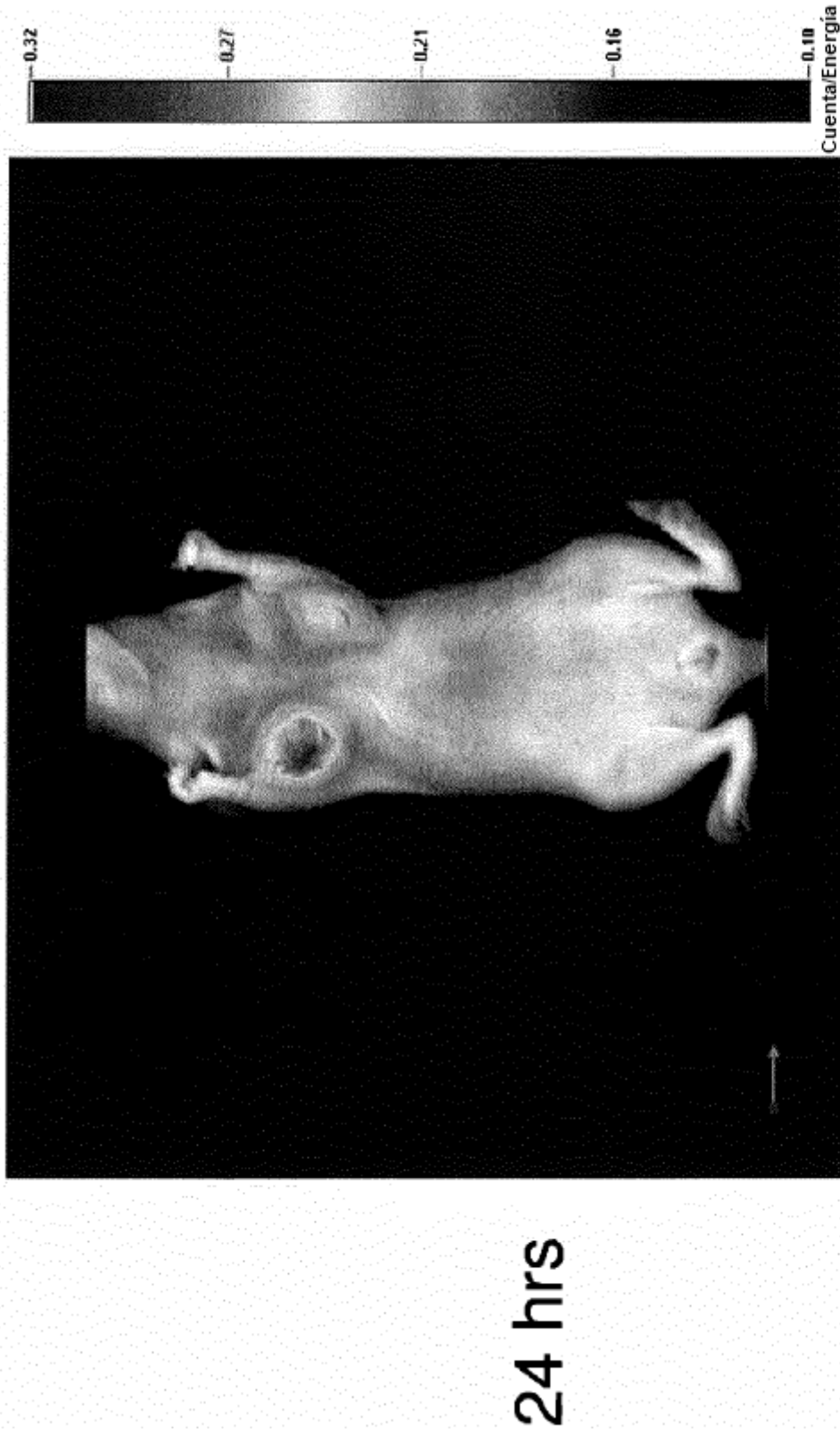


FIGURA 14B

Reflectancia

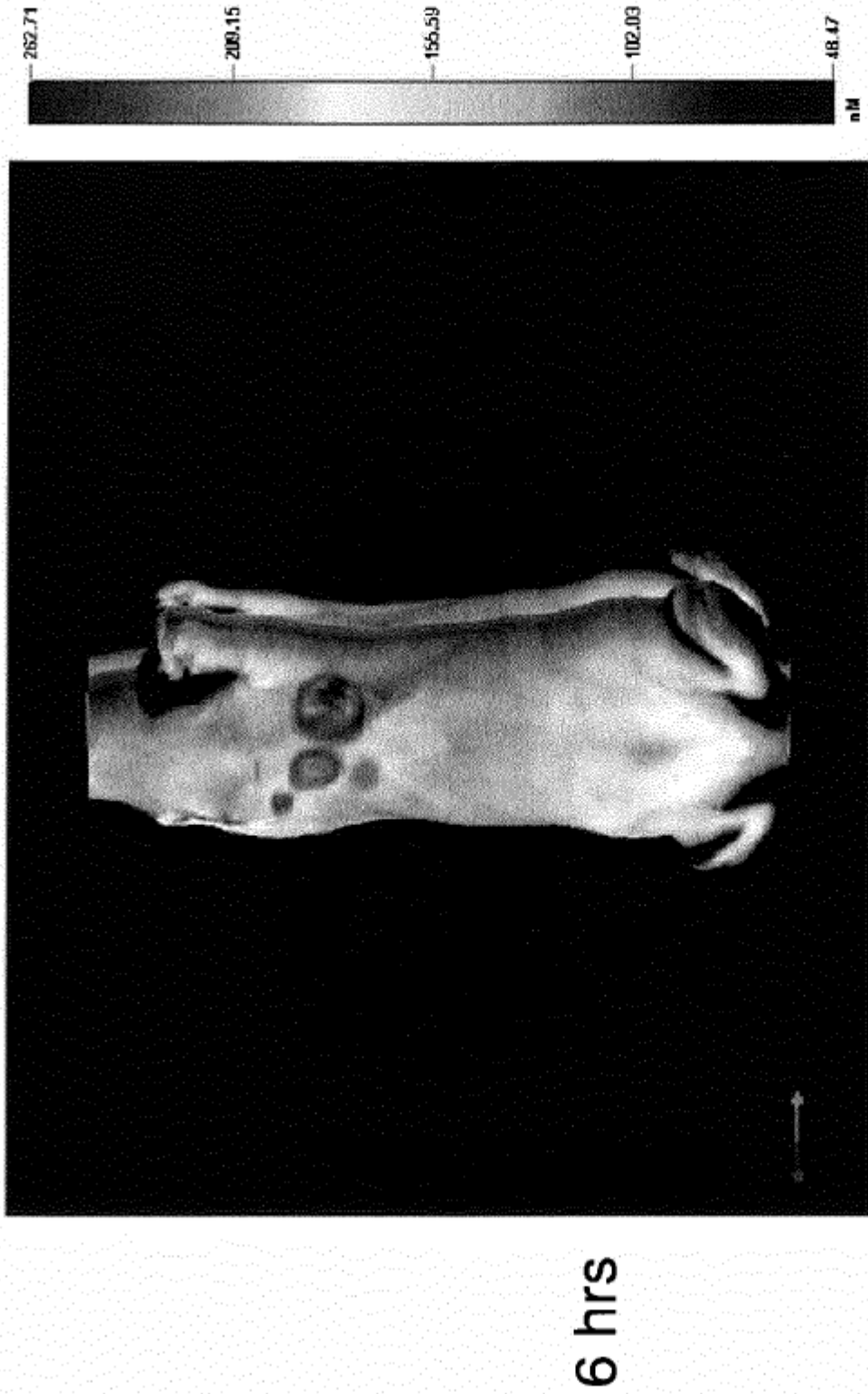
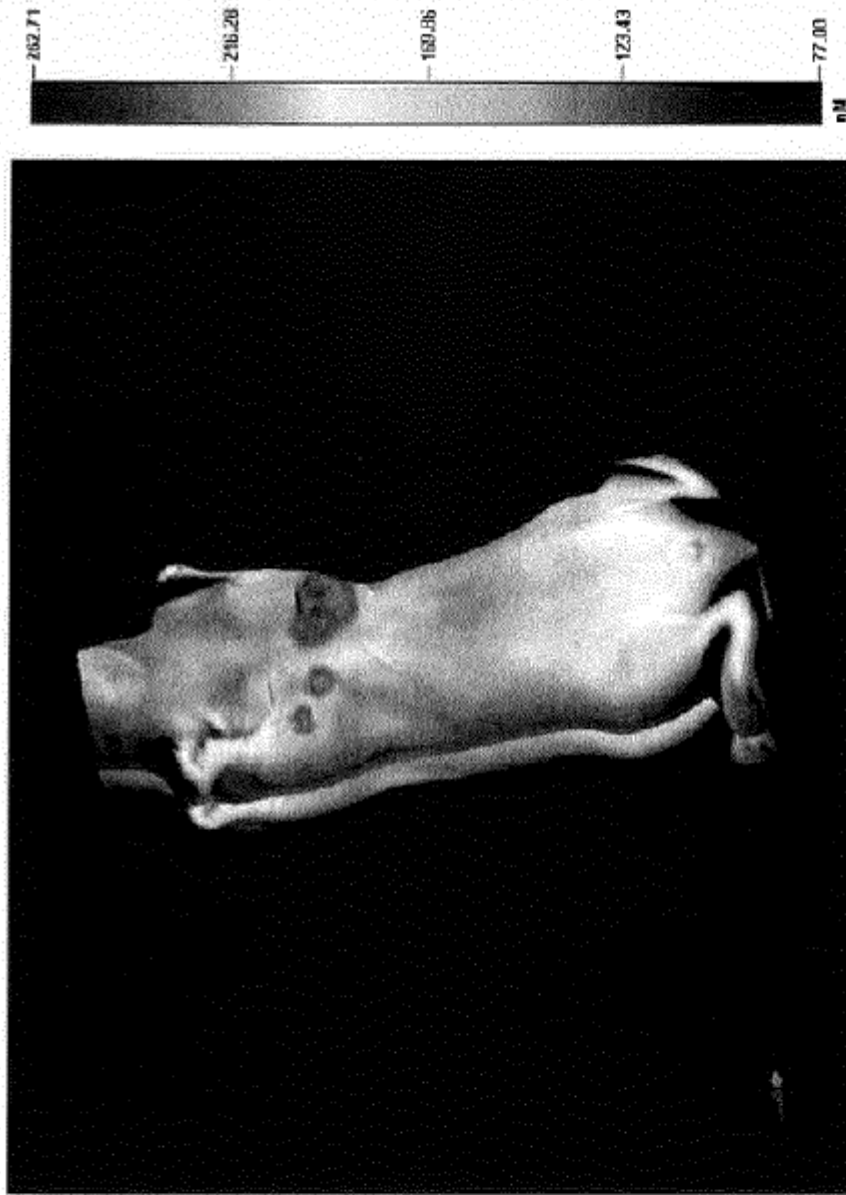


FIGURA 14C

Tomografia

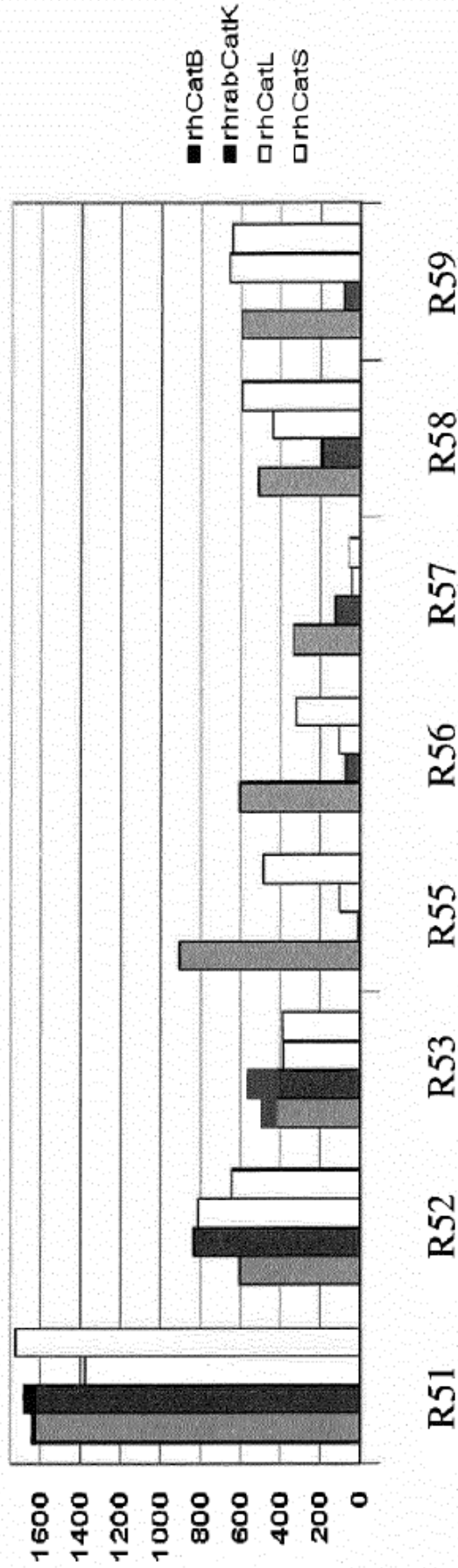


24 hrs

FIGURA 14D

Tomografia

FIGURA 15



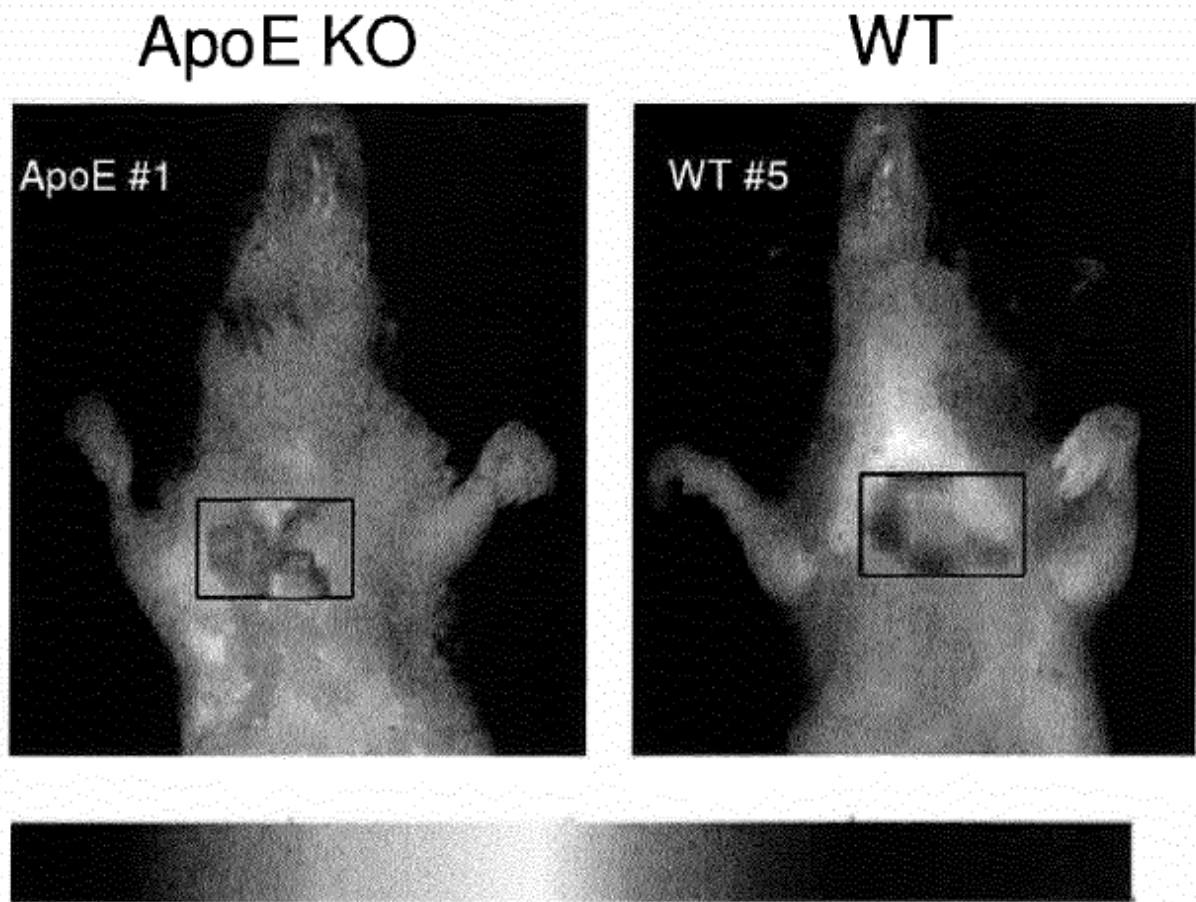


Figura 16A

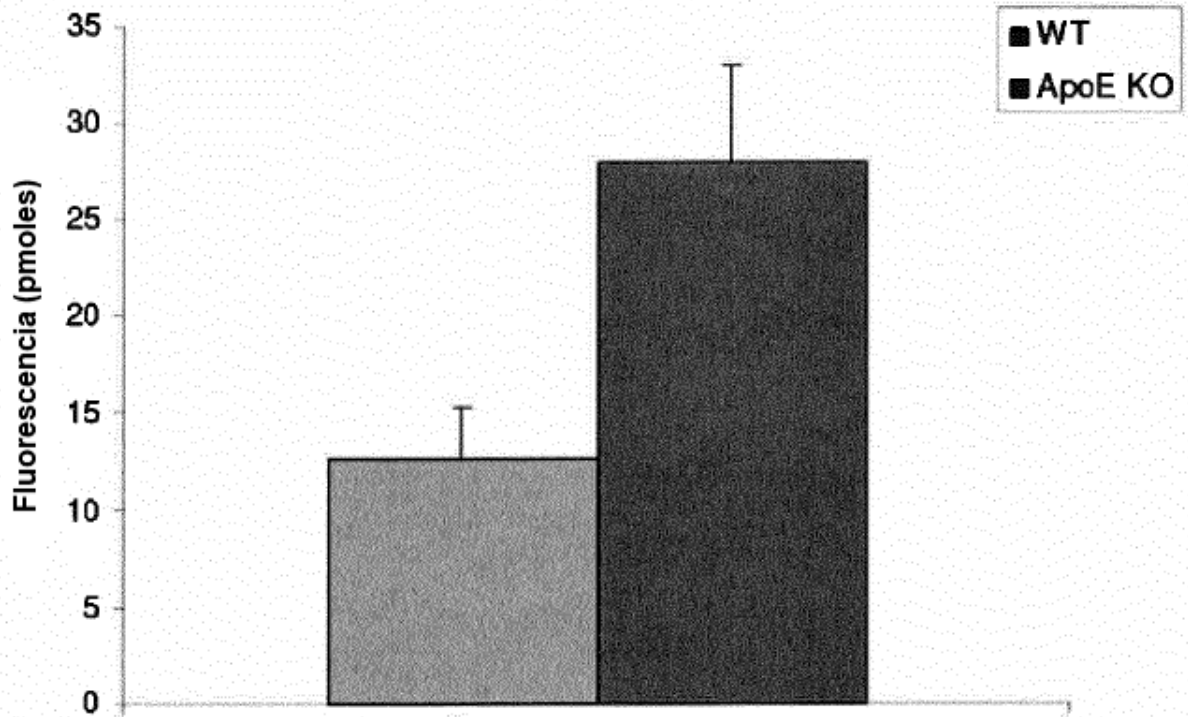


Figura 16B

FRI

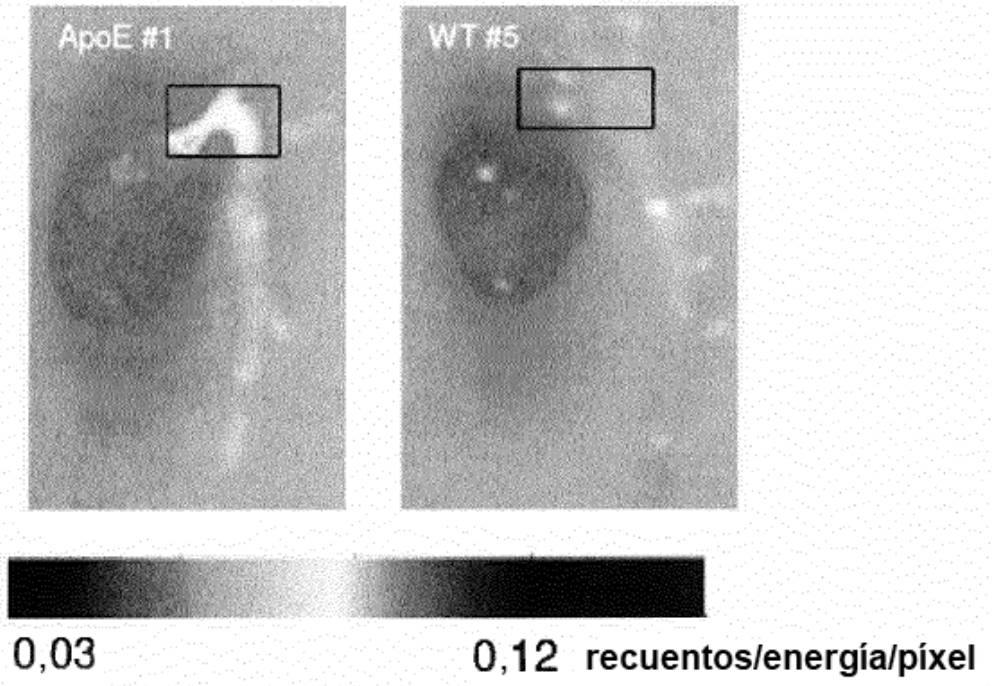


Figura 16C



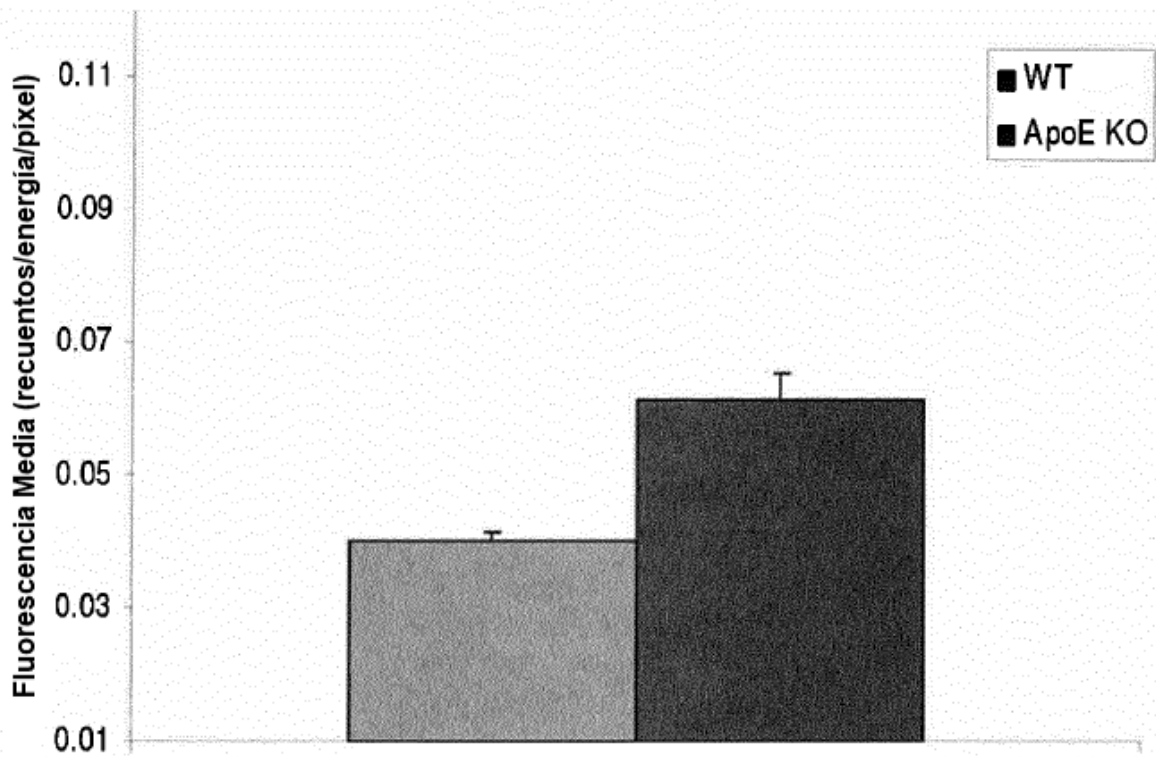


Figura 16D

FIGURA 17

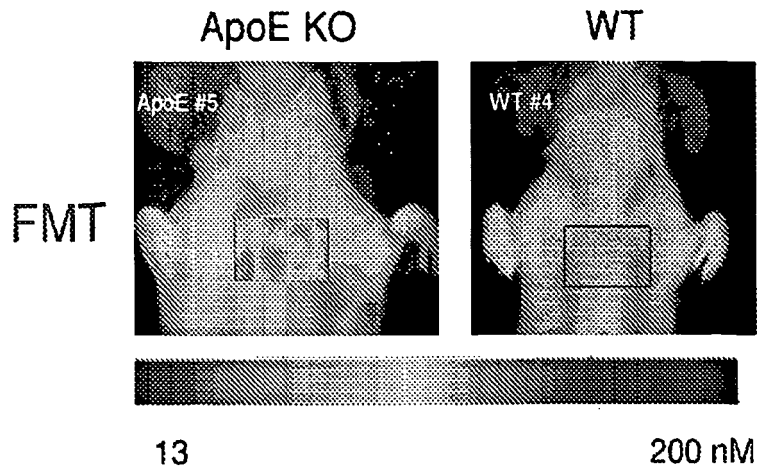


FIGURA 17A

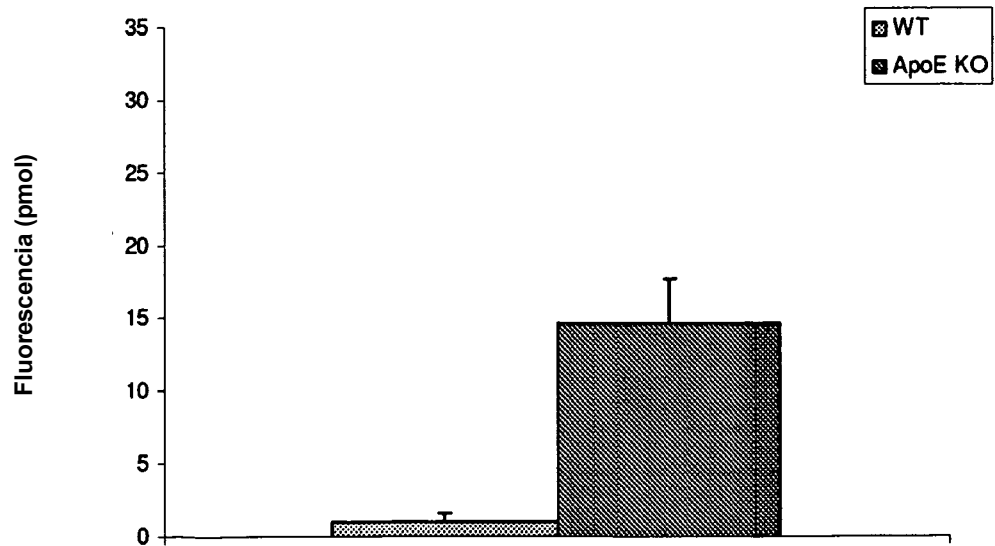


FIGURA 17B