

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 029**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/085 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2015 PCT/US2015/025700**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15160770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2015 E 15779171 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2022 EP 3131566**

54 Título: **Péptidos de unión a integrina pegilados biterminales y métodos para su uso**

30 Prioridad:

15.04.2014 US 201461979997 P

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

05.12.2022

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
Office of Technology Transfer, 1111 Franklin
Street, 5th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**HAUSNER, SVEN H. y
SUTCLIFFE, JULIE L.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 930 029 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos de unión a integrina pegilados biterminales y métodos para su uso

5 Antecedentes de la invención

- Las integrinas son una gran familia de receptores de la superficie celular responsables de mediar la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC). Hay al menos 24 integrinas diferentes, cada heterodímero compuesto de una subunidad α y β , cuya expresión se determina por varios factores que incluyen el tipo de tejido, la fase de desarrollo y diferentes patologías tisulares tales como inflamación y cáncer. Aunque no poseen ninguna actividad enzimática intrínseca, posterior a la unión del ligando, las integrinas traducen señales extracelulares en señales intracelulares yuxtaponiendo un complejo de la estructura citoplasmática y las moléculas de señalización que, a continuación, interactúan y determinan la respuesta celular. Ya que las integrinas están implicadas en la mayoría de los elementos del comportamiento celular incluyendo la motilidad, la proliferación, la invasión y la supervivencia, se ha informado ampliamente de sus papeles en la enfermedad. De hecho, se cree que algunas integrinas desempeñan un papel activo en el fomento de ciertas enfermedades incluido el cáncer. Por ejemplo, la integrina $\alpha_v\beta_3$ ha estado implicada en el fomento del fenotipo invasivo del melanoma y el glioblastoma, debido a sus múltiples capacidades incluida la regulación al alza de las metaloproteinasas proinvasivas así como la proporción de las señales promigratorias y de supervivencia. Puesto que $\alpha_v\beta_3$ también se regula al alza en las células endoteliales de los vasos sanguíneos angiogénicos y puede proporcionar señales similares para el desarrollo de neovasos en el cáncer, tales datos han conducido a muchos centros farmacéuticos y académicos a desarrollar antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ para fines terapéuticos, muchos de los cuales han sido péptidos o peptidomiméticos. Por tanto, entender la base estructural de las interacciones integrina-ligando ayudaría en el diseño de mejores antagonistas de integrina.
- El receptor integrina $\alpha_v\beta_6$ se expresa solo en las células epiteliales. Esta integrina está implicada en procesos tanto normales como patológicos. Por ejemplo, $\alpha_v\beta_6$ se regula al alza mediante células epiteliales durante la curación de heridas y la inflamación. Es probable que la capacidad de $\alpha_v\beta_6$ de activar localmente TGF- β mediante la unión a su propéptido protector, el péptido asociado a la latencia (LAP), explica la función de esta integrina en estas patologías transitorias. Por tanto, TGF- β puede suprimir las respuestas inflamatorias y la proliferación epitelial, indicando que $\alpha_v\beta_6$ sirve como control negativo para enfriar estos procesos. Sin embargo, la inflamación crónica puede conducir a un exceso de activación dependiente de $\alpha_v\beta_6$ de TGF- β , dando como resultado fibrosis en el pulmón de animales experimentales. Como resultado, algunas patologías que dan como resultado fibrosis en seres humanos también pueden implicar activación de TGF- β dependiente de $\alpha_v\beta_6$. La sobreexpresión de $\alpha_v\beta_6$ constitutiva en la piel de ratones da como resultado heridas crónicas que aparecen sobre un número significativo de animales transgénicos. Así, las heridas crónicas asociadas a las enfermedades humanas (por ejemplo, ciertas formas de epidermolisis bullosa) también pueden fomentarse o exacerbarse mediante la regulación al alza de $\alpha_v\beta_6$ expresada por los queratinocitos de la herida.
- Recientemente, ha llegado a estar claro que la integrina $\alpha_v\beta_6$ es una nueva diana principal en el cáncer. Aunque $\alpha_v\beta_6$ es específica de epitelio, es débil o indetectable en la mayoría de los tejidos epiteliales restantes pero fuertemente se regula al alza en muchos tipos de cáncer, con frecuencia en el frente invasivo. Por ejemplo, $\alpha_v\beta_6$ es altamente regulada al alza en carcinoma oral de células escamosas (COCE), cáncer pancreático, cáncer de ovario y cáncer de colon. Se ha demostrado que $\alpha_v\beta_6$ puede fomentar la invasión del carcinoma mediante la regulación al alza de las metaloproteinasas y el fomento de la movilidad aumentada de modo que la supervivencia de las células del carcinoma se fomentan mediante la regulación al alza de Akt. Estos datos indican que $\alpha_v\beta_6$ fomentan activamente el fenotipo invasivo. También se ha demostrado que la alta expresión de $\alpha_v\beta_6$ se correlaciona con una reducción significativa en la supervivencia media mediante pacientes de cáncer de colon.
- Además, la integrina $\alpha_v\beta_6$ se ha identificado como receptor para el virus de la enfermedad de pies y boca (FMDV) *in vitro* mediante la unión a través de un motivo RGD en la proteína de la cápside vírica, VP1. Los estudios estructurales han revelado que uno de los modos mediante los cuales se une FMDV a las células es a través de un bucle pequeño que contiene 31 aminoácidos sobre su cobertura proteica. Este bucle FMDV se une a $\alpha_v\beta_6$ con alta selectividad y especificidad. La publicación PCT N.º WO 07/039728 describe un péptido que se dirige a $\alpha_v\beta_6$ radiomarcado, A20FMDV2, que consiste en 20 aminoácidos núcleo del bucle FMDV, que se une a $\alpha_v\beta_6$ humana inmovilizada con alta especificidad y selectividad en los ensayos de unión ELISA competitivos. La capacidad de A20FMDV2 radiomarcado para obtener imágenes de tumores humanos que expresan $\alpha_v\beta_6$ también se evaluó usando PET en un modelo de ratón nu/nu atímico. Sin embargo, estos estudios *in vivo* mostraron rápido metabolismo del péptido que se dirige a $\alpha_v\beta_6$ radiomarcado. De hecho, mediante una hora, la radiactividad en la orina se distribuyó aproximadamente de manera igual entre los tres metabolitos y no se detectó péptido sin metabolizar. También se observó el lavado de la radiactividad del tumor que expresa $\alpha_v\beta_6$. En concreto, el porcentaje de dosis inyectada de péptido por gramo del tumor (% ID/g) era de 0,66, 0,28 y 0,06 a 1, 2 y 4 horas después de la inyección, respectivamente.
- En vista de lo anterior, existe una necesidad en la técnica de agentes que se dirigen al tumor que no solo proporcionen alta selectividad y especificidad tumoral para los tumores que expresan $\alpha_v\beta_6$, sino también capacidad para tener estabilidad metabólica aumentada y retención en los tumores que expresan $\alpha_v\beta_6$. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona también ventajas relacionadas.

Breve resumen

La presente invención proporciona conjugados peptídicos PEGilados biterminales que se dirigen a integrina $\alpha_v\beta_6$. En aspectos particulares, los conjugados peptídicos de la presente invención comprenden además un agente biológico tal como un agente de obtención de imágenes o un agente terapéutico, por ejemplo, covalentemente unido a una de las fracciones de PEG. Los conjugados peptídicos de la presente invención son particularmente útiles para la obtención de imágenes de un tumor que contiene integrina $\alpha_v\beta_6$, órgano o tejido y para tratar enfermedades y trastornos mediados por integrina $\alpha_v\beta_6$ tales como cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema de pulmón y dermatopatía de herida crónica. Las composiciones y los kits que contienen los conjugados peptídicos de la presente invención encuentran utilidad en un amplio rango de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, diagnóstico por imágenes *in vivo* e inmunoterapia.

En una realización, la presente invención proporciona un conjugado que comprende:

- (a) un péptido que se une específicamente a una integrina $\alpha_v\beta_6$, en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos RGD $X_1X_2X_3$, en donde X_1 y X_2 son aminoácidos independientemente seleccionados y X_3 es L o I;
- (b) una primera fracción de polietilenglicol (PEG) covalentemente unida al extremo amino del péptido; y
- (c) una segunda fracción de PEG covalentemente unida al extremo carboxilo del péptido, en donde la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG tienen cada una un peso molecular de menos de aproximadamente 3.000 daltons (Da).

En la invención, la integrina es $\alpha_v\beta_6$. En la invención, el péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ comprende la secuencia de aminoácidos RGD $X_1X_2X_3$, en donde X_1 y X_2 son aminoácidos independientemente seleccionados y X_3 es L o I. En determinadas realizaciones, X_1 es Q, X_2 es V y X_3 es L. En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos RGD $X_1X_2X_3$ AQ X_6 , en donde X_6 es K o R. En determinados casos, X_6 es R. En otros aspectos, el péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ comprende secuencia de aminoácidos RSDLTPLFX $_7$, en donde X_7 está ausente o es cualquier aminoácido. En determinados casos, X_7 está ausente (es decir, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos RSDLTPLF). En determinados otros casos, X_7 es K (es decir, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos RSDLTPLFK). En realizaciones preferidas, el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en NAVPNLRGDLQVLAQKVART (A20FMDV2) y NAVPNLRGDLQVLAQRVART (A20FMDV2 K16R). En aspectos alternativos, el péptido es un peptidomimético que se une a la integrina diana, por ejemplo, integrina $\alpha_v\beta_6$.

En otras realizaciones, el péptido se une a la integrina y un receptor que se expresa conjuntamente con la integrina. En determinados casos, el receptor que se expresa conjuntamente con la integrina es el receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4). En realizaciones adicionales, el péptido tiene entre aproximadamente 8 y aproximadamente 45 aminoácidos de longitud. En determinados casos, el péptido tiene 20 aminoácidos de longitud.

En algunos aspectos, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG tienen cada una un peso molecular de menos de aproximadamente 3.000 daltons (Da). En realizaciones preferidas, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG son fracciones de PEG monodispersas que tienen una longitud de cadena definida. Ejemplos no limitantes de las fracciones PEG que tienen una longitud de cadena definida incluyen pequeñas moléculas de PEG monodispersas que tienen más de aproximadamente un 95 % de pureza de oligómero. En determinados casos, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG se seleccionan independientemente del grupo que consiste en PEG $_{11}$, PEG $_{12}$ (PEG 800), PEG $_{28}$ (PEG 1500) y (PEG $_{28}$) $_2$ (PEG 1500x2). En realizaciones particulares, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG son iguales. En realizaciones preferidas, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG son ambas PEG $_{28}$ (PEG 1500).

En determinadas realizaciones, el conjugado comprende además un agente de obtención de imágenes o un agente terapéutico covalentemente unido al péptido, la primera fracción de PEG y/o la segunda fracción de PEG. En realizaciones particulares, el agente de obtención de imágenes o el agente terapéutico se une covalentemente a la primera fracción de PEG. En determinados casos, el agente de obtención de imágenes o el agente terapéutico se une covalentemente como la fracción más N-terminal en el conjugado.

En algunas realizaciones, el agente de obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, biotina, un fluoróforo, una proteína fluorescente, un anticuerpo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y/o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{19}F , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{124}I , ^{125}I e ^{131}I . En determinados casos, el radionúclido se une a través de un grupo prostético al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG. En algunos casos, el radionúclido se une a través de un grupo prostético como la fracción más N-terminal en el conjugado.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, un péptido proapoptótico, una nanopartícula, un agente quimioterapéutico, una nanogotita, un fármaco liposómico, una citocina y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico es un radionúclido seleccionado

del grupo que consiste en ^{90}Y y ^{177}Lu . En determinados casos, el radionúclido se une a través de un agente quelante al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG. En algunos casos, el radionúclido se une a través de un agente quelante como la fracción más N-terminal en el conjugado.

5 En otras realizaciones, el agente terapéutico es un péptido proapoptótico que comprende la secuencia de aminoácidos $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2$. En determinados casos, el péptido proapoptótico se une a través de un enlazador de glicina al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG. En casos particulares, el péptido proapoptótico se une, por ejemplo, a través de un conector de glicina, a la primera fracción de PEG.

10 En otras realizaciones adicionales, el agente terapéutico es una nanopartícula que comprende un almacén telodendrímico u otro sistema de nanovehículo basado en micela. En realizaciones particulares, el almacén de telodendrímico es $\text{PEG}^{5\text{K}}\text{CA}_8$. En determinados casos, la nanopartícula se carga con un agente quimioterapéutico. Ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen paclitaxel (PTX) y otros agentes quimioterapéuticos citotóxicos descritos en el presente documento.

15 En determinadas realizaciones, el conjugado comprende además un motivo de unión a albúmina covalentemente unido al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG. En realizaciones particulares, el motivo de unión a albúmina es el ácido 4-(4-iodofenil)butírico (IPA) o un homólogo del mismo con una cadena alquilo más corta tal como, por ejemplo, ácido 4-(4-iodofenil)propiónico o ácido 4-(4-iodofenil)acético. En determinados casos, el motivo de unión a albúmina está unido covalentemente a la primera y/o segunda fracción de PEG a través de un enlazador tal como un enlazador de ácido glutámico (E) u otro enlazador adecuado (por ejemplo, aminoácido o enlazador peptídico) conocido por el experto en la técnica. En determinadas realizaciones, el motivo de unión a albúmina es ácido ϵ -(4-(4-iodofenil)butil amida)lisina-glutámico ("K(IPA)E"), que corresponde a IPA que se une covalentemente a la cadena lateral del residuo de lisina de un enlazador peptídico lisina-ácido glutámico. En algunas realizaciones, el motivo de unión a albúmina K(IPA)E está covalentemente unido a la primera fracción de PEG. En otras realizaciones, el agente de obtención de imágenes o el agente terapéutico se une covalentemente (por ejemplo, a través de un grupo protético, un agente quelante, o un enlazador) a un motivo de unión a albúmina que está covalentemente unido a la primera fracción de PEG.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un conjugado peptídico PEGilado biterminal descrito en el presente documento o una pluralidad del mismo. En realizaciones particulares, la pluralidad de conjugados contiene fracciones de PEG monodispersas que tienen una longitud de cadena definida (por ejemplo, mayor que aproximadamente un 95 % de pureza de oligómero). En determinados casos, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG en cada uno de la pluralidad de conjugados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en PEG_{11} , PEG_{12} (PEG 800), PEG_{28} (PEG 1500) y $(\text{PEG}_{28})_2$ (PEG 1500x2). En realizaciones particulares, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG en cada uno de la pluralidad de conjugados son iguales. En realizaciones preferidas, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG en cada uno de la pluralidad de conjugados son ambas PEG_{28} (PEG 1500).

40 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona conjugados peptídicos multiméricos en donde una pluralidad de los conjugados están unidos entre sí. En realizaciones particulares, el conjugado multimérico es un dímero o un tetrámero de la pluralidad de conjugados. En determinadas realizaciones, los conjugados peptídicos multiméricos se forman a través de enlace entre la segunda fracción de PEG de cada conjugado. En algunos casos, los conjugados se unen entre sí en la segunda fracción de PEG a través de al menos un residuo de lisina. En otras realizaciones, la composición comprende además un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un kit para la obtención de imágenes o terapia, comprendiendo el kit:

50 (a) un conjugado peptídico PEGilado biterminal de la invención o una composición del mismo (por ejemplo, una pluralidad o multímero de conjugados); y
(b) direcciones para su uso del conjugado o la composición en obtención de imágenes o terapia.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un conjugado o composición de la invención para su uso en un método para la obtención de imágenes *in vivo* de un tejido diana que contienen integrina $\alpha_v\beta_6$, comprendiendo el método:

60 (a) administrar a un sujeto que necesite dicha obtención de imágenes el conjugado o la composición de la invención, en donde un agente de obtención de imágenes está unido covalentemente al péptido, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG; y
(b) detectar el conjugado para determinar dónde se concentra el conjugado en el sujeto.

En algunas realizaciones, el tejido diana es un tejido canceroso o un órgano. Ejemplos no limitantes de los tejidos cancerosos incluyen tejidos o tumores cancerosos asociados al cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer cervical y carcinoma oral de células escamosas. En realizaciones preferidas, el conjugado peptídico se administra para la obtención de imágenes de un tumor tal como un tumor pancreático.

En otras realizaciones, el conjugado peptídico se detecta por imágenes por resonancia magnética (MRI), espectroscopia de resonancia magnética (MRS), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), tomografía por emisión de positrones (PET) u obtención de imágenes ópticas. En otras realizaciones adicionales, el conjugado se detecta para el diagnóstico o el pronóstico de una enfermedad o trastorno mediado por la integrina. En determinadas realizaciones, la enfermedad o trastorno está asociado a la expresión, sobreexpresión y/o activación de la integrina. La enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno mediado por integrina $\alpha_v\beta_6$.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un conjugado o composición para su uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por integrina $\alpha_v\beta_6$ en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado peptídico PEGilado biterminal de la invención o una composición del mismo (por ejemplo, una pluralidad o multímero de conjugados), en donde un agente terapéutico está unido covalentemente al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG.

En determinadas realizaciones, la enfermedad o trastorno está asociado a la expresión, la sobreexpresión y/o la activación de la integrina $\alpha_v\beta_6$. Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos mediados por integrina $\alpha_v\beta_6$ incluyen cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema de pulmón y dermatopatía de herida crónica. En algunos casos, la enfermedad o trastorno mediado por integrina $\alpha_v\beta_6$ es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer cervical y carcinoma oral de células escamosas.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada y de las figuras.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las estructuras de las variaciones de PEGilación que se evalúan en los estudios descritos en el presente documento. Todos los compuestos se obtuvieron como amidas C-terminales.

La Figura 2 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **1** (18F-FBA-A20FMDV2) en tumores DX3puro β_6 que expresan integrina $\alpha_v\beta_6$ y tumores control DX3puro que no expresa.

La Figura 3 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **1** (18F-FBA-A20FMDV2) en tumores BxPC-3 (y MIA PaCa-2).

La Figura 4 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **2** (18F-FBA-PEG₂₈-A20FMDV2) en tumores DX3puro β_6 y Dx3puro.

La Figura 5 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **2** (18F-FBA-PEG₂₈-A20FMDV2) en tumores BxPC-3.

La Figura 6 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **3** (18F-FBA-PEG₂₈-PEG₂₈-A20FMDV2) en tumores DX3puro β_6 y Dx3puro.

La Figura 7 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **3** (18F-FBA-PEG₂₈-PEG₂₈-A20FMDV2) en tumores BxPC-3 (y MIA PaCa-2).

La Figura 8 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **4** (18F-FBA-A20FMDV2-PEG₂₈) en tumores DX3puro β_6 y Dx3puro.

La Figura 9 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **5** (18F-FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈) en tumores DX3puro β_6 y Dx3puro.

La Figura 10 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **5** (18F-FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈) en tumores BxPC-3.

La Figura 11 muestra la unión y la internalización de los radiotrazadores *in vitro* usando la línea celular Dx3puro β_6 que expresa $\alpha_v\beta_6$ (+) y su control Dx3puro que no expresa (-). Las gráficas, que muestran la fracción de la radiactividad total, representan los experimentos por cuadruplicado con $3,75 \times 10^6$ células para cada radiotrazador/línea celular después de un periodo de incubación de 60 minutos. Columnas rellenas: porcentaje de la radiactividad total detectada en la muestra celular (negro: unido total; gris: internalizado); barras: D.T. La prueba t de 2 colas no emparejadas de Student para el par DX3puro β_6 / Dx3puro: $P \leq 0,0001$ para los correspondientes conjuntos de datos entre las dos líneas celulares para cada una, datos de unido total e internalizado. Los datos para los compuestos **1-3** se reproducen de Hausner et al., *Cancer Res* 2009;69:5843-50.

La Figura 12 muestra los datos *in vivo* para el compuesto **1** determinado por los estudios de biodistribución en un

modelo de ratón de xenoinjerto. Captación en xenoinjerto de tumor (A) y relación de la captación (B), y captación en riñón (C). Los datos de captación se expresan en % de dosis inyectada/gramo (% ID/g). Puntos de los datos: % ID/g; barras: D.T.; $n = 3$ /punto temporal.

5 La Figura 13 muestra los datos *in vivo* para el compuesto **2** determinado por los estudios de biodistribución en un modelo de ratón de xenoinjerto. Captación en xenoinjerto de tumor (A) y relación de la captación (B), y captación en riñón (C). Los datos de captación se expresan en % de dosis inyectada/gramo (% ID/g). Puntos de los datos: % ID/g; barras: D.T.; $n = 3$ /punto temporal.

10 La Figura 14 muestra los datos *in vivo* para el compuesto **3** determinado por los estudios de biodistribución en un modelo de ratón de xenoinjerto. Captación en xenoinjerto de tumor (A) y relación de la captación (B), y captación en riñón (C). Los datos de captación se expresan en % de dosis inyectada/gramo (% ID/g). Puntos de los datos: % ID/g; barras: D.T.; $n = 3$ /punto temporal.

15 La Figura 15 muestra los datos *in vivo* para el compuesto **4** determinado por los estudios de biodistribución en un modelo de ratón de xenoinjerto. Captación en xenoinjerto de tumor (A) y relación de la captación (B), y captación en riñón (C). Los datos de captación se expresan en % de dosis inyectada/gramo (% ID/g). Puntos de los datos: % ID/g; barras: D.T.; $n = 3$ /punto temporal.

20 La Figura 16 muestra los datos *in vivo* para el compuesto **5** determinado por los estudios de biodistribución en un modelo de ratón de xenoinjerto. Captación en xenoinjerto de tumor (A) y relación de la captación (B), y captación en riñón (C). Los datos de captación se expresan en % de dosis inyectada/gramo (% ID/g). Puntos de los datos: % ID/g; barras: S.T.; $n = 3$ /punto temporal.

25 La Figura 17 muestra la unión y la internalización de los radiotrazadores monoPEGilados y diPEGilados con sustituciones de lisina *in vitro* usando la línea celular Dx3puro β_6 que expresa $\alpha_v\beta_6$ y su control Dx3puro que no expresa. Las gráficas, que muestran la fracción de la radiactividad total, representan los experimentos por cuadruplicado con $3,75 \times 10^6$ células para cada radiotrazador/línea celular después de un periodo de incubación de 60 minutos. Columnas rellenas: porcentaje de la radiactividad total detectada en la muestra celular (negro: unido total; gris: internalizado); barras: D.T.

30 La Figura 18 muestra los datos *in vivo* para el compuesto **5R** determinado por los estudios de biodistribución en un modelo de ratón de xenoinjerto. Captación en xenoinjerto de tumor (A) y relación de la captación (B), y captación en riñón (C). Los datos de captación se expresan en % de dosis inyectada/gramo (% ID/g). Puntos de los datos: % ID/g; barras: S.T.; $n = 3$ /punto temporal.

35 La Figura 19 muestra las señales de la HPLC representativa de los compuestos formulados **5** (A) y **5R** (B). La señal de la radio-HPLC es la señal superior; también se muestran las señales de UV a 220 nm (señal medio) y 254 nm (señal inferior). Indicar que el punto de referencia surgido alrededor del pico producto del compuesto **5** (indicativo de la descomposición parcial, posiblemente debido a la oxidación o la radiólisis); en comparación, el punto de referencia alrededor del pico producto del compuesto **5R** permanece plano. Los primeros picos en la señal a 220 nm están causados por el disolvente de inyección; "frente de disolvente". Abreviaturas: para la absorbancia de UV las unidades son mili unidades de absorbancia [mUA]; para la señal de la radiactividad [RA] las unidades son milivolt [mV], superpuesto sobre la escala de UV.

40 La figura 20 muestra la unión celular, la internalización, el direccionamiento al tumor $\alpha_v\beta_6$ y el aclaramiento en riñón de [^{18}F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ en un modelo de ratón de tumor $\alpha_v\beta_6(+)/\alpha_v\beta_6(-)$ emparejado.

45 La Figura 21 muestra la unión y la internalización en las células DX3puro β_6 que expresan $\alpha_v\beta_6$ y el control Dx3puro $\alpha_v\beta_6$ negativo. Los datos mostrados son la media (barras rellenas) \pm la desviación típica (líneas) para cada radiotrazador ($n=4$ /línea celular y afección).

La Figura 22 muestra el ensamblaje de un péptido-micela de la invención.

50 La Figura 23 muestra una representación esquemática de monómeros, dímeros y tetrámeros de los conjugados peptídicos de la invención.

La Figura 24 muestra un aglutinante ilustrativo de albúmina protegida por alilo.

60 La Figura 25 muestra los datos de biodistribución para Al[^{18}F]NOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 y [^{18}F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ a 1, 2 y 4 h después de la inyección (p.i.) en un modelo de ratón de tumor $\alpha_v\beta_6(+)/\alpha_v\beta_6(-)$ emparejado.

65 La Figura 26 es el Esquema 1 que muestra el ensamblaje paso a paso del péptido modificado por aglutinante de albúmina radiomarcado. Mostrado en un esquema para el péptido de unión a quelante, Para el radiomarcado en fase sólida (por ejemplo, con [^{18}F]FBA), el grupo prostético puede acoplarse al extremo N libre antes de la escisión

de TFA y la purificación de la radio-HPLC.

La Figura 27 muestra la unión y la internalización en las células DX3puro $\alpha\beta_6$ que expresan $\alpha\beta_6$ y el control Dx3puro $\alpha\beta_6$ negativo. Los datos mostrados son la media (barras rellenas) \pm la desviación típica (líneas) para cada radiotrazador (n=4/línea celular y afección).

La Figura 28 muestra las imágenes PET/CT confocales de los escaneos obtenidos con [^{18}F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ en monos rhesus sanos. Se obtuvieron imágenes de costado a costado de los animales en la posición supina en los momentos designados después de la inyección (p.i.).

Descripción detallada

I. Introducción

La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que tanto el tamaño como la localización de la fracción de PEG en el péptido de unión a integrina afecta significativamente al direccionamiento y las características farmacocinéticas del conjugado peptídico resultante. En concreto, los ejemplos 1 y 2 ilustran que la PEGilación biterminal (es decir, unión de las unidades de PEG en ambos extremos N y C del péptido) era capaz de conferir superiores características de direccionamiento y farmacocinéticas *in vivo* en el péptido A20FMDV2 de unión a integrina $\alpha\beta_6$ ilustrativo y variantes del mismo (por ejemplo, variante K16R). Notablemente, los péptidos A20FMDV2 y A20FMDV2 (K16R) PEGilados biterminales mostraron perfiles farmacocinéticos muy mejorados más allá de lo que se predijo a partir de la PEGilación N- o C-terminal. De hecho, las dos unidades de PEG actuaron de manera sinérgica para conseguir estabilidad muy mejorada junto con la alta captación en el tumor $\alpha\beta_6(+)$ y retención. Estos efectos se consiguieron con cadenas de PEG monodispersas relativamente pequeñas, por ejemplo, cadenas de PEG con un número exactamente definido de unidades de repetición de etilenglicol "n", en el extremo terminal N y en el C (por ejemplo, PM < aproximadamente 3.000), en comparación con las unidades PEG comúnmente usadas para fines médicos (por ejemplo, PM = aproximadamente 5.000 a aproximadamente 50.000).

Como se ilustra en el Ejemplo 3, la presente invención proporciona además nuevos agentes de obtención de imágenes moleculares y terapéuticos con mejores afinidades y farmacocinéticas basadas en la modificación de los conjugados peptídicos PEGilados biterminales descritos en el presente documento con péptidos proapoptóticos, radionúclidos terapéuticos, nanovehículos basados en micela, multimerización y/o la adición de motivos de unión a albúmina en sangre para mejorar más la afinidad, la estabilidad *in vivo*, las capacidades de direccionamiento y el comportamiento de aclaramiento de los conjugados peptídicos.

Asimismo, los resultados presentados en el Ejemplo 4 demuestran que la PEGilación biterminal de un péptido de unión a integrina tan corto como 8 aminoácidos con incluso unidades de PEG más cortas (por ejemplo, PEG₁₁) imparte propiedades ventajosas al péptido tal como alta selectividad, mejor estabilidad en suero, rendimientos del radiomarcado y lipofilicidad cuando se compara con la secuencia peptídica parental, una versión cíclica del péptido y versiones PEGiladas N- o C-terminales individuales del péptido. Así, los conjugados peptídicos PEGilados biterminales de la presente invención que tienen secuencias peptídicas cortas (por ejemplo, aproximadamente 8 aminoácidos de longitud) y unidades de PEG cortas (por ejemplo, PEG₁₁) tienen características de direccionamiento y farmacocinéticas deseables que los hacen adecuados para la obtención de imágenes *in vivo* y terapia.

Los conjugados peptídicos PEGilados biterminales de la presente invención pueden prepararse usando métodos convencionales. Solo se necesitan polímeros de PEG relativamente cortos, que permiten la síntesis en fase sólida. Esto asegura la preparación y la purificación directa. El conjugado peptídico se obtiene como un compuesto único de la composición precisa y la masa molecular, en comparación con los otros compuestos PEGilados que pueden mostrar isomerismo posicional y contienen mezclas de cadenas de PEG con una longitud media.

En conjunto, la obtención de imágenes y el direccionamiento de la expresión de la integrina ($\alpha\beta_6$) en tumores con los conjugados peptídicos de la presente invención dan como resultado la detección y el tratamiento de los tumores de otro modo omitidos, y también sirven como un indicador de pronóstico del cáncer de una manera no invasiva.

II. Definiciones

A menos que se indique específicamente de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Además, cualquier método o material similar o equivalente a un método o material descrito en el presente documento puede usarse en la práctica de la presente invención. Para los fines de la presente invención, se definen los siguientes términos.

El término "conjugado" se pretende que incluya un compuesto químico que se ha formado mediante la conexión o la unión de dos o más compuestos. En concreto, un conjugado de la presente invención incluye un "conjugado peptídico PEGilado biterminal" que comprende un péptido de unión a integrina covalentemente unido a una primera fracción de polietilenglicol (PEG) en el extremo amino del péptido y una segunda fracción de PEG en el extremo carboxilo del

péptido. El conjugado de la presente invención puede comprender además un agente de obtención de imágenes o un agente terapéutico covalentemente unido al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG.

Las expresiones "péptido de unión a integrina" y "péptido que se une a una integrina" se refiere a la unión/interacción de un motivo peptídico en el conjugado que muestra la capacidad de interacción específica con una integrina específica o un grupo específico de integrinas. En determinadas realizaciones, las expresiones se refieren a la capacidad de un péptido o una parte del mismo para interactuar con y/o unirse a una integrina diana y sin reacción cruzada con las moléculas de secuencias o estructuras similares. En algunos casos, un péptido se une específicamente a una integrina diana cuando se une a la integrina diana con una constante de disociación sustancialmente inferior (es decir, unión más ajustada) que una molécula de secuencia o estructura similar. Por ejemplo, en determinados casos, sucede una unión específica cuando el péptido se une a la integrina diana con una afinidad de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, o 1000 veces o superior que una molécula relacionada. La unión del péptido a un sitio en la integrina diana puede suceder a través de fuerzas intermoleculares tales como enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, enlaces dipolo-dipolo y fuerzas de van der Waals. La reactividad cruzada puede probarse, por ejemplo, evaluando la unión del péptido en condiciones convencionales a la integrina diana así como a un número de moléculas más o menos muy relacionadas (por ejemplo, estructural y/o funcionalmente). Estos métodos pueden incluir, sin limitación, estudios de unión, estudios de bloqueo y competición con moléculas muy relacionadas, análisis FACS, resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, con BIAcore), ultracentrifugación analítica, calorimetría de titulación isotérmica, anisotropía de fluorescencia, espectroscopía de fluorescencia, ensayos de unión a ligando radiomarcado y combinaciones de los mismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "PEGilación" se refiere al proceso de acoplamiento de manera covalente de una molécula de polietilenglicol (PEG) a otra molécula, por ejemplo, un péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo y similares, que, a continuación, se denominan "PEGilados". Como ejemplo no limitante, un péptido de unión a integrina puede someterse a PEGilación en tanto el extremo amino como el extremo carboxilo con moléculas PEG monodispersas que tienen una longitud de cadena definida para generar los conjugados peptídicos PEGilados biterminales de la invención. Las moléculas de PEG monodispersas normalmente comprenden pesos moleculares discretos con un número exactamente definido de unidades de etilenglicol de repetición. Las fracciones de PEG adecuadas para su uso en la presente invención están disponibles en el mercado por Polypure AS (Oslo, Noruega), que suministra moléculas de PEG monodispersas y sus derivados de PEG que consisten en sustancialmente un oligómero solo (por ejemplo, mayor que aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de pureza de oligómero). En realizaciones particulares, el péptido de unión a integrina se somete a PEGilación en ambos extremos con un tipo único o mezclas de diferentes tipos de fracciones de PEG monodispersas que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 3.000 daltons (Da), tal como, por ejemplo, PEG₁₁, PEG₁₂ (PEG 800), PEG₂₈ (PEG 1500) y/o PEG₂₈₂ (PEG 1500x2).

Un "peptidomimético" se refiere a un compuesto químico que tiene una estructura que es distinta de la estructura general de un péptido existente, pero que funciona de manera similar al péptido existente, por ejemplo, imitando la actividad biológica de ese péptido. Los peptidomiméticos normalmente comprenden aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos de origen no natural, pero también pueden comprender modificaciones a la cadena principal del péptido. Los peptidomiméticos pueden presentar mejor afinidad, especificidad y/o estabilidad en comparación con un péptido existente.

El término "aminoácido" incluye tanto α -aminoácidos de origen natural como sus estereoisómeros, así como aminoácidos de origen no natural y sus estereoisómeros. "Estereoisómeros" de los aminoácidos se refiere a isómeros imagen espejo de los aminoácidos, tales como L-aminoácidos o D-aminoácidos. Por ejemplo, un estereoisómero de un aminoácido de origen natural se refiere al isómero imagen espejo del aminoácido de origen natural, es decir, el D-aminoácido.

Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican después, por ejemplo, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los α -aminoácidos de origen natural incluyen, sin limitación, alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), arginina (Arg), lisina (Lys), leucina (Leu), metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y sus combinaciones. Los estereoisómeros de un α -aminoácido de origen natural incluyen, sin limitación, D-alanina (D-Ala), D-cisteína (D-Cys), Ácido D-aspártico (D-Asp), Ácido D-glutámico (D-Glu), D-fenilalanina (D-Phe), D-histidina (D-His), D-isoleucina (D-Ile), D-arginina (D-Arg), D-lisina (D-Lys), D-leucina (D-Leu), D-metionina (D-Met), D-asparagina (D-Asn), D-prolina (D-Pro), D-glutamina (D-Gln), D-serina (D-Ser), D-treonina (D-Thr), D-valina (D-Val), D-triptófano (D-Trp), D-tirosina (D-Tyr) y sus combinaciones.

Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, análogos de aminoácidos, miméticos de aminoácidos, aminoácidos sintéticos, glicinas *N*-sustituidas y *N*-metil aminoácidos en cualquiera de la configuración L o D que funciona de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Por ejemplo, "análogos de aminoácidos" son aminoácidos de origen no natural que tienen la misma estructura química básica que los aminoácidos de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, pero tienen grupos R modificados (es decir, cadena lateral).

Ejemplos no limitantes de aminoácidos de origen no natural incluyen ácido 1-aminociclopentano-1-carboxílico (Acp), ácido 1-aminociclobutano-1-carboxílico (Acb), ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (Acpc), citrulina (Cit), homocitrulina (HoCit), ácido α -aminohexanodioico (Aad), 3-(4-piridil)alanina (4-Pal), 3-(3-piridil)alanina (3-Pal), propargilglicina (Pra), ácido α -aminoisobutírico (Aib), ácido α -aminobutírico (Abu), norvalina (Nva), ácido α,β -diaminopropiónico (Dpr), ácido α,γ -diaminobutírico (Dbu), α -*terc*-butilglicina (Bug), 3,5-dinitrotirosina (Tyr(3,5-di NO₂)), norleucina (Nle), 3-(2-naftil)alanina (Nal-2), 3-(1-naftil)alanina (Nal-1), ciclohexilalanina (Cha), di-*n*-propilglicina (Dpg), ciclopropilalanina (Cpa), homoleucina (Hle), homoserina (HoSer), homoarginina (Har), homocisteína (Hcy), sulfóxido de metionina (Met(O)), metionina metilsulfonio (Met (S-Me)), α -ciclohexilglicina (Chg), 3-benzo-tienilalanina (Bta), taurina (Tau), hidroxiprolina (Hyp), O-bencil-hidroxiprolina (Hyp(Bzl)), homoprolina (HoPro), β -homoprolina (β HoPro), ácido tiazolidina-4-carboxílico (Thz), ácido nipecótico (Nip), ácido isonipecótico (IsoNip), 3-carboximetil-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-ona (Cptd), ácido tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico (3-Tic), ácido 5*H*-tiazolo [3,2-*a*]piridina-3-carboxílico (Btd), ácido 3-aminobenzoico (3-Abz), 3-(2-tienil)alanina (2-Thi), 3-(3-tienil)alanina (3-Thi), ácido α -aminooctanodioico (Asu), dietilglicina (Deg), 4-amino-4-carboxi-1,1-dioxo-tetrahidrotiopirano (Acdd), ácido 1-amino-1-(4-hidroxiciclohexil) carboxílico (Ahch), ácido 1-amino-1-(4-cetociclohexil)carboxílico (Akch), 4-amino-4-carboxitetrahidropirano (Actp), 3-nitrotirosina (Tyr(3-NO₂)), ácido 1-amino-1-ciclohexano carboxílico (Ach), ácido 1-amino-1-(3-piperidinil)carboxílico (3-Apc), ácido 1-amino-1-(4-piperidinil)carboxílico (4-Apc), ácido 2-amino-3-(4-piperidinil) propiónico (4-App), ácido 2-aminoindano-2-carboxílico (Aic), ácido 2-amino-2-naftilacético (Ana), ácido (2*S*, 5*R*)-5-fenilpirrolidina-2-carboxílico (Ppca), 4-thiazolilalanina (Tha), ácido 2-aminooctanoico (Aoa), ácido 2-aminoheptanoico (Aha), ornitina (Orn), ácido azetidin-2-carboxílico (Aca), ácido α -amino-3-cloro-4,5-dihidro-5-isoazoleacético (Acdi), ácido tiazolidin-2-carboxílico (Thz(2-COOH)), alilglicina (Agl), ácido 4-ciano-2-aminobutírico (Cab), 2-piridilalanina (2-Pal), 2-quinolilalanina (2-Qal), ciclobutilalanina (Cba), análogo de fenilalanina, derivados de lisina, ornitina (Orn) y ácido α,γ -diaminobutírico (Dbu), esteroisómeros de los mismos y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Liu et al., *Anal. Biochem.*, 295:9-16 (2001)). Así, los α -aminoácidos de origen no natural están presentes o bien como L- α -aminoácidos de origen no natural, D- α -aminoácidos de origen no natural o combinaciones de los mismos.

Los "miméticos de aminoácidos" son compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos adecuados incluyen, sin limitación, β -aminoácidos y γ -aminoácidos. En los β -aminoácidos, el grupo amino se une al átomo β -carbono del grupo carboxilo de modo que son dos átomos de carbono entre los grupos amino y carboxilo. En los γ -aminoácidos, el grupo amino se une al átomo γ -carbono del grupo carboxilo de modo que hay tres átomos de carbono entre los grupos amino y carboxilo. Los grupos R adecuados para β - o γ -aminoácidos incluyen, pero sin limitación, cadenas laterales presentes en aminoácidos de origen natural y aminoácidos de origen no natural.

Las "glicinas *N*-sustituidas" son aminoácidos de origen no natural basados en glicina, donde una cadena lateral del aminoácido está unida al átomo de nitrógeno de la glicina. Las cadenas laterales de aminoácidos adecuadas (por ejemplo, grupos R) incluyen, pero sin limitación, cadenas laterales presentes en aminoácidos de origen natural y cadenas laterales de aminoácidos de origen no natural tales como los análogos de aminoácidos. Ejemplos no limitantes de glicinas *N*-sustituidas incluyen *N*-(2-aminoetil)glicina, *N*-(3-aminopropil)glicina, *N*-(2-metoxietil)glicina, *N*-bencil glicina, (*S*)-*N*-(1-feniletil)glicina, *N*-ciclohexilmetilglicina, *N*-(2-feniletil)glicina, *N*-(3-fenilpropil)glicina, *N*-(6-aminogalactosil)glicina, *N*-(2-(3'-indoliletil)glicina, *N*-(2-(*p*-metoxifeniletil)glicina, *N*-(2-(*p*-clorofeniletil)glicina, y *N*-(2-(*p*-hidroxifeniletil)glicina. Se ha demostrado que los oligómeros de glicina *N*-sustituida, denominados en el presente documento "peptoides", son resistentes a proteasa (véase, por ejemplo, Miller et al., *Drug Dev. Res.*, 35:20-32 (1995)).

Los aminoácidos pueden mencionarse en el presente documento bien por sus símbolos comúnmente conocidos de tres letras o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Por ejemplo, un L-aminoácido puede presentarse en el presente documento por su símbolo de tres letras comúnmente conocido (por ejemplo, Arg para L-arginina) o por un símbolo de aminoácido de una letra mayúscula (por ejemplo, R o L-arginina). Un D-aminoácido puede representarse en el presente documento por su símbolo de tres letras comúnmente conocido (por ejemplo, D-Arg para D-arginina) o por un símbolo de aminoácido de una letra minúscula (por ejemplo, r para D-arginina).

Con respecto a secuencias de aminoácidos, un experto en la materia reconocerá que las sustituciones individuales, adiciones o deleciones a un péptido, polipéptido o secuencia de proteínas que altera, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos de la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservativa" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. El aminoácido químicamente similar incluye, sin limitación, un aminoácido de origen no natural tal como un L-aminoácido, un esteroisómero de un aminoácido de origen natural tal como un D-aminoácido, y un aminoácido de origen no natural tal como un análogo de aminoácido, mimético de aminoácido, aminoácido sintético, glicina *N*-sustituida y *N*-metil aminoácido.

Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las sustituciones pueden realizarse en donde un aminoácido alifático (por ejemplo, G, A, I, L o V) se sustituye por otro miembro del grupo. Igualmente, un grupo no cargado polar alifático tal como C, S, T, M, N

o Q, puede sustituirse por otro miembro del grupo; y residuos básicos, por ejemplo, K, R o H, pueden sustituirse por otro. En algunas realizaciones, un aminoácido con una cadena lateral ácida, por ejemplo, E o D, puede sustituirse por su homólogo no cargado, por ejemplo, Q o N, respectivamente; o viceversa. Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene otros aminoácidos ilustrativos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 5 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 10 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

15 (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* 1993).

El término "péptido" se refiere a un compuesto hecho de una cadena lateral de D o L-aminoácidos o una mezcla de D y L-aminoácidos juntados por los enlaces peptídicos. Generalmente, los péptidos tienen aproximadamente 2 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Como ejemplos no limitantes, los péptidos de unión a integrina presentes en los conjugados descritos en el presente documento tienen entre aproximadamente 5 y aproximadamente 45 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 45 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 12 y aproximadamente 45 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 12 y aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, aproximadamente 8 aminoácidos de longitud, o aproximadamente 20 aminoácidos de longitud.

Un "péptido cíclico" se refiere a un péptido en el que el extremo amino del péptido o una cadena lateral en el péptido que tiene un grupo amino libre (por ejemplo, lisina) se unen por un enlace peptídico al extremo carboxilo del péptido o una cadena lateral en el péptido que tiene un grupo carboxilo libre (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico). Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los péptidos cíclicos heterodéticos formados por los enlaces disulfuro, ester o éter estén dentro del alcance de la presente invención.

La expresión "residuo promotor de la hélice" incluye aminoácidos con una preferencia conformacional mayor que 1,0 para encontrarse en el medio de una α -hélice (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins*, 1993; y Pace et al., *Biophysical J.*, 75:422-427 (1998)). Sin embargo, las combinaciones promotoras de la hélice no ortodoxas de los aminoácidos también están en el alcance de la invención si aumentan la especificidad y/o la afinidad de unión a una integrina diana, por ejemplo, integrina $\alpha\beta_6$.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un conjugado o composición de la presente invención que es capaz de conseguir un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado o composición de la presente invención puede ser la cantidad que es capaz de prevenir o aliviar uno o más síntomas asociados a una enfermedad o trastorno. Un experto en la materia apreciará que los conjugados y las composiciones de la presente invención pueden administrarse conjuntamente con otros agentes terapéuticos tales como anticancerosos, antiinflamatorios, inmunosupresores, antivíricos, antibióticos y/o agentes antifúngicos.

Como se usa en el presente documento, el término "administrar" incluye administración oral, contacto tópico, administración como un supositorio, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intratecal, intranasal o subcutánea, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una minibomba osmótica, a un sujeto. La administración es por cualquier vía, incluyendo parenteral y transmucosa (por ejemplo, bucal, sublingual, palatal, gingival, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intra-arteriola, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Otros modos de administración incluyen, pero sin limitación, el uso de formulaciones liposómicas, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc. Un experto en la materia conocerá los métodos adicionales para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado o composición de la presente invención para prevenir o aliviar uno o más síntomas asociados a una enfermedad o trastorno tal como cáncer o una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. Por "administrar conjuntamente" se entiende que un conjugado o composición de la presente invención se administra al mismo tiempo, justo antes de o justo después de la administración de un segundo fármaco (por ejemplo, agentes anticancerosos, agente antiinflamatorio, agente inmunosupresor, agente antivírico, antibiótico, agente antifúngico, etc.).

El término "radionúclido" se pretende que incluya cualquier núclido que presente radiactividad. Un "núclido" se refiere a un tipo de átomo especificado por su número atómico, masa atómica y estado energético, tal como carbono 14 (^{14}C). "Radiactividad" se refiere a la radiación, incluyendo partículas alfa, partículas beta, nucleones, electrones, positrones, neutrinos y rayos gamma, emitidos por una sustancia radiactiva. Ejemplos de radionúclidos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, flúor 18 (^{18}F), flúor 19 (^{19}F), fósforo 32 (^{32}P), escandio 47 (^{47}Sc),

cobalto 55 (^{55}Co), cobre 60 (^{60}Cu), cobre 61 (^{61}Cu), cobre 62 (^{62}Cu), cobre 64 (^{64}Cu), galio 66 (^{66}Ga), cobre 67 (^{67}Cu), galio 67 (^{67}Ga), galio 68 (^{68}Ga), rubidio 82 (^{82}Rb), itrio 86 (^{86}Y), itrio 87 (^{87}Y), estroncio 89 (^{89}Sr), itrio 90 (^{90}Y), rodio 105 (^{105}Rh), plata 111 (^{111}Ag), indio 111 (^{111}I), yodo 124 (^{124}I), yodo 125 (^{125}I), yodo 131 (^{131}I), estaño 117m ($^{117\text{m}}\text{Sn}$), tecnecio 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), prometio 149 (^{149}Pm), samario 153 (^{153}Sm), holmio 166 (^{166}Ho), lutetio 177 (^{177}Lu), renio 186 (^{186}Re), renio 188 (^{188}Re), talio 201 (^{201}Tl), astatino 211 (^{211}At), y bismuto 212 (^{212}Bi). Como se usa en el presente documento, el "m" en $^{117\text{m}}\text{Sn}$ y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ significa el estado meta. Adicionalmente, elementos radiactivos de origen natural tales como uranio, radio y torio, que generalmente representan mezclas de radioisótopos, son ejemplos adecuados de radionúclidos. ^{67}Cu , ^{131}I , ^{177}Lu , y ^{186}Re son radionúclidos beta y gamma emisores. ^{212}Bi es un radionúclido alfa y beta emisor. ^{211}Bi es un radionúclido alfa emisor. ^{32}P , ^{47}Sc , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , y ^{188}Re son ejemplos de radionúclidos beta y gamma emisores. ^{67}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, y ^{201}Tl son ejemplos de radionúclidos gamma emisores. ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb , y ^{86}Y son ejemplos de radionúclidos emisores de positrones. ^{64}Cu es un radionúclido emisor beta y de positrones.

El término "sujeto", o "paciente" se refiere normalmente a seres humanos, pero también pueden ser otros animales tales como, por ejemplo, otros primates, roedores, cánidos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.

III. Descripción de las realizaciones

La presente invención proporciona conjugados peptídicos PEGilados biterminales que se dirigen a integrina $\alpha_v\beta_6$. En realizaciones particulares, los conjugados peptídicos de la presente invención comprenden además un agente biológico tal como un agente de obtención de imágenes o un agente terapéutico, por ejemplo, covalentemente unido a una de las fracciones de PEG. Los conjugados peptídicos de la presente invención son particularmente útiles para la obtención de imágenes de un tumor que contiene integrina $\alpha_v\beta_6$, órgano o tejido y para tratar enfermedades y trastornos mediados por integrina $\alpha_v\beta_6$ tales como cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema de pulmón y dermatopatía de herida crónica. Las composiciones y los kit que contienen los conjugados peptídicos de la presente invención encuentran utilidad en un amplio rango de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, diagnóstico por imágenes *in vivo* e inmunoterapia.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un conjugado que comprende:

- (a) un péptido que se a una integrina;
- (b) una primera fracción de polietilenglicol (PEG) covalentemente unida al extremo amino del péptido; y
- (c) una segunda fracción de PEG covalentemente unida al extremo carboxilo del péptido.

En la invención, la integrina es $\alpha_v\beta_6$.

El péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ comprende la secuencia de aminoácidos $\text{RGDLX}_1\text{X}_2\text{X}_3$, en donde X_1 y X_2 son aminoácidos independientemente seleccionados y X_3 es L o I. En algunas realizaciones, X_1 y X_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Glu, Ala, Leu, Met, Gln, Lys, Arg, Val, Ile, His, Thr, Trp, Phe y Asp. En determinadas realizaciones, X_1 es Q, X_2 es V y X_3 es L. En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos $\text{RGDLX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{AQX}_6$, en donde X_6 es K o R. En determinados casos, X_6 es R. En realizaciones preferidas, el péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en $\text{NAVPNLRGDLQVLAQKVART}$ (A20FMDV2) y $\text{NAVPNLRGDLQVLAQRVART}$ (A20FMDV2 K16R).

En otros aspectos descritos en el presente documento, el péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ comprende secuencia de aminoácidos RSDLTPLFX_7 , en donde X_7 está ausente o es cualquier aminoácido. En determinados casos, X_7 está ausente (es decir, el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos RSDLTPLF). En determinados otros casos, X_7 es K (es decir, el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos RSDLTPLFK).

En otras realizaciones, el péptido se une a la integrina y un receptor que se expresa conjuntamente con la integrina. En determinados casos, el receptor que se expresa conjuntamente con la integrina es el receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4). En casos particulares, el péptido se une a tanto la integrina $\alpha_v\beta_6$ como CXCR4. En otros determinados casos descritos en el presente documento, el receptor que se expresa conjuntamente con la integrina es otra integrina, por ejemplo, la integrina $\alpha_v\beta_3$ expresada conjuntamente con integrina $\alpha_v\beta_5$. En casos particulares, el péptido se une a tanto la integrina $\alpha_v\beta_3$ como la integrina $\alpha_v\beta_5$. En realizaciones adicionales, el péptido tiene entre aproximadamente 8 y aproximadamente 45 aminoácidos de longitud. En determinados casos, el péptido tiene 20 aminoácidos de longitud.

En la invención, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG tienen cada una un peso molecular de menos de aproximadamente 3.000 daltons (Da). En realizaciones preferidas, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG son fracciones de PEG monodispersas que tienen una longitud de cadena definida. Las fracciones de PEG que tienen una longitud de cadena definida incluyen generalmente moléculas de PEG de pesos moleculares discretos con un número exactamente definido de unidades de etilenglicol de repetición. Ejemplos no limitantes de las fracciones PEG que tienen una longitud de cadena definida incluyen pequeñas moléculas de PEG monodispersas que

tienen más de aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % de pureza de oligómero. En realizaciones particulares, las mezclas de compuesto de PEG que tienen un peso molecular medio no se usan en los conjugados de la presente invención.

- 5 En determinados casos, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG se seleccionan independientemente del grupo que consiste en PEG₁₁, PEG₁₂ (PEG 800), PEG₂₈ (PEG 1500) y (PEG₂₈)₂ (PEG 1500x2). En realizaciones particulares, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG son iguales. En realizaciones preferidas, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG son ambas PEG₂₈ (PEG 1500). Otros ejemplos no limitantes de las unidades de PEG adecuadas para su uso como la primera y/o segunda fracción de PEG en los conjugados de la presente invención incluyen PEG 200, PEG 300, PEG 400, PEG 500, PEG 600, PEG 700, PEG 900, PEG 1000, PEG 1100, PEG 1200, PEG 1300, PEG 1400, PEG 1600, PEG 1700, PEG 1800, PEG 1900, PEG 2000, PEG 2100, PEG 2200, PEG 2300, PEG 2400, PEG 2500, PEG 2600, PEG 2700, PEG 2800, PEG 2900, PEG 3000, así como derivados de los mismos tales como derivados de PEG ramificados. En realizaciones preferidas, estas moléculas de PEG contienen un número exactamente definido de unidades de repetición "n" y son monodispersas (por ejemplo, que tienen más de aproximadamente un 95 % de pureza de oligómero). Las fracciones de PEG adecuadas para su uso en la presente invención están disponibles en el mercado por EMD Chemicals, Inc. (San Diego, CA) y Polypure AS (Oslo, Noruega).

- 20 En determinadas realizaciones, el conjugado comprende además un agente de obtención de imágenes o un agente terapéutico covalentemente unido al péptido, la primera fracción de PEG y/o la segunda fracción de PEG. En realizaciones particulares, el agente de obtención de imágenes o el agente terapéutico se une covalentemente a la primera fracción de PEG. En determinados casos, el agente de obtención de imágenes o el agente terapéutico se une covalentemente como la fracción más N-terminal en el conjugado.

- 25 En algunas realizaciones, el agente de obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, biotina, un fluoróforo, una proteína fluorescente, un anticuerpo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y/o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸F, ¹⁹F, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹²⁴I, ¹²⁵I e ¹³¹I. En determinados casos, el radionúclido se une a través de un grupo prostético al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG. En realizaciones particulares, el radionúclido se une a través de un grupo prostético a la primera fracción de PEG. En otras realizaciones, el radionúclido se une a través de un grupo prostético como la fracción más N-terminal en el conjugado. Ejemplos no limitantes de los grupos prostéticos incluyen grupos benzoilo (por ejemplo, ácido fluorobenzoico (FBA)), ácido fluoropropionico (FPA), piridina (Py), dipiridil-tetrazina (Tz), transcicloocteno (TCO), derivados de los mismos y combinaciones de los mismos. En realizaciones preferidas, el radionúclido es ¹⁸F o ¹⁹F covalentemente unido a la primera fracción de PEG a través de un grupo benzoilo tal como FBA. Por ejemplo, el ácido 4-¹⁸F-fluorobenzoico (¹⁸F-FBA) o el ácido 4-¹⁹F-fluorobenzoico (¹⁹F-FBA) pueden usarse para radiomarcarse los conjugados peptídicos de la presente invención.

- 40 En algunas realizaciones, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, un péptido proapoptótico, una nanopartícula, un agente quimioterapéutico, una nanogotita, un fármaco liposómico, una citocina y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico es un radionúclido seleccionado del grupo que consiste en ⁹⁰Y y ¹⁷⁷Lu. En determinados casos, el radionúclido se une a través de un agente quelante al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG. En realizaciones particulares, el radionúclido se une a través de un agente quelante a la primera fracción de PEG. En otras realizaciones, el radionúclido se une a través de un agente quelante como la fracción más N-terminal en el conjugado. Ejemplos no limitantes de agentes quelantes incluyen agentes quelantes metálicos macrocíclicos tales como DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético), NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacético), DTPA (anhídrido dietil enetriaminopentaacético), TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético), y DTTA (N-(ácido p-isotiocianatobencil)-dietilenotriamina-N,N',N'',N'''-tetraacético).

- 50 En otras realizaciones, el agente terapéutico es un péptido proapoptótico que comprende la secuencia de aminoácidos α (KLAKLAK)₂. En determinados casos, el péptido proapoptótico se une a través de un enlazador de glicina al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG. En realizaciones particulares, el péptido proapoptótico se une a través de un enlazador de glicina a la primera fracción de PEG. Ejemplos no limitantes de enlazadores de glicina incluyen un residuo de glicina único o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 residuos de glicina consecutivos o residuos de glicina separados por otros residuos de aminoácidos. En realizaciones preferidas, el enlazador de glicina es un enlazador de glicinilglicina. Un experto en la materia sabrá de otros enlazadores adecuados para unir el péptido proapoptótico a los conjugados peptídicos de la presente invención, por ejemplo, sin interferir significativamente con las propiedades de direccionamiento y la función de cada componente individual.

- 65 En otras realizaciones adicionales, el agente terapéutico es una nanopartícula que comprende un almacén telodendrímico u otro sistema de nanovehículo basado en micela. En realizaciones particulares, el almacén de telodendrímico es PEG^{SK}CA₈. Los telodendrimeros adecuados para su uso en la presente invención se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 20130164369. En determinados casos, la nanopartícula se carga con un agente quimioterapéutico. Ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen paclitaxel (PTX) y otros

agentes quimioterapéuticos citotóxicos descritos en el presente documento.

En determinadas realizaciones, el conjugado comprende además un motivo de unión a albúmina covalentemente unido al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG. En realizaciones particulares, el motivo de unión a albúmina es el ácido 4-(4-iodofenil)butírico (IPA) o un homólogo del mismo con una cadena alquilo más corta tal como, por ejemplo, ácido 4-(4-iodofenil)propiónico o ácido 4-(4-iodofenil)acético. En otras realizaciones, el motivo de unión a albúmina es el ácido 4-(4-metilfenil)butírico o el ácido 4-(4-bromofenil)butírico o un homólogo del mismo con una cadena alquilo más corta tal como, por ejemplo, un homólogo de ácido propiónico o ácido acético del mismo. En realizaciones particulares, el motivo de unión a albúmina está covalentemente unido a la primera fracción de PEG. En determinados casos, el motivo de unión a albúmina está unido covalentemente a la primera y/o segunda fracción de PEG a través de un enlazador tal como un enlazador de ácido glutámico (E) u otro enlazador adecuado (por ejemplo, aminoácido o enlazador peptídico) conocido por los expertos en la materia. En determinadas realizaciones, el motivo de unión a albúmina es ácido ϵ -(4-(4-iodofenil)butil amida)lisina-glutámico ("K(IPA)E"), que corresponde a IPA que se une covalentemente a la cadena lateral del residuo de lisina de un enlazador peptídico lisina-ácido glutámico. En algunas realizaciones, el motivo de unión a albúmina K(IPA)E está covalentemente unido a la primera fracción de PEG. En otras realizaciones, el agente de obtención de imágenes o el agente terapéutico se une covalentemente (por ejemplo, a través de un grupo prostético, un agente quelante, o un enlazador) a un motivo de unión a albúmina que está covalentemente unido a la primera fracción de PEG, de modo que el agente de obtención de imágenes o el agente terapéutico es la fracción más N-terminal en el conjugado.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un conjugado peptídico PEGilado biterminal descrito en el presente documento o una pluralidad del mismo (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más conjugados peptídicos de la invención que difieren, por ejemplo, en sus secuencias peptídicas de unión a integrina, las primeras y/o segundas fracciones de PEG, los agentes de obtención de imágenes y/o terapéuticos o combinaciones de los mismos). En realizaciones particulares, la pluralidad de conjugados (es decir, las primeras y segundas fracciones de PEG en cada uno de la pluralidad de conjugados) comprende fracciones de PEG monodispersas que tienen una longitud de cadena definida (por ejemplo, mayor que aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % de pureza de oligómero). En determinados casos, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG en cada uno de la pluralidad de conjugados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en PEG₁₁, PEG₁₂ (PEG 800), PEG₂₈ (PEG 1500) y (PEG₂₈)₂ (PEG 1500x2). En realizaciones particulares, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG en cada uno de la pluralidad de conjugados son iguales. En realizaciones preferidas, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG en cada uno de la pluralidad de conjugados son ambas PEG₂₈ (PEG 1500).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona conjugados peptídicos multiméricos en donde una pluralidad de los conjugados están unidos entre sí. En realizaciones particulares, el conjugado multimérico es un dímero o un tetramero de la pluralidad de conjugados. En determinadas realizaciones, los conjugados peptídicos multiméricos se forman a través de enlace entre la segunda fracción de PEG de cada conjugado. En algunos casos, los conjugados se unen entre sí en la segunda fracción de PEG a través de al menos un residuo de lisina (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más residuos de lisina (K)). En otros casos, uno o más de los residuos de lisina comprenden un agente de obtención de imágenes o terapéutico tal como un radionúclido (por ejemplo, para su uso como radiomarcador) unido a los mismos. En otras realizaciones, la composición comprende además un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un kit para la obtención de imágenes o terapia, comprendiendo el kit:

- (a) un conjugado peptídico PEGilado biterminal de la invención o una composición del mismo (por ejemplo, una pluralidad o multímero de conjugados); y
- (b) direcciones para su uso del conjugado o la composición en obtención de imágenes o terapia.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para la obtención de imágenes *in vivo* de un tejido diana, comprendiendo el método:

- (a) administrar a un sujeto en necesidad de dicha obtención de imágenes, un conjugado peptídico PEGilado biterminal descrito en la presente invención o una composición del mismo (por ejemplo, una pluralidad o multímero de conjugados), en donde un agente de obtención de imágenes está unido covalentemente al péptido, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG; y
- (b) detectar el conjugado para determinar dónde se concentra el conjugado en el sujeto.

En algunas realizaciones, el tejido diana es un tejido canceroso o un órgano. Ejemplos no limitantes de los tejidos cancerosos incluyen tejidos o tumores cancerosos asociados al cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer cervical y carcinoma oral de células escamosas. En realizaciones preferidas, el conjugado peptídico se administra para la obtención de imágenes de un tumor tal como un tumor pancreático. Ejemplos de tumores pancreáticos adecuados para la obtención de imágenes de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, adenocarcinomas, cistadenomas serosos, cánceres de células acinares, tumores

neuroendocrinos pancreáticos (por ejemplo, insulinomas) y similares.

En determinados casos, el agente de obtención de imágenes comprende un radionúclido (por ejemplo, unido a un grupo prostético tal como un grupo benzoilo o un agente quelante), biotina, un fluoróforo, una proteína fluorescente, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. En los casos en los que un radionúclido comprende el agente de obtención de imágenes, la detección sucede cuando la radiación del radionúclido se usa para determinar dónde se concentra el conjugado peptídico en el sujeto. En los casos en donde un fluoróforo o proteína fluorescente comprende el agente de obtención de imágenes, la detección sucede cuando la fluorescencia del fluoróforo o la proteína fluorescente se usa para determinar dónde se concentra el conjugado peptídico en el sujeto.

En otras realizaciones, el conjugado peptídico se detecta por imágenes por resonancia magnética (MRI), espectroscopia de resonancia magnética (MRS), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), tomografía por emisión de positrones (PET) u obtención de imágenes ópticas. En otras realizaciones adicionales, el conjugado se detecta para el diagnóstico o el pronóstico de una enfermedad o trastorno mediado por la integrina. En determinadas realizaciones, la enfermedad o trastorno está asociado a la expresión, sobreexpresión y/o activación de la integrina. En realizaciones preferidas, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno mediado por integrina $\alpha_v\beta_6$, por ejemplo, el conjugado peptídico se detecta para el diagnóstico o el pronóstico de una enfermedad o trastorno mediado por $\alpha_v\beta_6$.

En un aspecto relacionado, se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por integrina en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado peptídico PEGilado biterminal descrito en la presente invención o una composición del mismo (por ejemplo, una pluralidad o multímero de conjugados), en donde un agente terapéutico está unido covalentemente al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG.

En determinadas realizaciones, la enfermedad o trastorno está asociado a la expresión, sobreexpresión y/o activación de la integrina. Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos mediados por integrina incluyen cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema de pulmón y dermatopatía de herida crónica. En realizaciones particulares, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno mediado por integrina $\alpha_v\beta_6$. En algunos casos, la enfermedad o trastorno mediado por integrina $\alpha_v\beta_6$ es un cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer cervical o carcinoma oral de células escamosas. En otras realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado o la composición es una cantidad suficiente para conseguir un beneficio terapéutico en el sujeto. En otras realizaciones adicionales, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado o la composición es una cantidad suficiente para dirigir la administración del agente terapéutico a una célula que expresa la integrina.

En un aspecto adicional, se describe un método para la obtención de imágenes de células epiteliales que expresan o sobreexpresan una integrina de interés (por ejemplo, integrina $\alpha_v\beta_6$) en el cuerpo de un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado peptídico o composición como se describe en el presente documento. El método es particularmente útil para la obtención de imágenes de la fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema pulmonar, dermatopatía de herida crónica (por ejemplo, epidermolisis bullosa) o células tumorales epiteliales. Por ejemplo, el método para la obtención de imágenes de células epiteliales que sobreexpresan $\alpha_v\beta_6$ pueden incluir ligar el péptido o uno de los componentes de PEG del conjugado a una sonda fluorescente e incorporar el conjugado peptídico resultante en una forma farmacéutica adecuada de modo que tras la administración se puede visualizar el conjugado de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ por su etiqueta fluorescente.

En un aspecto adicional, se describe un método para la administración de un agente terapéutico a una célula que expresa o sobreexpresa una integrina de interés (por ejemplo, integrina $\alpha_v\beta_6$) o a un tumor, órgano o tejido que contiene células que expresan o sobreexpresan una integrina de interés (por ejemplo, integrina $\alpha_v\beta_6$) en un sujeto, comprendiendo el método administrar un conjugado peptídico o una composición que comprende el agente terapéutico como se describe en el presente documento al sujeto.

A. Péptidos de unión a integrina

En determinados aspectos, la presente invención proporciona conjugados peptídicos de unión a integrina PEGilados biterminales. Las integrinas son una superfamilia de receptores de adhesión celular que se unen a ligandos de la matriz extracelular, ligandos de superficie celular y ligandos solubles. Las integrinas son heterodímeros $\alpha\beta$ de transmembrana y en los seres humanos se conocen al menos 18 unidades α y ocho β , generando 24 heterodímeros. Las subunidades α y β tienen distintas estructuras de dominio, con dominios extracelulares de cada subunidad que contribuyen al sitio de unión a ligando del heterodímero. Ejemplos no limitantes de integrinas incluyen $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, $\alpha_{11}\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_E\beta_7$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$ y combinaciones de los mismos.

El péptido se une a integrina $\alpha_v\beta_6$ (por ejemplo, dianas). En determinados casos, el péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$

comprende la secuencia de aminoácidos $RGDLX_1X_2X_3$, en donde X_1 y X_2 son aminoácidos independientemente seleccionados y X_3 es Leu (L) o Ile (I). En determinados casos, X_1 es Q, X_2 es V y X_3 es L. A menos que especifique lo contrario, las posiciones de los aminoácidos en el presente documento se enumeran desde el extremo amino al extremo terminal carboxilo del polipéptido.

En algunos aspectos, los residuos $LX_1X_2X_3$ están presentes dentro de una α -hélice. Se entiende que una α -hélice es un grupo secuencial de aminoácidos en un péptido que interactúa con un patrón de puente de hidrógeno particular y así define una estructura helicoidal. Por ejemplo, el patrón de puente de hidrógeno en una α -hélice estándar está entre el oxígeno carbonilo del residuo n y el hidrógeno amida del residuo $n+4$. Para una 3_{10} -hélice, este patrón de puente de hidrógeno está entre los residuos n y $n+3$. Para una π -hélice, este patrón de puente de hidrógeno está entre los residuos n y $n+5$. El número de residuos por turno en cada α -hélice es de 3,6, 3,0 y 4,4 para la α -hélice estándar, 3_{10} -hélice y π -hélice, respectivamente. En un aspecto, la α -hélice del péptido permite que las cadenas laterales hidrófobas de los residuos LX_1X_2L/I sobresalgan de un lado de la hélice. En otro aspecto, la α -hélice tiene al menos un turno. Una α -hélice útil en la presente descripción puede ser una α -hélice mimética como se describe en, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 95/00534. Los miméticos de la α -hélice son estructuras α -helicoidales que son capaces de estabilizar la estructura de un péptido de origen natural o sintético.

Los péptidos de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ usados en los conjugados de la presente invención pueden comprender hélices estándar, 3_{10} -hélices, π -hélices o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, las hélices pueden comprender aminoácidos que forman una estructura "caperuza", tal como una caperuza amino terminal y/o una caperuza carboxilo terminal que flanquean la hélice.

En otras realizaciones, el péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ comprende la secuencia $RGDLX_1X_2LX_4X_5X_6$, en donde X_1 , X_2 , X_4 , X_5 y X_6 son aminoácidos seleccionados independientemente. En determinados casos, X_1 , X_2 , X_4 , X_5 y X_6 son residuos promotores de hélice. Por ejemplo, los residuos promotores de hélice pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en Glu, Ala, Leu, Met, Gln, Lys, Arg, Val, Ile, His, Thr, Trp, Phe y Asp. Los residuos promotores de hélice pueden comprender aminoácidos de origen natural o aminoácidos de origen no natural tal como aminoácidos artificiales o modificados. En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia $RGDLX_1X_2LX_4X_5X_6Z_n$, en donde Z es un residuo promotor de hélice y n es cualquier número entre 1 y 20. Preferentemente, n es entre 5 y 15 o p es entre 8 y 12. La extensión de la hélice para incluir los residuos helicoidales en la posición Z puede comprender además el dipolo de la hélice y proporcionar unión mejorada a la integrina $\alpha_v\beta_6$.

En realizaciones adicionales, el péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ puede representarse por la fórmula: $B_mRGDLX_1X_2LX_4X_5X_6Z_n$, en donde B es m aminoácidos que mejoran las interacciones hidrófobas con la hélice definida a partir de LX_1X_2L y también mejora la unión del dominio RGD, Z es un residuo promotor de hélice, n es un número entre 1 y 35 y m es un número entre 1 y 35. Preferentemente, m se selecciona para que B sea suficientemente largo para facilitar un núcleo de interacción hidrófobo/no covalente. La naturaleza exacta de estos residuos depende del diseño general de la región. En concreto, se prefiere que tenga una mezcla de interacciones hidrófobas (de los residuos tales como Val, Ile, Leu) y/o interacciones electrostáticas (usando Asp, Glu, Lys y/o Arg junto con su par de iones homólogos en X_1 y/o X_2).

En realizaciones particulares, el péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ comprende la secuencia de aminoácidos $RGDLX_1X_2X_3AQX_6$, en donde X_6 es Lys (K) o Arg (R). En realizaciones preferidas, X_6 es R.

En determinados aspectos, el péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de NAVPNLRGDLQVLAQKVART (A20FMDV2) NAVPNLRGDLQVLAQRVART (A20FMDV2 K16R), GFTTGRRGD-LATIHGMNRPF (A20LAP), YTASARGDLAHLTTTHARHL (A20FMDV1), y combinaciones de las mismas.

En otros aspectos, el péptido de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ comprende secuencia de aminoácidos $RSDLTPLFX_7$, en donde X_7 está ausente o es cualquier aminoácido. En determinados casos, X_7 está ausente (es decir, el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos $RSDLTPLF$). En determinados otros casos, X_7 es K (es decir, el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos $RSDLTPLFK$).

La integrina $\alpha_v\beta_6$, que es un receptor para fibronectina, tenascina, vitronectina, péptido asociado a la latencia (LAP) de TGF- β , y proteína de la cápside vírica (VP1) del virus de la enfermedad de pies y boca (FMDV), se expresa a niveles muy bajos o indetectables en solo un subgrupo de células epiteliales en tejidos adultos normales (Breuss et al., *J. Cell Sci.*, 108:2241-2251 (1995)). Sin embargo, la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_6$ se aumenta drásticamente durante el desarrollo, tras la lesión o la inflamación, o en una diversidad de neoplasias epiteliales. Por ejemplo, los queratinocitos muestran expresión *de novo* de integrina $\alpha_v\beta_6$ en tanto heridas bucales como de piel (et al., *supra*; Clark et al., *Am. J. Path.*, 148:1407-1421 (1996)). Además, la integrina $\alpha_v\beta_6$ desempeña un papel activo en la invasión tumoral debido a que su expresión es con frecuencia mayor en los márgenes invasivos de los carcinomas orales de células escamosas. Como resultado, la integrina $\alpha_v\beta_6$ es una excelente diana para tanto la obtención de imágenes como la terapia de enfermedades o trastornos tales como cáncer pancreático, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de mama y cáncer de colon. Por lo tanto, la PEGilación biterminal de los péptidos de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ con moléculas de PEG monodispersas, pequeñas que tienen una longitud de cadena definida (por ejemplo, PEG₂₈) puede usarse para

generar conjugados de la presente invención que muestran localización significativamente mejor y/o direccionamiento potencial mediante la proporción de alta selectividad y especificidad tumoral para tumores que expresan $\alpha_v\beta_6$ y que tienen mejor estabilidad y retención metabólica en el sitio tumoral cuando se compara con los péptidos que tienen PEGilación N- o C-terminal individual.

5

En algunas realizaciones, el péptido es un péptido bivalente que se une a la integrina y un receptor que se expresa conjuntamente con la integrina. Ejemplos no limitantes de receptores expresados conjuntamente incluyen CXCR4. En realizaciones particulares, el péptido bivalente se une a tanto la integrina $\alpha_v\beta_6$ como CXCR4. En otros aspectos, el receptor que se expresa conjuntamente con la integrina es otra integrina, por ejemplo, la integrina $\alpha_v\beta_3$ expresada conjuntamente con integrina $\alpha_v\beta_5$. En aspectos particulares, el péptido bivalente se une a tanto la integrina $\alpha_v\beta_3$ como la integrina $\alpha_v\beta_5$. En determinados casos, el péptido comprende un primer fragmento peptídico que se une a una integrina ligada a un segundo fragmento peptídico que se une a un receptor expresado conjuntamente. En otros casos, el péptido comprende un primer fragmento peptídico que se une a un receptor expresado conjuntamente ligado a un segundo fragmento peptídico que se une a una integrina. Los primeros y segundos fragmentos peptídicos pueden ligarse directamente entre sí o pueden ligarse a través de un enlazador de glicina u otro enlazador adecuado conocido en la materia. En algunos casos, el primer fragmento peptídico se somete a PEGilación en el extremo N y el segundo fragmento peptídico se somete a PEGilación en el extremo C, formando de este modo un conjugado peptídico bivalente PEGilado biterminal.

10

15

20

25

30

En otras realizaciones, el péptido de la invención tiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 45 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 45 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 12 y aproximadamente 45 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 aminoácidos de longitud o aproximadamente 35, 30, 25, 20, 15 o 10 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, el péptido puede tener aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 o más aminoácidos de longitud. Normalmente, el péptido no debe superar una longitud que permitiría la formación de una estructura terciaria, tal como, por ejemplo, mayor que 45 aminoácidos si está presente como una molécula aislada. Sin embargo, el péptido puede superar los 45 aminoácidos si se fusiona a una molécula mayor tal como un anticuerpo u otra proteína o macromolécula que podría prevenir la formación de una estructura terciaria dentro del péptido. El péptido también puede superar los 45 aminoácidos si es un péptido bivalente que tiene el primer y segundo fragmento peptídico que se unen a diferentes receptores. Preferentemente, el péptido tiene aproximadamente 20 aminoácidos de longitud.

35

40

45

Los péptidos usados en los conjugados de la invención también pueden ser variantes funcionales de los péptidos como se han definido anteriormente, incluyendo los péptidos que poseen al menos aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de identidad de secuencia con los péptidos descritos anteriormente. En determinados casos, los péptidos pueden comprender aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos de origen no natural. Ejemplos de aminoácidos de origen no natural incluyen, pero sin limitación, D-aminoácidos, ornitina, ácido diaminobutírico ornitina, norleucina ornitina, pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina, fenilglicina, aminoácidos alfa y alfa-disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, derivados de haluros de aminoácidos de origen natural (por ejemplo, trifluorotirosina, p-Cl-fenilalanina, p-Br-fenilalanina, p-1-fenilalanina, etc.), L-alilglicina, b-alanina, ácido L- α -amino butírico, ácido L-g-amino butírico, ácido L- α -amino isobutírico, ácido L-e-amino caproico, ácido 7-amino heptanoico, L metionina sulfona, L-norleucina, L-norvalina, p-nitro-L-fenilalanina, L-hidroxiprolina, L-tioprolina, derivados metilo de fenilalanina (por ejemplo, 1-metil-Phe, pentametil-Phe, L-Phe (4-amino), L-Tyr (metilo), L-Phe(4-isopropilo), L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico), ácido L-diaminopropiónico, L-Phe (4-bencilo), etc.). Los péptidos pueden modificarse adicionalmente. Por ejemplo, uno o más enlaces amida pueden reemplazarse por enlaces éster o alquilo de la cadena principal. Puede haber sustituyentes N- o C-alquilo, modificaciones de la cadena lateral o restricciones tales como los puentes disulfuro o los enlaces amida o éster de la cadena lateral.

50

55

60

Los péptidos usados en los conjugados de la invención pueden incluir tanto péptidos modificados como análogos de péptidos sintéticos. Los péptidos pueden modificarse para mejorar las propiedades de formulación y almacenamiento, o para proteger enlaces peptídicos lábiles incorporando estructuras no peptídicas. Los péptidos de la presente invención se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los péptidos pueden producirse por síntesis química, por ejemplo, usando técnicas de fase sólida y/o sintetizadores peptídicos automatizados o por medios recombinantes. En determinados casos, los péptidos pueden sintetizarse usando estrategias en fase sólida en un sintetizador de péptidos múltiples automatizado (Abimed AMS 422) usando la química del 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). A continuación, los péptidos pueden purificarse mediante HPLC de fase inversa y liofilizarse. Los péptidos pueden prepararse alternativamente mediante la escisión de un péptido mayor o la secuencia proteica completa. Por ejemplo, un fragmento que contiene el dominio de unión a integrina $\alpha_v\beta_6$ de la fibronectina, tenascina, vitronectina, el péptido asociado a la latencia (LAP) de TGF- β o la proteína de la cápside vírica (VP1) del virus de la enfermedad de pies y boca (FMDV) puede aislarse mediante la escisión de la proteína completa.

65

En otras realizaciones, el componente peptídico de los conjugados de la invención se puede ciclar. Los métodos son bien conocidos en la técnica para introducir estructuras cíclicas en los péptidos para seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales a la estructura que da como resultado una mejor estabilidad. Por ejemplo, se puede

añadir al péptido una cisteína C- o N-terminal, de manera que cuando se oxide el péptido contendrá un enlace disulfuro, generando un péptido cíclico. Otros métodos de ciclación de péptido incluyen la formación de tioéteres y amidas y ésteres del extremo carboxilo y amino. Se han desarrollado un número de técnicas sintéticas para generar péptidos circulares sintéticos (véase, por ejemplo, Tarn et al., *Protein Sci.*, 7:1583-1592 (1998); Romanovskis et al., *J. Pept. Res.*, 52: 356-374 (1998); Camarero et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 121: 5597-5598 (1999); Valero et al., *J. Pept. Res.*, 53(1): 56-67 (1999)). Generalmente, el papel de los péptidos de ciclación es dos veces: (1) reducir la hidrólisis *in vivo*; y (2) desestabilizar termodinámicamente el estado no plegado y fomentar la formación de la estructura secundaria.

IV. Métodos de administración

Los conjugados peptídicos de unión a integrina PEGilados biterminales de la presente invención tienen utilidad particular en la obtención de imágenes humano y veterinario, aplicaciones terapéuticas, de pronóstico y diagnóstico. Por ejemplo, los conjugados pueden usarse para la obtención de imágenes de tumores tales como los tumores malignos del páncreas (por ejemplo, adenocarcinomas, cistadenomas serosos, cánceres de células acinares, tumores neuroendocrinos pancreáticos tales como insulinomas, etc.) o cualquier tejido u órgano. Los conjugados también son útiles para tratar enfermedades y trastornos tales como cáncer (por ejemplo, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, etc.), enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema de pulmón y dermatopatía de herida crónica.

La administración de los conjugados peptídicos de la presente invención con un excipiente farmacéuticamente adecuado si fuera necesario se puede llevar a cabo a través de cualquiera de los modos de administración aceptados. Por tanto, la administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, tópica, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, oral, intra-articulación, parenteral, intra-arteriola, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal o por inhalación. Asimismo, cuando la inyección es para tratar un tumor, la administración puede ser directamente al tumor y/o dentro de los tejidos de alrededor del tumor.

Las composiciones que contienen un conjugado o una combinación de los conjugados de la presente invención pueden administrarse repetidamente, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más veces o la composición se puede administrar mediante infusión continua. Los sitios adecuados de administración incluyen, pero sin limitación, dérmicos, mucosos, bronquiales, gastrointestinales, anales, vaginales, ojos y oídos. Las formulaciones pueden tomar la forma de sólidos, semisólidos, polvo liofilizado o formas de administración líquidas, tal como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, pomadas, lociones, geles, aerosoles o similares, preferentemente en formas farmacéuticas unitarias adecuadas para la administración sencilla de dosificaciones precisas.

La expresión "forma farmacéutica unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos (por ejemplo, perros), conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el inicio deseado, la tolerancia y/o los efectos terapéuticos, conjuntamente con un excipiente farmacéutico adecuado (por ejemplo, una ampolla). Además, se pueden preparar composiciones más concentradas, de las cuales a continuación se pueden producir composiciones de dosis unitarias más diluidas. Las composiciones más concentradas contendrán así considerablemente más de, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces la cantidad de un conjugado o una combinación de conjugados.

Los métodos para preparar dichas formas farmacéuticas son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania (1990)). La composición a administrar contiene una cantidad del conjugado o la combinación de conjugados en una cantidad farmacéuticamente eficaz para la obtención de imágenes de un tumor, órgano o tejido o para el alivio de una afección a tratar, cuando se administra de acuerdo con las enseñanzas de esta invención. Además, las sales farmacéuticamente aceptables preferidas de los conjugados de la presente invención (por ejemplo, sales de adición de ácido) pueden prepararse y se incluyen en las composiciones usando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia de la química orgánica sintética y se describen, por ejemplo, por March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, 4ª Ed., Nueva York, Wiley-Interscience (1992)).

Las composiciones incluyen normalmente un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y pueden incluir adicionalmente otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes, diluyentes, potenciadores de la permeabilidad de los tejidos, solubilizantes y similares. Preferentemente, la composición contendrá de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 90 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 75 %, de aproximadamente un 0,1 % a un 50 % o de aproximadamente un 0,1 % a un 10 % en peso de un conjugado de la presente invención o una combinación del mismo, con el resto que consiste en vehículo y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes adecuados se pueden adaptar a la composición particular y la vía de administración mediante métodos bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, anterior *supra*.

Ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y

ácidos poliacrílicos tales como los carbopolos, por ejemplo, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; agentes conservantes, tales como metil-, etil- y propilhidroxibenzoatos (es decir, los parabenos); agentes ajustadores de pH, tal como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes; agentes colorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones pueden comprender también perlas de polímeros biodegradables, dextrano y complejos de inclusión de ciclodextrina.

Para la administración oral, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, pastillas para chupar, cápsulas, emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, pulverizadores, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Los excipientes adecuados para la administración oral incluyen los grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas adoptan la forma de una píldora, comprimido o cápsula, y por tanto, la resina puede contener, junto con el conjugado o la combinación de los conjugados, cualquiera de los siguientes: un diluyente, tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico y similares; un disgregante tal como almidón o derivados del mismo; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y un aglutinante tal como un almidón, goma arábiga, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y sus derivados. Los conjugados también pueden formularse en un supositorio dispuesto, por ejemplo, en un vehículo de polietilenglicol (PEG).

Las composiciones líquidas se pueden preparar disolviendo o dispersando un conjugado o una combinación y opcionalmente, uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables en un vehículo, tal como, por ejemplo, solución salina acuosa (por ejemplo, cloruro sódico al 0,9 % p/v), dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución o suspensión, por ejemplo, para la administración oral, tópica o intravenosa. Los conjugados de la presente invención también se pueden formular en un enema de retención.

Para la administración tópica, las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de emulsiones, lociones, geles, cremas, gelatinas, soluciones, suspensiones, pomadas y parches transdérmicos. Para la administración por inhalación, la composición puede administrarse como un polvo seco o en forma líquida a través de un nebulizador. Para la administración parenteral, las composiciones pueden estar en forma de soluciones estériles inyectables y polvos estériles envasados. Preferentemente, las soluciones inyectables se formulan a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar también en una forma liofilizada. Tales composiciones pueden incluir un tampón, por ejemplo, bicarbonato, para la reconstitución antes de la administración o el tampón se puede incluir en composición liofilizada para la reconstitución con, por ejemplo, agua. La composición liofilizada puede comprender además un vasoconstrictor adecuado, por ejemplo, epinefrina. La composición liofilizada se puede proporcionar en una jeringa, opcionalmente envasada junto con el tampón para reconstituir, de manera que la composición reconstituida se pueda administrar inmediatamente a un paciente.

Generalmente, las dosis administradas serán eficaces para suministrar concentraciones picomolares a micromolares del conjugado al sitio o sitios apropiados. Sin embargo, un experto en la materia entiende que la dosis administrada variará dependiendo de un número de factores, incluyendo, pero sin limitación, el conjugado o conjunto de conjugados en particular a administrar, el modo de administración, el tipo de aplicación (por ejemplo, obtención de imágenes, diagnóstico, pronóstico, aplicaciones terapéuticas, etc.), la edad del paciente y la condición física del paciente. Preferentemente, debe usarse la dosis y la concentración más pequeña requerida para producir el resultado deseado. La dosis debe ajustarse apropiadamente para los niños, ancianos, pacientes debilitados y pacientes con enfermedad cardíaca y/o hepática. Se puede obtener una guía adicional a partir de los estudios conocidos en la técnica usando los modelos animales experimentales para la evaluación de la dosis. Sin embargo, la aumentada estabilidad metabólica, retención tumoral y relaciones de tumor y sangre asociadas a los conjugados de la presente invención permite un margen más amplio de seguridad para las concentraciones de la dosis y para la dosificación repetida.

V. Aplicaciones terapéuticas

En determinados aspectos, los conjugados peptídicos de unión a integrina PEGilados biterminales de la presente invención se usan para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por integrina en un sujeto que lo necesite. Ejemplos de enfermedades o trastornos adecuados para el tratamiento con los conjugados peptídicos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, alergia, trastorno de ansiedad, enfermedad autoinmunitaria, trastorno del comportamiento, defecto congénito, trastorno de la sangre, osteopatía, cáncer, fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), dermatopatía de herida crónica, enfermedad circulatoria, enfermedad de los dientes, trastorno depresivo, trastorno disociativo, afección del oído, trastorno alimentario, afección ocular, alergia alimentaria, enfermedad transmitida por los alimentos, enfermedad gastrointestinal, trastorno genético, cardiopatía, trastorno hormonal, inmunodeficiencia, enfermedad infecciosa, enfermedad inflamatoria, enfermedad de transmisión por insecto, trastorno nutricional, nefropatía, leucodistrofia, enfermedad hepática, enfisema pulmonar, trastorno de la salud mental, enfermedad metabólica, trastorno del estado de ánimo, trastorno musculodegenerativo, trastorno neurológico, trastorno neurodegenerativo, trastorno neuromuscular, trastorno de la personalidad, fobias,

complicaciones del embarazo, enfermedad priónica, trastorno prostático, trastorno fisiológico, trastorno psiquiátrico, enfermedad respiratoria, trastorno sexual, dermatopatía, trastorno del sueño, trastorno específico del lenguaje, lesión deportiva, enfermedad tropical, trastorno vestibular y enfermedad del desgaste. Preferentemente, la enfermedad o trastorno mediado por $\alpha\beta_6$ es cáncer, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema pulmonar y dermatopatía de herida crónica (por ejemplo, epidermolísis bullosa).

El cáncer generalmente incluye cualquiera de diversas neoplasias malignas caracterizadas por la proliferación de células anaplásicas que tienden a invadir el tejido de alrededor y sufrir metástasis en nuevos sitios del cuerpo. Ejemplos no limitantes de diferentes tipos de cáncer adecuados para el tratamiento usando los conjugados o las composiciones de la presente invención incluyen cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides, cáncer de hígado, cáncer pleural, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de colon, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de recto, cáncer del apéndice, cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer renal (es decir, carcinoma de células renales), cáncer del sistema nervioso central, cáncer de piel, coriocarcinomas, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de huesos, sarcomas osteogénicos, fibrosarcoma, neuroblastoma, glioma, melanoma, leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica o leucemia de células pilosas), linfoma (por ejemplo, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de linfocito B o linfoma de Burkitt), y mieloma múltiple.

Un experto en la materia apreciará también que los conjugados de la presente invención pueden administrarse conjuntamente con otros agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer. Los agentes anticancerosos adecuados para la terapia de combinación incluyen, sin limitación, citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, agentes antimitóticos, procarbazona, hidroxiaurea, asparaginasa, corticoesteroides, interferones, radiofármacos, péptidos con actividad antitumoral tal como TNF- α , sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; derivados de los mismos, profármacos de los mismos y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende uno o más conjugados de la presente invención puede administrarse a un paciente antes, durante o después de la administración de un agente anticanceroso o la combinación de agentes anticancerosos o antes, durante o después de quimioterapia. El tratamiento con el conjugado después de la quimioterapia puede ser particularmente útil para reducir y/o prevenir la reaparición del tumor o la metástasis. En algunas realizaciones, el agente anticanceroso puede ligarse covalentemente directa o indirectamente (por ejemplo, a través de liposomas o nanopartículas) a un péptido de unión a integrina PEGilado biterminal como se describe en el presente documento.

Las enfermedades inflamatorias normalmente incluyen enfermedades o trastornos caracterizados o causados por la inflamación. La inflamación puede dar como resultado una respuesta local a la lesión celular que está marcada por dilatación capilar, infiltración de leucocitos, enrojecimiento, calor y dolor que sirve como un mecanismo de iniciación de la eliminación de los agentes nocivos y el tejido dañado. El sitio de la inflamación puede incluir, por ejemplo, los pulmones, la pleura, un tendón, un nódulo o ganglio linfático, la úvula, la vagina, el cerebro, la médula espinal, las membranas mucosas nasales y faríngeas, un músculo, la piel, el hueso o tejidos blandos, una articulación, la vejiga urinaria, la retina, el cuello del útero, el canto, el tracto gastrointestinal, la vértebra, el recto, el ano, una bolsa, un folículo y similares. Ejemplos de enfermedades inflamatorias adecuadas para tratamiento usando los conjugados de la presente invención incluyen, pero sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), enfermedades reumatoideas tales como artritis reumatoide, fibrositis, enfermedad inflamatoria pélvica, acné, psoriasis, actinomicosis, disentería, cirrosis biliar, enfermedad de Lyme, erupción por calor, síndrome de Stevens-Johnson, paperas, pénfigo vulgar y blastomicosis.

Las enfermedades autoinmunitarias generalmente incluyen enfermedades o trastornos que dan como resultado una respuesta inmunitaria frente a un componente de autot Tejido o tejido tal como, por ejemplo, una autorespuesta a anticuerpo o respuesta mediada por la célula. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias adecuadas para el tratamiento usando los conjugados de la presente invención incluyen, sin limitación, enfermedades autoinmunitarias en órganos específicos, en las que una respuesta autoinmunitaria se dirige contra un tejido único, tal como la diabetes mellitus de tipo I, miastenia grave, vitíligo, enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Addison, gastritis autoinmunitaria y hepatitis autoinmunitaria; y enfermedades autoinmunitarias no en un órgano específico, en las que una respuesta autoinmunitaria se dirige contra un componente presente en varios o muchos órganos por todo el cuerpo, como el lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica progresiva y variantes, polimiositis y dermatomiositis. Enfermedades autoinmunitarias adicionales incluyen, por ejemplo, anemia perniciosa, cirrosis biliar primaria, trombocitopenia autoinmunitaria, el síndrome de Sjogren y esclerosis múltiple.

Un experto en la materia apreciará que los conjugados de la presente invención pueden administrarse conjuntamente con otros agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias. Los agentes antiinflamatorios adecuados para la terapia de combinación incluyen, sin limitación, corticoesteroides, agentes antiinflamatorios no esteroideos, anticuerpos tales como infliximab, 5-aminosalicilatos, antibióticos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; derivados de los mismos, profármacos de los mismos y combinaciones de los mismos. Los agentes inmunosupresores adecuados para la terapia de combinación incluyen, sin limitación,

azatioprina y metabolitos de la misma, antimetabolitos, tales como metotrexato, anticuerpos inmunosupresores, monofosfato de mizoribina, ciclosporina, escoparona, FK-506 (tacrolimus), FK-778, rapamicina (sirolimus), acetato de glatirámico, micopehnolato, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, profármacos de los mismos y combinaciones de los mismos.

En otra realización, los conjugados de la presente invención son útiles para tratar una infección o enfermedad causada por, por ejemplo, un virus, bacteria, hongo, parásito y otro agente infeccioso. Ejemplos no limitantes de enfermedades infecciosas adecuadas para el tratamiento incluyen, pero sin limitación, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA/VIH) o trastornos asociados al VIH, síndrome de Alpers, carbunco, encefalopatía espongiforme bovina (enfermedad de las vacas locas), varicela, cólera, conjuntivitis, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), dengue, Ébola, elefantiasis, encefalitis, insomnio familiar fatal, enfermedad de Fliih, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, hantavirus, *Helicobacter pylori*, hepatitis (hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C), herpes, gripe (por ejemplo, gripe aviar A (gripe de las aves)), Kuru, lepra, enfermedad de Lyme, paludismo, fiebre hemorrágica (por ejemplo, fiebre del valle del Rift, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, fiebre de Lassa, enfermedad del virus Marburg y fiebre homorrágica del ébola), sarampión, meningitis (vímica, bacteriana), mononucleosis, infecciones nosocomiales, otitis media, enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), peste, neumonía, polio, enfermedad priónica, rabia, fiebre reumática, roséola, infección por virus del río Ross, rubéola, salmonelosis, artritis séptica, enfermedades de transmisión sexual (ETS), culebrilla, viruela, amigdalitis estreptocócica, tétanos, síndrome de choque tóxico, toxoplasmosis, tracoma, tuberculosis, tularemia, fiebre tifoidea, fiebre del valle, tosferina y fiebre amarilla.

En determinadas realizaciones, los conjugados de la presente invención son útiles para tratar un trastorno neurológico o musculoesquelético. Ejemplos de dichos trastornos incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Aicardi, amnesia, esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig), anencefalia, afasia, aracnoiditis, malformación de Chiari, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, parálisis de Bell, lesión del plexo braquial, lesión cerebral, tumor cerebral, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, encefalitis, epilepsia, temblor esencial, síndrome de Guillain-Barre, hidrocefalia, hiperhidrosis, enfermedad de Krabbe, meningitis, síndrome de Moebius, distrofia muscular, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, neuropatía periférica, síndrome de taquicardia ortostática postural, parálisis supranuclear progresiva, síndrome de Reye, culebrilla, síndrome de Shy-Drager, tortícolis espasmódica, espina bífida, atrofia muscular espinal, síndrome de Stiff Man, sinestesia, siringomielia, síndrome de la abertura torácica superior, síndrome de Tourette, toxoplasmosis y neuralgia trigeminal.

Cuando se usan en aplicaciones terapéuticas, los conjugados de la presente invención normalmente tienen un agente terapéutico covalentemente o no covalentemente unido a uno o más del péptido o la primera o segunda fracción de PEG. En determinados casos, el agente terapéutico es citotóxico. Los agentes terapéuticos adecuados proporcionan propiedades beneficiosas, profilácticas y terapéuticas a un sujeto e incluyen, pero sin limitación, radionúclidos, agentes quimioterapéuticos, nanopartículas, nanogotitas, fármacos liposómicos y citocinas. Un experto en la materia estará familiarizado con los métodos para la unión de los agentes terapéuticos a los grupos funcionales presentes en el péptido o fracción de PEG. Por ejemplo, el agente terapéutico puede unirse directamente al péptido o parte de PEG del conjugado a través de unión covalente del agente terapéutico a un grupo amina primario presente en el péptido o fracción de PEG. Un experto en la materia apreciará que un agente terapéutico también puede unirse al péptido o la parte de PEG del conjugado a través de interacciones no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo, etc.).

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico citotóxico. Los agentes quimioterapéuticos citotóxicos son bien conocidos en la técnica e incluyen agentes anticancerosos tales como los agentes alquilantes (por ejemplo, mostaza nitrogenada tal como mecloretamina (NH₂), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcosina) y clorambucilo), etileniminas y metilmelaminas (por ejemplo, hexametilmelamina, tiotepa, sulfonatos de alquilo tales como busulfán, nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU), y estreptozoeina (estreptozotocina) y triazenos tales como decarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazolcarboxamida)), antimetabolitos (por ejemplo, análogos de ácido fólico tales como metotrexato (ametopterina), análogos de pirimidina tales como fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUdR), y análogos de citarabina (citocina arabinósido) y purina e inhibidores relacionados tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; 6-TG) y pentostatina (2'-desoxicoftocina)), productos naturales (por ejemplo, alcaloides de la vinca tales como vinblastina (VLB) y vincristina, epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido, antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina Q), enzimas tales como L-asparaginasa y modificadores de la respuesta biológica, tales como alfenomas de interferón), diversos agentes (por ejemplo, complejos de coordinación de platino tales como cisplatino (cis-DDP) y carboplatino, antracenedionas tales como mitoxantrona y antbraciclina, ureas sustituidas tales como hidroxiaurea, derivados de metilhidrazina tales como procarbazona (N-metilhidrazina; MIH), supresores adrenocorticales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida, paclitaxel (taxol) y análogos/derivados y agonistas/antagonistas de la hormona tales como flutamida y tamoxifeno) y combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, uno o más del péptido o la primera o segunda fracción de PEG del conjugado se liga a una partícula que contiene el agente terapéutico. Las partículas en este caso incluyen, pero sin limitación, nanopartículas y vesículas basadas en lípidos tales como liposomas u otras estructuras similares compuestas de lípidos. Los

liposomas normalmente son vesículas esféricas que comprenden una bicapa fosfolípida que puede usarse como agentes para la administración de materiales tales como fármacos u otros compuestos. Los liposomas pueden estar compuestos de fosfolípidos naturalmente derivados con cadenas lipídicas mezcladas (fosfatidiletanolamina de huevo) o de componentes puros tipo dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). La síntesis y el uso de los liposomas ahora está bien establecida en la técnica. Los liposomas generalmente se crean mediante la sonicación de fosfolípidos en un medio adecuado tal como agua. Bajas tasas de cizallamiento crean liposomas multilamelares que tienen estructuras multicapeadas. La sonicación de alto cizallamiento continuo tiende a formar liposomas unilamelares más pequeños. La investigación también ha sido capaz de posibilitar que los liposomas eviten la detección por el sistema inmunitario, por ejemplo, revistiendo los liposomas con polietilenglicol (PEG). También es posible incorporar especies en liposomas, tales como los conjugados peptídicos de la presente invención, para ayudar a dirigirlos a un sitio de administración, por ejemplo, a células, tumores, órganos, tejidos y similares.

El uso de nanopartículas como agentes de administración para los materiales asociados a o unidos a las nanopartículas es bien conocido en la técnica. Algunos tipos de nanopartículas comprenden un núcleo, con frecuencia átomos metálicos o semiconductores, a los cuales se pueden ligar uno o más del péptido o la primera o segunda fracción de PEG del conjugado (véase, por ejemplo, las publicaciones del PCT N.º WO 02/32404, WO 05/10816 y WO 05/116226). Pueden formarse otros tipos de nanopartículas a partir de materiales tales como liposomas. En algunos casos, las nanopartículas pueden ser puntos cuánticos, por ejemplo, nanocristales de materiales semiconductores que tienen propiedades químicas y físicas que difieren notablemente de aquellas del sólido a granel (véase, por ejemplo, Gleiter, *Adv. Mater.*, 4:474-481 (1992)). Ahora que se entienden sus efectos del tamaño cuántico, la investigación fundamental y aplicada de estos sistemas ha llegado a ser cada vez más popular. Una aplicación interesante es el uso de nanocristales como marcadores luminiscentes para los sistemas biológicos (véase, por ejemplo, Brucher et al., *Science*, 281:2013-2016 (1998); Chan et al., *Science*, 281:2016-2018 (1998); Mattousi et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 122:12142-12150 (2000); y Alivisatos, *Pure Appl. Chem.*, 72:3-9 (2000)). Los puntos cuánticos tienen varias ventajas sobre los tintes fluorescentes convencionales. Por ejemplo, los puntos cuánticos emiten luz en una diversidad de longitudes de onda precisas dependiendo de su tamaño y tienen vidas luminiscentes largas.

En realizaciones adicionales, el agente terapéutico es un péptido o polipéptido citotóxico capaz de fomentar la muerte celular. Los péptidos y polipéptidos citotóxicos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ricina, abrina, exotoxina de *Pseudomonas*, factor tisular y similares. El uso de ricina como agente citotóxico se describe en Burrows et al., *P.N.A.S. EE.UU.*, 90:8996-9000 (1993). El uso del factor tisular, que conduce a la coagulación sanguínea localizada y al infarto de un tumor, se describe en Ran et al., *Cancer Res.*, 58:4646-4653 (1998) y Huang et al., *Science*, 275:547-550 (1997). Tsai et al., *Dis. Colon Rectum*, 38:1067-1074 (1995) describe la cadena de abrina A conjugada a un anticuerpo monoclonal. Otras proteínas de inactivación de ribosomas se describen como agentes citotóxicos en la publicación PCT N.º WO 96/06641. La exotoxina de *Pseudomonas* también puede usarse como el polipéptido citotóxico (véase, por ejemplo, Aiello et al., *P.N.A.S. EE.UU.*, 92:10457-10461 (1995)). Determinadas citocinas, tales como TNF- α y IL-2, también pueden ser útiles como agentes citotóxicos y/o terapéuticos.

Determinados átomos radiactivos también pueden ser citotóxicos si se suministran en dosis suficientes. Por tanto, el agente terapéutico puede comprender un átomo radiactivo que, durante su uso, suministra una cantidad suficiente de radiactividad al sitio diana para que sea citotóxico. Los átomos radioactivos adecuados para su uso en los conjugados peptídicos de la presente invención incluyen cualquiera de los radionúclidos descritos en el presente documento, o cualquier otro isótopo que emite la suficiente energía para destruir una célula diana, tumor, órgano o tejido. Preferentemente, los isótopos y la densidad de los átomos radiactivos en el conjugado son de tal modo que se administra una dosis de al menos aproximadamente 4000, 6000, 8000 o 10000 cGy al sitio diana y, preferentemente, a las células en el sitio diana y a sus orgánulos, particularmente el núcleo. El átomo radiactivo puede unirse a uno o más del péptido o la primera o segunda fracción de PEG del conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, EDTA u otro agente quelante pueden unirse al péptido o la fracción de PEG y usarse para unir ^{111}In o ^{90}Y . En algunos casos, los residuos de tirosina presentes en el péptido pueden marcarse con ^{125}I o ^{131}I . Preferentemente, el grupo benzoilo se une al péptido o a la fracción de PEG y se usa para unir ^{18}F o ^{19}F . Por ejemplo, el ácido 4- ^{18}F -fluorobenzoico o el ácido 4- ^{19}F -fluorobenzoico pueden usarse para radiomarcarse los conjugados peptídicos de la presente invención.

VI. Aplicaciones de obtención de imágenes

En determinados otros aspectos, los conjugados peptídicos de unión a integrina PEGilados biterminales de la presente invención se usan como agentes de obtención de imágenes ópticas *in vivo* (por ejemplo, radiotrazadores o sondas para imágenes) de tejidos y órganos en diversas aplicaciones biomédicas incluyendo, pero sin limitación, imágenes de los tumores, imágenes tomográficas de órganos, seguimiento de funciones orgánicas, angiografía coronaria, endoscopia por fluorescencia, cirugía guiada por láser, métodos fotoacústicos y de sonofluorescencia y similares. En una realización, los conjugados de la invención son útiles para la detección de la presencia de tumores y otras anomalías mediante el monitoreo de dónde se concentra el conjugado particular en un sujeto. En otra realización, los conjugados son útiles para la cirugía guiada asistida por láser para la detección de micrometástasis de tumores tras la laparoscopia. En otra realización adicional, los conjugados son útiles en el diagnóstico de placas ateroscleróticas y coágulos de sangre.

En realizaciones adicionales, los conjugados de la presente invención son útiles en el diagnóstico por imágenes de:

(1) enfermedades oculares en la oftalmología, por ejemplo, para aumentar la visualización de enfermedades coriorretinales tales como enfermedades vasculares, retinopatías, neovascularización y tumores a través de la obtención de imágenes por microscópica directa; (2) dermatopatías tales como tumores de la piel a través de la obtención de imágenes por microscópica directa; (3) enfermedades gastrointestinales, oral, bronquiales, cervicales y

5 urinarias y tumores a través de endoscopia; (4) placas ateroscleróticas y otras anomalías vasculares a través de los catéteres endoscópicos flexibles; y (5) tumores pancreáticos, tumores de mama, tumores cerebrales, perfusión y apoplejía por reconstrucción de imágenes 2D o 3D.

Los conjugados de la presente invención se pueden administrar sistémica o localmente al tumor, órgano o tejido del

10 que se va a realizar imágenes, antes del procedimiento de captura de imágenes. Generalmente, los conjugados se administran en dosis eficaces para conseguir la imagen óptica deseada de un tumor, tejido u órgano. Tales dosis pueden variar ampliamente, dependiendo del conjugado particular empleado, el tumor, tejido u órgano sometido al procedimiento de captura de imágenes, el equipo para la captura de imágenes usado y similares.

En algunas realizaciones, los conjugados descritos en el presente documento pueden usarse para teñir o marcar directamente una muestra para que la muestra se pueda identificar o cuantificar. Por ejemplo, puede añadirse un conjugado específico como parte de un ensayo de un analito diana biológico (por ejemplo, antígeno), como elemento trazador detectable en un fluido biológico o no biológico o para otros propósitos *in vitro* conocidos por el experto en la materia. Normalmente, la muestra se obtiene directamente de una fuente líquida o como un lavado de un material

20 sólido (orgánico o inorgánico) o un medio de cultivo en el que se han introducido células para el cultivo, o una solución tampón en la que se han colocado las células para su evaluación. Cuando la muestra comprende células, las celdas son opcionalmente células sueltas, incluyendo microorganismos, o células múltiples asociadas con otras células en capas bi o tridimensionales, incluidos los organismos pluricelulares, embriones, tejidos, biopsias, filamentos, biopelículas, y similares.

Una respuesta detectable generalmente se refiere a un cambio en, u ocurrencia de, una señal óptica que es detectable mediante observación o instrumentalmente. En determinados casos, la respuesta detectable es radiactiva (es decir, radiación), incluyendo partículas alfa, partículas beta, nucleones, electrones, positrones, neutrinos y rayos gamma emitidos por una sustancia radiactiva tal como un radionúclido. En determinados otros casos, la respuesta detectable

30 es fluorescencia o un cambio en la fluorescencia, por ejemplo, un cambio en la intensidad de la fluorescencia, excitación de la fluorescencia o distribución de la longitud de onda de emisión, vida de la fluorescencia y/o polarización de la fluorescencia. Un experto en la materia apreciará que el grado y/o la localización del marcado en un sujeto o muestra puede compararse con un patrón o control (por ejemplo, tejido u órgano sano).

Cuando se usan en aplicaciones de captura de imágenes, los conjugados de la presente invención normalmente tienen un agente de obtención de imágenes covalentemente o no covalentemente unido a uno o más del péptido o la primera o segunda fracción de PEG. Los agentes de obtención de imágenes adecuados incluyen, pero sin limitación, radionúclidos, etiquetas detectables, fluoróforos, proteínas fluorescentes, proteínas enzimáticas y similares. Un experto en la materia estará familiarizado con los métodos para la unión de los agentes de obtención de imágenes a

40 los grupos funcionales presentes en el péptido o fracción de PEG. Por ejemplo, el agente de obtención de imágenes puede unirse directamente al péptido o parte de PEG del conjugado a través de unión covalente del agente de obtención de imágenes a un grupo amina primario presente en el péptido o fracción de PEG. Un experto en la materia apreciará que un agente de obtención de imágenes también puede unirse al péptido o la parte de PEG del conjugado a través de interacciones no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno,

45 las fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo, etc.).

En determinados casos, el conjugado se radiomarca con un radionúclido uniendo directamente el radionúclido a uno o más del péptido de la primera o segunda fracción de PEG del conjugado. En determinados otros casos, un grupo benzoilo marcado con el radionúclido se une directamente al péptido o fracción de PEG del conjugado. Por ejemplo,

50 el ácido 4- ^{18}F -fluorobenzoico (^{18}F FBA) o el ácido 4- ^{19}F -fluorobenzoico (^{19}F FBA) pueden usarse para radiomarcarse los conjugados de la presente invención. En casos adicionales, el radionúclido está unido a un agente quelante o enlazador de agente quelante unido al conjugado. Los radionúclidos adecuados para la conjugación directa incluyen, sin limitación, ^{18}F , ^{19}F , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I y mezclas de los mismos. Los radionúclidos adecuados para su uso con un agente quelante incluyen, sin limitación, ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho ,

55 ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi y mezclas de los mismos. Los agentes quelantes adecuados incluyen, pero sin limitación, DOTA, NOTA, NOTA-TCO, BAD, TETA, DTPA, EDTA, NTA, HDTA, sus análogos de fosfonato y mezclas de los mismos. Un experto en la materia estará familiarizado con los métodos para la unión de radionúclidos, agentes quelantes y enlazadores del agente quelante a los conjugados de la presente invención. En concreto, la unión puede llevarse a cabo convenientemente usando, por ejemplo, grupos de enlace bifuncional comercialmente disponibles

60 (generalmente grupos de enlace heterobifuncionales) que pueden unirse a un grupo funcional presente en una posición no interferente sobre el conjugado y, a continuación, se liga además a un radionúclido, agente quelante o enlazador de agente quelante.

Ejemplos no limitantes de fluoróforos o colorantes fluorescentes adecuados para su uso como agentes de obtención de imágenes incluyen colorantes Alexa Fluor® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™; rodamina, rojo Texas, tetra-rodamina isotiocianato (TRITC), flúor CyDye™ (por

65

ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5) y similares.

Ejemplos de proteínas fluorescentes adecuadas para su uso como agentes de obtención de imágenes incluyen, pero sin limitación, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja (por ejemplo, DsRed), proteína fluorescente amarilla, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente azul y variantes de los mismos (véase, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. N.º 6.403.374, 6.800.733 y 7.157.566). Ejemplos específicos de variantes de GFP incluyen, pero sin limitación, GFP mejorada (EGFP), EGFP desestabilizada, las variantes de GFP descritas en Doan et al., *Mol. Microbiol.*, 55:1767-1781 (2005), la variante de GFP descrita en Cramer et al., *Nat. Biotechnol.*, 14:315-319 (1996), las proteínas fluorescentes azul cerúleo descritas en Rizzo et al., *Nat. Biotechnol.*, 22:445 (2004) y Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, 67:509 (1998) y la proteína fluorescente amarilla descrita en Nagai et al., *Nat. Biotechnol.*, 20:87-90 (2002). Variantes de DsRed se describen en, por ejemplo, Shaner et al., *Nat. Biotechnol.*, 22:1567-1572 (2004), e incluyen mStrawberry, mCherry, mOrange, mBanana, mHoneydew y mTangerine. Las variantes de DsRed adicionales se describen en, por ejemplo, Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101:16745-16749 (2004) e incluyen mRaspberry y mPlum. Ejemplos adicionales de variantes DsRed incluyen mRFPmars descritos en Fischer et al., *FEBS Lett.*, 577:227-232 (2004) y mRFPruby descrito en Fischer et al., *FEBS Lett.*, 580:2495-2502 (2006).

En otras realizaciones, el agente de obtención de imágenes que se une a un conjugado de la presente invención comprende una etiqueta detectable tal como, por ejemplo, biotina, avidina, estreptavidina o neutravidina. En realizaciones adicionales, el agente de obtención de imágenes comprende una proteína enzimática que incluye, pero sin limitación, luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, peroxidasa de rábano picante, xilanasas, fosfatasa alcalina y similares.

Cualquier dispositivo o método conocido en la técnica para detectar las emisiones radiactivas de los radionúclidos en un sujeto es adecuado para su uso en la presente invención. Por ejemplo, los métodos tales como la tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), que detecta la radiación de un radionúclido gamma emisor de fotón único usando una cámara gamma rotatoria y escintigrafía de radionúclido, que obtiene una imagen o serie de imágenes secuenciales de la distribución de un radionúclido en tejidos, órganos o sistemas corporales usando una cámara gamma de centelleo, puede usarse para detectar la radiación emitida de un conjugado radiomarcado de la presente invención. La tomografía de emisión de positrones (PET) es otra técnica adecuada para la detección de la radiación en un sujeto. Por otra parte, la patente de Estados Unidos N.º 5.429.133 describe una sonda laparoscópica para la detección de la radiación concentrada en tumores de tejido sólido. Los detectores de radiación miniatura y flexible previstos para el uso médico se producen por Intra-Medical LLC (Santa Monica, CA). La obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) o cualquier otra técnica de obtención de imágenes conocida por el experto en la materia también es adecuada para detectar las emisiones radiactivas de los radionúclidos. Sin reparar en el método o dispositivo usado, dicha detección tiene como objetivo determinar dónde se concentra el conjugado en un sujeto, siendo dicha concentración un indicador de la localización de un tumor o células tumorales.

La obtención de imágenes por fluorescencia no invasiva de animales y seres humanos también proporciona información de diagnóstico o pronóstico *in vivo* y puede usarse en una amplia variedad de especialidades clínicas. Por ejemplo, se han desarrollado técnicas durante los años para observaciones oculares simples tras la excitación por UV para la obtención de imágenes por espectroscopia sofisticada usando equipo avanzado (véase, por ejemplo, Andersson-Engels et al., *Phys. Med. Biol.*, 42:815-824 (1997)). Los dispositivos o métodos específicos conocidos en la técnica para la detección *in vivo* de fluorescencia, por ejemplo, de fluoróforos o proteínas fluorescentes, incluyen, pero sin limitación, fluorescencia cerca del infrarrojo *in vivo* (véase, por ejemplo, Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7:626-634 (2003)), sistema de obtención de imágenes por fluorescencia *in vivo* Maestro™ (Cambridge Research & Instrumentation, Inc.; Woburn, MA), la obtención de imágenes por fluorescencia *in vivo* usando un escáner de punto flotante (véase, por ejemplo, Ramanujam et al., *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 48:1034-1041 (2001)), y similares.

Otros métodos o dispositivos para la detección de una respuesta óptica incluyen, sin limitación, inspección visual, cámaras CCD, videocámaras, película fotográfica, dispositivos de escáneres láser, fluorómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, microscopios de epifluorescencia, microscopios de barrido, citómetros de flujo, lectores de microplaca de fluorescencia y amplificación de la señal usando tubos fotomultiplicadores.

VII. Kits de la invención

La presente invención también proporciona kits para facilitar y/o estandarizar el uso de los conjugados y las composiciones descritas en el presente documento, así como para facilitar los métodos descritos en el presente documento. Los materiales y reactivos para llevar a cabo estos diferentes métodos pueden proporcionarse en kits para facilitar la ejecución de los métodos. Como se usa en el presente documento, el término "kit" incluye una combinación de artículos que facilita un proceso, ensayo, análisis o manipulación. En concreto, los kits que comprenden los conjugados o composiciones de la presente invención encuentran utilidad en un amplio rango de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, inmunoterapia y obtención de imágenes *in vivo* de una célula, tumor, órgano, tejido, bioagregado, biopelícula o similares.

Los kits pueden contener reactivos químicos así como otros componentes. Además, los kits de la presente invención

pueden incluir, sin limitación, instrucciones al usuario del kit (por ejemplo, direcciones para su uso del conjugado o composición en la inmunoterapia, direcciones para su uso del conjugado o la composición en la obtención de imágenes de una célula, tumor, órgano o tejido. etc.), aparato y reactivos para la colección y/o purificación de la muestra, aparato y reactivos para la colección y/o purificación del producto, reactivos para la transformación celular bacteriana, reactivos para la transfección celular eucariota, células hospedadoras previamente transformadas o transfectadas, tubos de muestra, soportes, bandejas, estantes, platos, placas, soluciones, tampones u otros reactivos químicos, muestras adecuadas que se van a usar para la estandarización, normalización y/o control de las muestras. Los kits de la presente invención también puede empaquetarse para almacenamiento conveniente y el transporte seguro, por ejemplo, en una caja que tiene una tapa.

VIII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1. PEGilación biterminal para mejores farmacocinéticas y estabilidad *in vivo* de péptidos de direccionamiento.

Este ejemplo ilustra que FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈, una sonda de obtención de imágenes molecular basada en péptido (conjugado) de la presente invención, se dirige selectivamente a la integrina $\alpha_v\beta_6$ y posee un perfil farmacocinético ventajoso. La sonda se basa en un núcleo de 20 aminoácidos denominado A20FMDV2, que se origina a partir de un fragmento peptídico de la proteína cubierta del virus de la enfermedad de pies y boca (Jackson et al., *Virus Res.*, 2003;91:33-46; Logan et al., *Nature*, 1993;362:566-8), con la secuencia de aminoácidos NAVPNLRGDLQVLAQKVART (usando identificadores de aminoácidos de una letra, escritos de izquierda a derecha desde el extremo N a C). Notablemente, el péptido se ha modificado con cadenas de PEG monodispersas (Roberts et al., *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2002;54:459-76; Knop et al., *Angewandte Chemie.*, 2010;49:6288-308), es decir, cadenas de PEG con un número exactamente definido de unidades de repetición de etilenglicol "n", en el extremo N y C para mejor captación en el tumor marcado por $\alpha_v\beta_6$ y las farmacocinéticas. La sonda de obtención de imágenes también lleva un grupo prostético de ácido fluobenzoico portador de flúor-18 (¹⁸F FBA) para la detección por sondas gamma o dentro de un escáner de tomografía de emisión de positrones (PET).

Introducción

Las integrinas son un grupo de receptores de la superficie celular de transmembrana bidireccionales heterodiméricos (Hynes, *Cell*, 2002;110:673-87). Mientras que la mayoría de las integrinas son esenciales para la función biológica apropiada, algunas de ellas están altamente localizadas y significativamente reguladas al alza solo en el tejido enfermo. Entre aquellas, la integrina $\alpha_v\beta_6$, alfa(v)beta(6), se ha reconocido como un marcador importante durante la tumorigénesis (Bandyopadhyay et al., *Current Drug Targets*, 2009;10:645-52) y se ha identificado como un indicador de pronóstico que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad para las malignidades desafiantes tales como el cáncer de pulmón (Elayadi et al., *Cancer Res.*, 2007;67:5889-95), cáncer colorrectal (Bates, *Cell Cycle*, 2005;4:1350-2), cáncer de cuello uterino (Hazelbag et al., *J. Pathol.*, 2007;212:316-24) y cáncer gástrico (Zhang et al., *Clin Oncol-UK*, 2008;20:61-6).

Por lo tanto, la localización y la cuantificación *in vivo* fiable de los niveles de expresión de $\alpha_v\beta_6$ podría hacer contribuciones significativas para la apropiada detección, caracterización y tratamiento (personalizado) de la enfermedad. También proporcionaría información sobre la homogeneidad (o heterogeneidad) de la malignidad y ayudar a la detección de la enfermedad distante (metástasis) susceptible a la terapia dirigida a $\alpha_v\beta_6$. Para conseguir esto, se requiere una sonda molecular que se dirige selectivamente a la integrina $\alpha_v\beta_6$ sobre el nivel celular.

Previamente se ha mostrado que el péptido A20FMDV2, (radio)marcado con grupos prostéticos de radioisótopo emisor de positrones para la detección de sondas gamma o dentro de un escáner de tomografía de emisión de positrones (PET), puede detectar con éxito la integrina $\alpha_v\beta_6$ *in vitro* y *in vivo* (Hausner et al., *Cancer Res.*, 2007;67:7833-40). Aunque esta sonda, ¹⁸F FBA-A20FMDV2, se aclare rápidamente del tejido no diana y se excrete a través de la ruta renal preferente en la orina, aún, sin embargo, tendrá algunos resultados farmacocinéticos, particularmente un aclaramiento muy rápido del tracto sanguíneo, baja estabilidad y lavado del tejido tumoral diana cuando se evalúa en un modelo de ratón con xenoinjertos BxPC-3 de cáncer pancreático que expresa $\alpha_v\beta_6$ (Hausner et al., *supra*; Hausner et al., *Cancer Res.*, 2009;69:5843-50).

La adición de polietilenglicol (PEG) de tamaño moderado al extremo N del péptido mejoró de manera apreciable la captación tumoral y las farmacocinéticas afectadas. Notablemente, la adición de una unidad única de PEG₂₈ aumentó la captación de <1 % ID/g a casi un 2 % ID/g y eliminó el lavado del tumor, dando como resultado una relación señal/fondo muy mejorada, especialmente en puntos de tiempo posteriores. Sin embargo, esta sonda, ¹⁸F FBA-PEG₂₈-A20FMDV2, también mostró aumento de la captación inicial en los riñones, pero no se lavó en los puntos temporales posteriores. La adición de una segunda unidad de PEG₂₈ al terminal N no dio como resultado un aumento adicional significativo de la captación en el tumor. De hecho, la adición de la segunda unidad de PEG era desventajosa, debido a que la sonda, ¹⁸F FBA-(PEG₂₈)₂-A20FMDV2, no se atrapó en los riñones a niveles altos (40 % ID/g) y no mostraron ninguna liberación. Igualmente, el desplazamiento de la unidad PEG al extremo C solo tenía efectos marginales.

Aunque la sonda, FBA-A20FMDV2-PEG₂₈, mostró alguna captación tumoral inicial >1 % ID/g, también se lavó, por lo que así no dio como resultado una mejora de las relaciones señal/fondo con el tiempo.

Además, todas estas sondas mostraron rápido metabolismo *in vivo*. Por ejemplo, cuando se evaluaron las muestras de orina se determinó que, aunque la introducción de PEG al extremo N redujo el número de los radiometabolitos principales en el modelo animal de tres (sin PEG) a uno (con PEG), no se encontró sonda intacta en ningún caso. Cuando el PEG estaba en el extremo C, se encontró tres metabolitos y ninguna sonda intacta.

Resultados

A diferencia de las sondas portadoras de un grupo PEG en el extremo N o un grupo PEG en el extremo C, las sondas PEGiladas biterminales de la presente invención, tal como, por ejemplo, FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈, porta un PEG en el extremo N, y un PEG en el extremo C, dando como resultado un perfil farmacocinético muy mejorado. Las características clave incluyen alta captación y retención tumoral, así como alta estabilidad metabólica. En comparación con otras estratégicas (por ejemplo, ciclación, el uso de aminoácidos de origen no natural) (Kimura et al., *Clin Cancer Res.*, 2012;18:839-49; Briand et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997;94:12545-50; Fletcher et al., *Chem Rev.*, 1998;98:763-95; Fischer, *Curr Protein Pept Sc.*, 2003;4:339-56), sorprendentemente descubrimos que la PEGilación de los péptidos de direccionamiento de acuerdo con la presente invención es un modo experimentalmente simple y directo de conseguir afinidad a diana inesperadamente alta, selectividad, captación y retención tumoral, así como alta estabilidad metabólica y superior aclaramiento de los riñones.

En un modelo murino, encontramos una alta captación tumoral de un 4,7 % ID/g (1 h) con buena retención (3,4 % ID/g a 4 h) para los xenoinjertos BxPC-3. Estos valores de captación son notablemente mayores que los observados para cualquiera de las otras sondas, y se obtuvieron sobre tumores de xenoinjerto BxPC-3 muy pequeños que oscilaban de 20-80 mg. Estos resultados posibilitan la visualización de pequeñas lesiones tempranas a menudo difíciles de detectar.

Por otra parte, la PEGilación biterminal dio como resultado estabilidad metabólica muy mejorada. Por encima de dos tercios de la sonda permanecieron intactos en la orina en 1 h (y aproximadamente la mitad permaneció intacto a las 4 h). Estudios adicionales en los tumores DX3puroB6 y BxPC-3 mostraron que >80 % de la sonda permaneció intacta en el tumor en 1 h, y casi un 90 % de la sonda se recuperó intacta de los riñones.

Notablemente, las observaciones y los resultados descritos en el presente documento no eran predecibles en función de, y difieren significativamente de otros patrones de PEGilación evaluados (por ejemplo, una o dos cadenas de PEG en el extremo N solo, una cadena de PEG en el extremo N solo, no PEGilación), ninguno de los cuales eran capaces de aproximarse o igualar los perfiles farmacocinéticos y de estabilidad superiores conseguidos con la PEGilación biterminal, como se ilustra por la sonda FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈.

La Figura 1 muestra las estructuras de las variaciones de PEGilación A20FMDV2 que se evalúan en los estudios descritos en el presente documento. Las Figuras 2-10 proporcionan una comparación detallada de los parámetros clave para la biodistribución y la estabilidad de la sonda de obtención de imágenes de estas variaciones de PEGilación A20FMDV2. La Tabla 1 proporciona un resumen de los datos farmacocinéticos y de estabilidad claves selectos para cada variante A20FMDV2 modificada por PEG.

Tabla 1. Sumario de los datos de biodistribución y estabilidad para los compuestos PEGilados A20FMDV2.

Modelo animal	Datos de biodistribución del xenoinjerto tumoral	Datos de estabilidad	Datos de metabolito
(1) 18F-FBA-A20FMDV2			
Ratones (nu/nu, ♂)	Dx3puroB6/Dx3puro (emparejadas)	1, 2, 4 h	Orina
Ratones (nu/nu, ♂)	BxPC-3/MIA PaCa-2 (emparejadas)	1,2,4 h	
(2) 18F-FBA-PEG28-A20FMDV2			
Ratones (nu/nu, ♂)	Dx3puroB6/Dx3puro (emparejadas)	1, 2, 4 h	Orina
Ratones (nu/nu, ♂)	BxPC-3	1,2,4 h	

(continuación)

Modelo animal	Datos de biodistribución del xenoinjerto tumoral		Datos de metabolito
(3) 18F-FBA-PEG28-PEG28-A20FMDV2			
Ratones (nu/nu, ♂)	Dx3puroB6/Dx3puro (emparejadas)		Orina
	1, 2, 4 h		
Ratones (nu/nu, ♂)	BxPC-3		
	1,2,4 h		
(4) 18F-FBA-A20FMDV2-PEG28			
Ratones (nu/nu, ♀)	Dx3puroB6/Dx3puro (emparejadas)		Orina
	1, 2, 4 h		
(5) 18F-FBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28			
Ratones (nu/nu, ♀)	Dx3puroB6/Dx3puro (emparejadas)		Orina, Tumor
	1, 2, 4 h	Suero	
Ratones (nu/nu, ♀)	BxPC-3		
	1, 2, 4 h; 1 h bloqueado		Orina, Tumor, Riñones

"PEG28" y "PEG1500" se usan de manera sinónima y describen la misma entidad molecular exacta, incorporados en la sonda usando "ácido Fmoc-amino PEG propiónico" (peso molecular = 1544,8 Da, PolyPure N.º 15137-2790 o Novabiochem N.º 851033) como reactivo. "PEG1500" se refiere al compuesto por su peso molecular aproximado; "PEG28" se refiere al número de unidades de polietilenglicol en el reactivo.

Los datos de biodistribución se determinaron mediante la disección de animales (generalmente $n \geq 3$ /punto temporal o afección) en el punto temporal dado después de la captación consciente, seguido de la medición de la actividad acumulada en un contador gamma y el pesado del órgano. Los datos se expresan como % de dosis inyectada corregida por desintegración por gramo de tejido (% de ID/g).

La estabilidad en PBS y el suero se determinó *ex vivo* mediante la incubación de alícuotas en el medio dado, normalmente a t.a. (PBS) o 37 °C (suero), seguido de análisis en el radio HPLC. Los datos se expresan como el % de sonda que permanece intacto en la muestra. Los metabolitos en orina, riñones y tumor se determinaron *in vivo*. Se extirparon los tejidos/órganos de los animales en puntos temporales dados después de la inyección iv de la sonda, tras la captación consciente. Las muestras se homogeneizaron y se extrajeron según era necesario y se analizaron por radio HPLC. Los datos se expresan como el % de sonda que permanece intacto en la muestra de tejido/órgano.

Los modelos tumorales - *DX3puroβ6/DX3puro*: Línea celular de melanoma humano. Dx3puroβ6 se ha sometido a transfección de manera estable para expresar integrina $\alpha\beta_6$. DX3puro es la línea celular de control negativo. Ambas expresan niveles iguales de otras integrinas (incluida la $\alpha\beta_3$). *BxPC-3*: Línea celular con expresión endógena de $\alpha\beta_6$. *MIA PaCa-2*: Línea celular pancreática, sin expresión de $\alpha\beta_6$.

La Figura 2 muestra los datos de biodistribución para el compuesto 1 (18F-FBA-A20FMDV2) en tumores DX3puroB6 y Dx3puro. Las observaciones clave incluyen el rápido aclaramiento en sangre: (1) Aclaramiento renal (Orina muy alto en 1, 2 h (>900 % ID/g)), Riñones comparativamente bajo, y buen aclaramiento con el tiempo (<6 % ID/g, en 1 h, <0,5 % ID/g en 4 h); (2) Aclaramiento GI menor (vesícula biliar inicialmente alto, a continuación, aclaramiento; Estómago bajo - aclaramiento (< 4 % ID/g en 1 h); (3) Pulmón 1,6 % ID/g en 1 h - caída hasta 0,4 % ID/g en 2, 4 h. Los tumores eran de tamaño moderado a grande. El tamaño del tumor parecía tener mínimo efecto, si tenía alguno sobre el % de ID/g (mayor puede ser necrótico): POS: 0,88 -> 0,23 % ID/g en 1, 4 h -> Moderado, y lavado; NEG: 0,49 -> 0,19 % ID/g en 1, 4 h -> Bajo, y lavado. Relación POS/NEG moderada, llegando a casi paridad en 4 h.

La Figura 3 muestra los datos de biodistribución para el compuesto 1 (18F-FBA-A20FMDV2) en tumores BxPC-3 (y MIA PaCa-2). Las observaciones clave incluyen el rápido aclaramiento en sangre: (1) Aclaramiento renal (Orina alto en 1, 2 h (>300 % ID/g)), Riñones comparativamente bajo, y buen aclaramiento con el tiempo (<4 % ID/g, en 1 h, <0,2 % ID/g en 4 h); (2) Aclaramiento GI menor (vesícula biliar inicialmente alto, a continuación, aclaramiento; Estómago bajo - aclaramiento (0,5 % ID/g en 1 h); (3) Pulmón 0,8 % ID/g en 1 h - caída hasta <0,1 % ID/g en 2, 4 h. Los tumores BxPC-3 eran de tamaño moderado (tumores MIA PaCa-2 eran moderados a grandes. El tamaño del tumor parecía tener mínimo efecto, si tenía alguno sobre el % ID/g: POS: 0,69 -> 0,12 % ID/g en 1, 4 h -> Moderado, lavado, comparable a Dx3puroB6; NEG: 0,16 -> 0,01 % ID/g en 1, 4 h -> Bajo, lavado rápido. Relación POS/NEG buena, aumentando con el tiempo, mejor que el par Dx3puroB6/Dx3puro.

La Figura 4 muestra los datos de biodistribución para el compuesto 2 (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2) en tumores DX3puroB6 y Dx3puro. Las observaciones clave incluyen el rápido aclaramiento en sangre: (1) Aclaramiento renal (Orina alto en 1 h (aproximadamente 200 % ID/g) - aclaramiento); Riñones comparativamente bajo, y buen aclaramiento con el tiempo (25 % ID/g, -> 2,7 % ID/g en 1 h, 4 h); (2) Esencialmente no aclaramiento GI (vesícula biliar <3 % ID/g; Hígado <0,1 % ID/g Estómago bajo - aclaramiento (7 % ID/g, -> 1,8 % ID/g en 1 h, 4 h); (3) Pulmón 2,0 %

ID/g en 1 h - caída hasta 1,4 % ID/g en 4 h. Los tumores eran de tamaño moderado a grande. El tamaño del tumor parecía tener mínimo efecto, si tenía alguno sobre el % de ID/g (mayor puede ser necrótico): POS: 0,49 -> 0,49 % ID/g en 1, 4 h -> Estable, no lavado; NEG: 0,11 -> 0,07 % ID/g en 1, 4 h -> Bajo, y lavado. Relación POS/NEG buena, aumentando para puntos temporales posteriores, mayor en 2 h.

5 La Figura 5 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **2** (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2) en tumores BxPC-3. Las observaciones clave incluyen el rápido aclaramiento en sangre: (1) Aclaramiento renal (Orina alto en 1 h (aproximadamente 400 % ID/g) - aclaramiento); Riñones comparativamente bajo, y buen aclaramiento con el tiempo (19 % ID/g, -> 3,3 % ID/g en 1 h, 4 h); (2) Esencialmente no aclaramiento GI (vesícula biliar <4 % ID/g; Hígado <0,2 % ID/g Estómago bajo - aclaramiento (2,6 % ID/g, -> 1,9 % ID/g en 1 h, 4 h); (3) Pulmón 2,1 % ID/g en 1 h - caída hasta 1,7 % ID/g en 4 h. Los tumores eran de tamaño moderado. El tamaño del tumor parecía tener mínimo efecto, si tenía alguno sobre el % de ID/g. Captación: 1,9 -> 1,5 % ID/g en 1, 4 h -> Caída después de 1 h, a continuación, estable; Captación mayor que Dx3puroB6.

15 La Figura 6 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **3** (18F-FBA-PEG28-PEG28-A20FMDV2) en tumores DX3puroB6 y Dx3puro. Las observaciones clave incluyen el rápido aclaramiento en sangre: (1) Aclaramiento renal (Orina moderado en 1 h (aproximadamente 60 % ID/g) - aclaramiento); Riñones alto - no aclaramiento (41 % ID/g, -> 46 % ID/g en 1 h, 4 h); (2) Aclaramiento GI menor (vesícula biliar <3 % ID/g; Hígado <0,1 % ID/g Estómago moderado - estable (5,5 % ID/g -> 5,5 % ID/g en 1 h, 4 h); (3) Pulmón 1,1 -> 1,3 % ID/g en 1 h, 4 h. Los tumores eran de tamaño moderado a grande. El tamaño del tumor parecía tener mínimo efecto, si tenía alguno sobre el % de ID/g (mayor puede ser necrótico): POS: 0,52 -> 0,54 % ID/g en 1, 4 h -> Estable, no lavado; NEG: 0,11 -> 0,07 % ID/g en 1,4 h -> Bajo, y lavado. Relación POS/NEG buena, aumentando con el tiempo.

25 La Figura 7 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **3** (18F-FBA-PEG28-PEG28-A20FMDV2) en tumores BxPC-3 (y MIA PaCa-2). Las observaciones clave incluyen el rápido aclaramiento en sangre: (1) Aclaramiento renal (Orina moderado en 1 h (aproximadamente 1500 % ID/g) - aclaramiento); Riñones alto - no aclaramiento (43 % ID/g, -> 42 % ID/g en 1 h, 4 h); (2) Aclaramiento GI menor (vesícula biliar <1,5 % ID/g; Hígado <0,2 % ID/g Estómago moderado - aumentando algo (2,3 % ID/g, -> 6,6 % ID/g en 1 h, 4 h); (3) Pulmón 1,7 -> 1,3 % ID/g en 1 h, 4 h. Los tumores eran de tamaño moderado. El tamaño del tumor parecía no tener efecto sobre el % de ID/g: POS: 1,6 -> 2,1 % ID/g en 1, 4 h -> Estable, aumentando, Captación y retención mayor que Dx3puroB6; NEG: 0,22 -> 0,12 % ID/g en 1, 4 h -> Bajo, y lavado. Relación POS/NEG buena, aumentando significativamente con el tiempo.

35 La Figura 8 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **4** (18F-FBA-A20FMDV2-PEG28) en tumores DX3puroB6 y Dx3puro. Las observaciones clave incluyen el rápido aclaramiento en sangre: (1) Aclaramiento renal (Orina muy alto en 1, 2 h (>1000 % ID/g)), Riñones comparativamente bajo, y buen aclaramiento con el tiempo hasta aproximadamente 2 % ID/g; (2) Aclaramiento GI menor (vesícula biliar <10 % ID/g - aclaramiento; Estómago aproximadamente 12 % ID/g -> 2 % ID/g - aclaramiento; Pulmón aproximadamente 9 -> 2 % ID/g - aclaramiento; Hígado bajo (!) <0,5 % ID/g y caída); (3) Pulmón aproximadamente 3 -> 2 % ID/g - caída pequeña. Tumores en su mayoría pequeños. El tamaño del tumor parecía no tener efecto o mínimo (POS 1 h) sobre el % ID/g: POS: 1,3, 1,0, 0,3 % ID/g en 1, 2, 4 h -> Moderado, y lavado; NEG: 0,5, 0,3, 0,1 % ID/g en 1, 2, 4 h -> Bajo, y lavado. POS/NEG Moderada, relativamente estable con el tiempo.

45 La Figura 9 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **5** (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28) en tumores DX3puroB6 y Dx3puro. Las observaciones clave incluyen el rápido aclaramiento en sangre: (1) Sobre todo aclaramiento renal (orina: elevado, aclaramiento, 396 -> 135 % ID/g en 1 h, 4 h); riñones: elevado, aclaramiento, 58 -> 20 % ID/g en 1 h, 4 h); (2) Algo de aclaramiento GI (vesícula biliar 7 -> 2,7 % ID/g en 1 h, 4 h; Estómago 11 % -> 8 % ID/g en 1 h, 4 h ID/g - aclaramiento lento; Pulmón aproximadamente 5 % ID/g estable; Riñón bajo <0,5 % ID/g en 1 h, cayendo); (3) Pulmón aproximadamente 2 % ID/g estable. Tumores en su mayoría pequeños evaluados. El tamaño de tumor parecía no tener efecto sobre el % de ID/g: POS: 2,3 -> 1,4 % ID/g en 1 h, 4 h -> caída después de 1 h, a continuación, estable; NEG: 0,39 -> 0,14 % ID/g en 1 h, 4 h -> Bajo, y lavado. Relación POS/NEG buena, aumentando con el tiempo.

55 La Figura 10 muestra los datos de biodistribución para el compuesto **5** (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28) en tumores BxPC-3. Las observaciones clave incluyen aclaramiento en sangre muy rápido: La mayor ruta de excreción es renal, algo hepatobiliar también. Captación tumoral: Muy buena (4,7 % ID/g en 1 h), cayendo ligeramente hasta el 3,4 % ID/g en 4 h. Otros órganos para tener en cuenta: Orina muy alto en etapas tempranas (482 % ID/g en 1 h), cayendo (223 % en 4 h), Riñones alto (76 % ID/g en 1 h), lavado (19,3 % ID/g en 4 h), Algo de aclaramiento GI: vesícula biliar, estómago, intestinos (todo <20 % ID/g en 1 h, <10 % ID/g en 4 h), Pulmones ligeramente elevado (aproximadamente 2 % ID/g, estable con el tiempo), Hígado, páncreas: bajo (<1 % ID/g). Lavado: Bajo en tumor, bueno de la mayoría de los órganos. Pulmones, páncreas, músculo y hueso parece más estable. Tamaños tumorales: 20-80 mg (pequeño). Captación tumoral: 4,7 -> 3,4 % ID/g en 1 h, 4 h -> Alta, a continuación, ligera caída. Captación mayor que Dx3puroB6. Los tumores más pequeños parecen tener captación de alguna manera inferior (dentro de cada cohorte). Relaciones tumor respecto a órgano: buena a excelente, excepto para tumor/riñón. Experimento de bloqueo realizado: Agente de bloqueo/cantidad/tiempo: 30 mg/kg de FBA-PEG28-A20FMDV2 en T=-10 min; Observaciones: Captación tumoral muy reducida (reducida en un 92 % frente al no bloqueo); el % ID/g del trazador intacto en orina es ligeramente mayor que para las muestras no bloqueadas; Todos los órganos, excepto la orina y la vesícula biliar,

mostraron caída en el % ID/g, incluidos los riñones, pulmones, intestinos y estómago.

La estabilidad de los compuestos se evaluó analizando metabolitos de orina. El compuesto **1** (18F-FBA-A20FMDV2) se metabolizó en 3 metabolitos con Rt más corto. El radiotrazador se eluyó en 15,9 min. Los metabolitos de orina del compuesto **1** se eluyó en 9,0 min (44 %), 10,4 min (30 %) y 10,8 min (26 %). La relación varía entre animales/puntos temporales. El compuesto **2** (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2) se metabolizó en un metabolito principal con Rt ligeramente más corto. El radiotrazador se eluyó en 16,2 min. Orina en 1 h: los metabolitos del compuesto **2** se eluyeron en 15,4 min (est. 90 %); 16,4 (est. 10 %; poco probable que esté intacto). Orina en 4 h: igual que en 1 h. El compuesto **3** (18F-FBA-PEG28-PEG28-A20FMDV2) se metabolizó con Rt ligeramente mayor. El radiotrazador se eluyó en 17,4 min. Orina en 1 h: los metabolitos del compuesto **3** eluyeron en 17,8 min, con un pequeño hombro de 18,1 min. El compuesto **4** (18F-FBA-A20FMDV2-PEG28) se metabolizó en 3 metabolitos con Rt más corto. El radiotrazador eluyó en 17,0 min. Los metabolitos de orina del compuesto **4** eluyeron en 10,3 min, 11,7 min y 12,1 min. Al contrario que en los compuestos **1-4**, una gran fracción del compuesto **5** (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28) permaneció intacta, con solo un metabolito con Rt ligeramente mayor. El radiotrazador se eluyó en 17,4 min. Orina: 17,4 min (1 h 69 %, 1 h 67 %, 2 h 78 %, 4 h 45 % intacto); 18,6 min (1 h 31 %, 1 h 29 %, 2 h 16 %, 4 h 55 % del metabolito principal).

Se realizaron estudios de estabilidad adicional para el compuesto **5** (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28). En el tumor DX3puroB6, había una buena señal de HPLC, a pesar de un tumor pequeño. El compuesto **5** permaneció en su mayor parte intacto, con algo de introducción de metabolitos. El patrón pico era similar al patrón de estabilidad en suero. En 17,4 min, aproximadamente un 82-84 % del compuesto **5** estaba intacto, mientras que en 17,0-17,2 min, se observaron aproximadamente un 14-18 % de los metabolitos probables con picos pequeños. En el tumor BxPC-3, el compuesto **5** consiguió un 81,45 % de estabilidad en 1 h después de la inyección (Rt a 17,46 min), con metabolitos menores en 17,19 min (17,88 %) y 17,91 min (0,67 %). En los riñones, el compuesto **5** consiguió un 88,5 % de estabilidad como un único pico puntiagudo en 1 h después de la inyección (Rt a 17,4 min), con metabolitos menores en 14,5 min (0,4 %), 14,9 min (1,3 %), 15,2 min (2,3 %) y 18,6 min (7,5 %). En suero, el compuesto **5** consiguió estabilidad mayor o igual a aproximadamente un 80 % en 2 h. En particular, con incubación en suero a 37 °C, la cantidad del compuesto **5** que permaneció intacta era como sigue: 81,7 % en 30 min, 80,4 % en 60 min y 79,6 % en 120 min (Rt a 17,4 min). Además, > aproximadamente un 92 % del compuesto **5** permaneció intacto en PBS en aproximadamente 6 h.

Métodos

Síntesis de sonda

La sonda se puede sintetizar usando síntesis de péptido en fase sólida y técnicas de radiomarcado en fase sólida. Por consiguiente, el péptido se sintetizó, se sometió a PEGilación y se radiomarcó con un grupo prostético de ácido fluorobenzoico portador de flúor-18 (¹⁸F FBA) en soporte sólido (síntesis de péptido en fase sólida y radiomarcado en fase sólida). La preparación es completamente compatible con las químicas peptídicas convencionales, permitiendo así la introducción específica a sitio de las cadenas de PEG en el péptido (por ejemplo, en el extremo N, el extremo C, o ambos). Por otra parte, la preparación también es completamente compatible con las químicas de radiomarcado en fase sólida, dando como resultado sondas de radiomarcado de alta pureza, precisamente definidas.

El soporte sólido estaba comprendido de perlas de resina de síntesis peptídica portadoras de modificaciones superficiales del enlazador Rink-amida. Los aminoácidos son aminoácidos (L) naturales protegidos por Fmoc con protección de cadena lateral lábil por ácido trifluoroacético. Las cadenas de PEG monodispersas, es decir, cadenas de PEG con un número exactamente definido de unidades de repetición de etilenglicol "n", se usaron para la PEGilación (reactivo usado: "ácido Fmoc-amino PEG propiónico", 88 átomos, peso molecular = 1544,8 Da, PolyPure N.º 15137-2790 o Novabiochem N.º 851033), en lugar del PEG polidisperso que está comprendido de mezclas de polímero alrededor de un peso molecular medio. La síntesis peptídica y la introducción de las unidades de PEG se consiguieron usando las químicas de Fmoc/piperidina en fase sólida convencionales en la activación de HATU/DIPEA en *N,N*-dimetilformamida. Para la introducción de las unidades PEG, los tiempos de acoplamiento se extendieron a varias horas. El progreso de reacción se monitoreó mediante el ensayo del ácido picrilsulfónico. Para los estándares de referencia no radiactivos, se unió 4-fluorobenzoico de la misma manera que los aminoácidos. El tratamiento final consistía en la escisión del soporte sólido y la eliminación de los grupos protectores de la cadena lateral con ácido trifluoroacético (TFA)/1,2-etanoditiol (EDT)/trisiopropilsilano (TIPS)/agua (94/1/2,5/2,5 v/v/v/v) o TFA/TIPS/agua (95/2,5/2,5 v/v/v) a t.a. durante 3 h, la purificación sobre la cromatografía HPLC de fase inversa semipreparativa y la eliminación del disolvente. El producto normalmente se obtuvo en un >95 % de pureza (UV, 220 nm) como un sólido incoloro. La identidad se estableció por espectrometría de masas MALDI.

Radiosíntesis actual

En el actual planteamiento, se unió ácido 4-[¹⁸F] fluorobenzoico a la sonda en fase sólida usando activación HATU/DIPEA (30 min, t.a., 5 mg de H₂N-peptidil-resina), seguido de tratamiento con una mezcla de TFA (2 x 15 min) y purificación de HPLC (Sutcliffe-Goulden et al., *Bioorg Med Chem Lett.*, 2000;10:1501-3; Sutcliffe-Goulden et al., *Eur J Nucl Med Mol I.*, 2002;29:754-9; Hausner et al., *J Med Chem.*, 2008;51:5901-4). El péptido radiomarcado, [¹⁸F] FBA-

PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈, se obtuvo como la solución en la solución salina tamponada con fosfato (PBS) en un 5 % de rendimiento radioquímico corregido por desintegración en 4 h de tiempo de síntesis desde el final de bombardeo (EoB) de [¹⁸F]F-fluoruro. Las purezas radioquímicas eran de un >95 %. La identidad se confirmó mediante la inyección conjunta con el patrón no radiactivo y observando la elución conjunta de UV y la señal de radio HPLC.

5

Evaluación *in vitro*

Estabilidad en PBS

- 10 Para confirmar la estabilidad en PBS, las alícuotas de la sonda formulada se analizaron mediante HPLC analítica en varios puntos temporales después del almacenamiento a temperatura ambiente.

Estabilidad en suero

- 15 Para confirmar la estabilidad en suero, se extrajo sangre de ratones tras la eutanasia, se dejó coagular durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó. Se extrajo el suero y se combinó con una alícuota del radiotrazador formulado (0,74 MBq) en un tubo de microcentrífuga. El tubo de ensayo se agitó suavemente y se mantuvo a 37 °C. Las alícuotas se retiraron en puntos temporales seleccionados, se mezclaron con etanol absoluto (4 °C) y se centrifugaron para precipitar las proteínas en suero. La HPLC analítica de las muestra sobrenadantes se realizaron para determinar el porcentaje de radiotrazador intacto.
- 20

Unión celular

- 25 Para confirmar la unión dirigida a $\alpha_v\beta_6$ mantenida, los estudios de unión celular se realizaron con la sonda de obtención de imágenes. Antes del experimento, las líneas celulares se analizaron mediante citometría de flujo para confirmar los niveles de la expresión de integrina. Para los experimentos de unión celular, se añadieron alícuotas de 7,4 KBq del radiotrazador en medio libre en suero (pH 7,2) a una suspensión celular ($3,75 \times 10^6$ de células DX3puroB6, DX3puro, BxPC-3 en suero libre DMEM) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en tubos de microcentrífuga cerrados (n=4/línea celular). Los tubos de ensayo, pretratados con albúmina de suero bovino para bloquear la unión no específica, se agitaron regularmente para prevenir la sedimentación de las células. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó con medio sin suero. Los sobrenadantes se combinaron y las células se resuspendieron en medio libre. La fracción de radiactividad unida se determinó con un contador gamma (sedimento celular frente a sobrenadantes combinados). Para determinar la fracción de la radiactividad internalizada en el punto temporal de 60 min, las células se trataron posteriormente con tampón de lavado ácido (pH 2,5, 4 °C) para liberar la actividad unida a superficie (Reilly et al., *J. Nuclear Medicine*, 2000;41:429-38), seguido de un lavado con PBS. La fracción internalizada se determinó con un contador gamma (sedimento celular frente a radiactividad liberada en el sobrenadante).
- 30
- 35

Evaluación *in vivo*

40

Modelo de ratón

- El modelo de ratón para la obtención de imágenes *in vivo* consistía en ratones nu/nu atímicos inyectados subcutáneamente con las líneas celulares cancerosas humanas en los costados cerca de los hombros. Para un modelo animal con el control interno, se usó un par de líneas celulares de melanoma humano (DX3), una de los cuales previamente se había sometido a transfección para expresar la integrina $\alpha_v\beta_6$ (DX3PuroB6) mientras que la otra servía como control negativo (Dx3Puro). Para los estudios del cáncer pancreático, se eligió la línea celular BxPC-3 (que naturalmente expresa $\alpha_v\beta_6$). En todos los casos, los niveles de expresión de integrina de las líneas celulares inyectas se confirmaron mediante citometría de flujo. Los animales se usaron para los estudios de obtención de imágenes y biodistribución cuando los tumores tenían un alcance máximo de aproximadamente 2 a 8 mm.
- 45
- 50

Obtención de imágenes y biodistribución

- La obtención de imágenes se llevó a cabo sobre un sistema PET/CT de animal pequeño de alta resolución dedicado (Siemens Inveon). El análisis de datos se realizó usando el paquete informático adjunto. Los experimentos se llevaron a cabo según los protocolos de obtención de imágenes en animales pequeños. Tras la inyección intravenosa (iv) de la sonda de obtención de imágenes (100-250 μ Ci) en la vena de la cola del animal anestesiado (isoflurano), se realizó un escaneo 4x15 min dinámico en el animal anestesiado (isoflurano) comenzando 15 min después de la inyección, seguido de escaneos de 15 min en puntos temporales posteriores (2, 4 h). Después de cada escaneo, los escaneos de transmisión y los escaneos CT se realizaron para la corrección de la atenuación y el registro conjunto anatómico, respectivamente.
- 55
- 60

- Para los estudios de biodistribución, los animales se inyectaron con la sonda de obtención de imágenes (aproximadamente 50 μ Ci) como se ha descrito anteriormente y se sacrificaron en puntos temporales dados (1, 2, 4 h después de la inyección, n=3 animales/punto temporal). Tras la disección, se midieron los niveles de radiactividad para cada órgano, tejido o tumor y los valores de captación corregidos por desintegración, normalizados se calcularon
- 65

y expresaron como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

Estudios de estabilidad

5 Recuperación de la sonda de obtención de imágenes de la orina: Se recogió orina para el análisis por HPLC durante los estudios de biodistribución cuando fue posible. Se eliminaron proteínas en las alícuotas de orina mediante precipitación con etanol absoluto en exceso diez veces y posterior centrifugación. Las muestras se evaluaron por HPLC.

10 Recuperación de la sonda de obtención de imágenes del tumor: Las sonda de obtención de imágenes (1 mCi) se inyectó y el tumor $\alpha_v\beta_6$ positivo se extirpó en el punto temporal 1 h. El tumor se homogeneizó en PBS y las proteínas se precipitaron mediante la adición de etanol absoluto. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante y las proteínas restantes se precipitaron mediante la adición de acetonitrilo. Se evaluó una alícuota diluida del sobrenadante mediante HPLC.

15 Recuperación de la sonda de obtención de imágenes del riñón: Se extirpó un riñón junto con el tumor durante el estudio de estabilidad. El riñón se homogeneizó en PBS y las proteínas se precipitaron mediante la adición de etanol absoluto. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante y las proteínas restantes se precipitaron mediante la adición de acetonitrilo. Se evaluó una alícuota diluida del sobrenadante mediante HPLC.

Experimentos adicionales in vivo

25 Autorradiografía y tinción inmunohistoquímica del tejido tumoral: Se inyectó la sonda de obtención de imágenes (1 mCi) y se extirparon los tumores a 1 h. Los tumores se insertaron en medio de congelación y se seccionaron inmediatamente (20 μ m para la autorradiografía, 5 μ m para la histología). Las muestras de autorradiografía se expusieron a una placa de fósforo de almacenamiento durante la noche. La placa se leyó a una resolución de 50 μ m usando una fosforocámara (GE Healthcare Storm 860). Para la detección histológica de la integrina $\alpha_v\beta_6$, se almacenaron secciones congeladas hasta que la radiactividad se había desintegrado, se fijaron durante 5 min con una solución de periodato-lisina-paraformaldehído y se lavaron en solución salina tamponada con Tris. La peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3 % en PBS, seguido de la incubación con suero de caballo normal al 2,5 %. Las secciones se incubaron con anticuerpo anti-integrina beta(6) (PBS) durante 1 h, se lavaron en TBS y se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (anti-Ig de cabra). La tinción se desarrolló con 3,3'-diaminobenzidina (DAB), se contratiñó con Hematoxilina de Mayer, se deshidrató y se montó con medios de montaje DPX. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

35 **Ejemplo 2. Los efectos *in vivo* positivos de la PEGilación biterminal de los péptidos de direccionamiento específico ("homing") (que se dirigen al tumor) y la modificación de aminoácidos de péptidos para el reconocimiento mejorado de la integrina $\alpha_v\beta_6$.**

40 Este ejemplo ilustra que la PEGilación biterminal era capaz de conferir superiores características de direccionamiento y farmacocinéticas *in vivo* sobre el péptido A20FMDV2 y variantes de los mismos (por ejemplo, variante K16R). En concreto, los péptidos A20FMDV2 y A20FMDV2 (K16R) PEGilados biterminales mostraron perfil farmacocinético muy mejorado más allá de lo que se predijo a partir de la PEGilación N o C-terminal. De hecho, las dos unidades de PEG actuaron de manera sinérgica para conseguir estabilidad muy mejorada junto con la alta captación en el tumor $\alpha_v\beta_6$ (+) y retención. Así, este ejemplo demuestra que la PEGilación es biocompatible y, en comparación con otras estrategias (por ejemplo, ciclación), no impone restricciones conformacionales, es sintéticamente simple y directa y puede combinarse fácilmente con un rango de otras modificaciones peptídicas.

Introducción

50 Los estudios descritos en este ejemplo se llevaron a cabo comenzando a partir del péptido modelo que contiene 20 aminoácidos A20FMDV2, un péptido que se dirige selectivamente al receptor de superficie celular integrina $\alpha_v\beta_6$. Esta integrina se ha identificado como un indicador de pronóstico para varios carcinomas desafiantes; en todos los casos, altos niveles de expresión se correlacionan con la gravedad de la enfermedad y el pronóstico malo (Ahmed et al., *J Histochem Cytochem.*, 2002;50:1371-80; Elayadi et al., *Cancer Res.*, 2007;67:5889-95; Liu et al., *Head Neck Oncol.*, 2013;5:7; Bandyopadhyay et al., *Curr Drug Targets*, 2009;10:645-52; Bates, *Cell Cycle*, 2005;4:1350-2; Sipos et al., *Histopathology*, 2004;45:226-36), que lo hace una diana importante para el diagnóstico (por ejemplo, obtención de imágenes no invasiva con radiotrazadores) y terapia. En los anteriores estudios de obtención de imágenes en animales pequeños de péptidos A20FMDV2 marcados con ácido 4- ^{18}F fluorobenzoico (es decir, ^{18}F FBA), se ha mostrado que la introducción de una unidad de polietilenglicol (PEG) puede mejorar las farmacocinéticas, incluyendo la captación aumentada en tumores que expresan $\alpha_v\beta_6$ (Hausner et al., *Cancer Res.*, 2007;67:7833-40; Hausner et al., *Cancer Res.*, 2009;69:5843-50). Estos estudios evaluaron el efecto de la PEGilación (N- y/o C-terminal) específica a sitio (Figura 1), produciendo el radiotrazador biterminalmente PEGilado ^{18}F FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈ (**5**) como un compuesto guía basado en la estabilidad del radiotrazador y la captación en el tumor $\alpha_v\beta_6$ dirigido cuando se compara con radiotrazadores A20FMDV2 marcados con ^{18}F FBA portadores de PEG en el extremo C o N. También se evaluaron las sustituciones de aminoácidos con el objetivo de conseguir beneficios adicionales a partir de las modificaciones de

la secuencia peptídica. En concreto, estos estudios muestran que el reemplazo de la lisina con una arginina en la posición 16 en el compuesto **5** para crear [¹⁸F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2 K16R-PEG₂₈ (**5R**) proporcionó inesperadamente alta afinidad a $\alpha_v\beta_6$ /retención/selectividad y produjo mejores resultados *in vivo*, mostró buen aclaramiento del riñón y presentó alta estabilidad del radiotrazador.

5

Métodos

Los radiotrazadores se prepararon y radiomarcaron sobre la fase sólida usando productos químicos peptídicos convencionales (Hausner et al., *Cancer Res.*, 2007;67:7833-40; Sutcliffe-Goulden et al., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2002;29:754-9). Usando tres líneas celulares, DX3puro β_6 [$\alpha_v\beta_6(+)$], el correspondiente control negativo DX3puro [$\alpha_v\beta_6(-)$] y el carcinoma pancreático BxPC-3 con expresión $\alpha_v\beta_6(+)$ endógena, se evaluaron los radiotrazadores *in vitro* (unión celular e internalización) e *in vivo* en modelos de ratón portadores de xenoinjertos de DX3puro β_6 /DX3puro emparejadas o BxPC-3.

10

Resultados

PEGilación. El tamaño y la localización de las unidades de PEG afectaron significativamente al direccionamiento de $\alpha_v\beta_6$ y las farmacocinéticas. En estudios de unión celular, la PEGilación generalmente mejoró mucho la afinidad y la selectividad para la línea celular que expresa $\alpha_v\beta_6$, y dio como resultado un grado alto de internalización en las células que expresan $\alpha_v\beta_6$, como se ve para los radiotrazadores **2-5** (en comparación con **1** no PEGilado; Figura 11).

20

La PEGilación también demostró ser beneficiosa *in vivo* (como se mide por la captación y retención en el tumor $\alpha_v\beta_6(+)$, así como el aclaramiento de los tejidos no diana), pero demostró sensibilidad al tamaño y a la disposición del grupo de PEG. El aumento del tamaño más allá de un cierto punto condujo a la disminución del comportamiento farmacocinético como se ve para la captación muy aumentada y la captura en riñones para **3** (que porta dos unidades de PEG₂₈ en el extremo N), en comparación con **2** (que porta una unidad de PEG₂₈ en el extremo N; Figuras 13 y 14). El movimiento de la unidad de PEG₂₈ (sencilla) al extremo C (**4**) tuvo efecto mínimo sobre la retención en el riñón, pero, desafortunadamente, disminuyó la retención en el xenoinjerto $\alpha_v\beta_6$ positivo (Figuras 13 y 15).

25

Sorprendentemente, cuando se unía una unidad de PEG₂₈ en el extremo N y una unidad PEG₂₈ en extremo C (produciendo **5**), los efectos positivos se conservaban o incluso mejoraban (alta afinidad a $\alpha_v\beta_6$ /retención/selectividad) mientras que se evitaban los efectos secundarios *in vivo* negativos (concretamente captura renal). *In vitro*, **5** se unió a las líneas celulares que expresaban $\alpha_v\beta_6(+)$ Dx3puro β_6 y BxPC-3 con 51,0±0,9 % y 37,2±1,9 %, respectivamente, con mucha radiactividad internalizada (Dx3puro β_6 , 33,5±1,8 %, BxPC-3: 28,4±0,9 % de radiactividad total, respectivamente; Figura 11). En comparación, la línea celular control Dx3puro mostró 3,5±0,2 % de unión y 0,9±0,1 % de internalización. *In vivo*, **5** mantuvo alta unión dirigida a $\alpha_v\beta_6$ en el modelo de DX3puro β_6 /DX3puro emparejadas (relación: 1 h: 5,8/1; 4 h: 9,8/1). También se observó alta captación en el modelo BxPC-3 pancreático (captación: 1 h: 4,71±0,88 % ID/g; 4 h: 3,39±1,34 % ID/g) aunque estaban presentes tumores muy pequeños (43±19 mg; Figura 16). Estos estudios indican que **5** es beneficioso para la detección de pequeños tumores primarios $\alpha_v\beta_6$ positivos y metástasis. Estos estudios también indican que, a diferencia de otros trazadores A20FMDV2, **5** permanecía muy intacto (>80 % en 1 h en el tumor).

30

35

40

Sustituciones de aminoácidos; reemplazo de Lys16. La lisina en la posición 16 se identificó para el reemplazo por varias razones, notablemente (1) el grupo amina de la cadena lateral de lisina excluye la posibilidad de radiomarcado basado en el enlace de amina específico a sitio (tal como, por ejemplo, con [¹⁸F]FBA) del péptido en la fase de solución debido a que este grupo amino competiría con la amina N-terminal por la unión al grupo prostético (esto no es una preocupación durante el radiomarcado en fase sólida debido a que las cadenas laterales de los aminoácidos, incluido el grupo amina de lisina, permanecen protegidas hasta después del radiomarcado), y (2) el reemplazo por aminoácidos igualmente básicos (pero careciendo de la amina) puede aumentar la estabilidad mientras se mantiene la afinidad y selectividad de diana. Se llevaron a cabo estudios iniciales que evaluaban la importancia de la lisina en la posición 16 mediante experimentos de unión celular con el **2** monoPEGilado: se realizaron sustituciones con alquil aminoácido simple alanina (sustitución: K16A; **2A**); el aminoácido ácido glutámico (K16E; **2E**); y el aminoácido básico arginina (K16R; **2R**). Como se muestra en la Figura 17, solo la sustitución K16R (**2R**) mantuvo la afinidad y la selectividad para la línea celular que expresaba $\alpha_v\beta_6(+)$ DX3puro β_6 , indicando que un grupo lateral básico (pero no necesariamente una amina) en esta posición es importante. Por el contrario, las modificaciones no funcionalizadas (K16A) y ácidas (K16E) condujeron a una disminución significativa en el rendimiento.

45

50

55

La combinación de la modificación de K16R con PEGilación biterminal (para producir [¹⁸F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2 K16R-PEG₂₈; **5R**) mostró excelente afinidad y selectividad mantenidas para la línea celular que expresaba $\alpha_v\beta_6(+)$ Dx3puro β_6 (Figura 17). Por lo tanto, el compuesto **5R** también se ensayó *in vivo* en el modelo de ratón de xenoinjerto de DX3puro β_6 /DX3puro emparejadas. Como se muestra en la Figura 18, **5R** demostró un perfil farmacocinético mejor que el visto para su progenitor **5** (Figura 16): la relación de captación en xenoinjerto DX3puro β_6 /DX3puro era mayor para todos los puntos temporales evaluados (alcanzando 12,9/1 en 4 h), mientras que la concentración de radiactividad en el riñón era completamente inferior. El beneficio general de la mutación de K16R también es ilustrado por los datos de biodistribución enumerados en la Tabla 2: la gran mayoría de los tejidos mostraron inferior % ID/g de captación para **5R** que para **5** (excepciones: vesícula biliar (superior, pero captación absoluta aceptable), pulmón

60

65

(aproximadamente igual) y tumor Dx3puro β 6 (superior - deseable) y, por consiguiente, las relaciones Dx3puro β 6/órgano aumentaron notablemente para **5R** sobre **5**. Como beneficio adicional, la sustitución K16R también tuvo efectos positivos sobre la estabilidad del radiotrazador, como se muestra en la Figura 19: no se observó descomposición parcial (indicativo de radiólisis/oxidación) para el **5R** formulado, mientras que el **5** progenitor mostró comúnmente alrededor de un 5 % de descomposición en la formulación del radiotrazador.

Tabla 2. Datos de biodistribución para **5** y **5R** en modelo de ratón DX3puro β 6/DX3puro emparejado 2 h después de la inyección. La captación en órgano se enumera como % ID/g \pm D.T. ($n = 3$ /radiotrazador/punto temporal; con la excepción del tumor Dx3puro β 6 diana $\alpha\beta$ 6 positivo, se desea baja captación). También se enumera la diferencia (relativa al % de cambio) entre **5R** y **5** para cada órgano (con la excepción del tumor Dx3puro β 6 diana $\alpha\beta$ 6 positivo, se desea una disminución) y relaciones de captación entre el tumor Dx3puro β 6 $\alpha\beta$ 6 positivo y diversos órganos (se desean relaciones mayores).

Trazador	5		5R		% cambio relativo de la media (o valor) vs. 5 (% ID/g [5] = 100 %) (relación [5] = 100 %)	
Estructura	18FFBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28		18FFBA-PEG28-A20FMDV2 K16R-PEG28			
Modelo	par DX3 en ratón nu/nu hembra		par DX3 en ratón nu/nu hembra			
Punto temporal	2 horas		2 horas			
Órgano	Media	DT	Media	DT		
Orina	348,755	164,277	106,913	13,124		-69
Sangre	0,305	0,021	0,104	0,017		-66
Vesícula biliar	6,637	2,647	11,480	7,200		73
Hígado	0,298	0,124	0,094	0,017		-69
Corazón	0,875	0,164	0,502	0,175		-43
Pulmón	1,737	0,563	1,831	0,237		5
Bazo	0,072	0,012	0,054	0,025		-26
Riñón	33,319	2,790	12,398	2,939		-63
Páncreas	0,333	0,092	0,135	0,054		-60
Estómago	9,222	0,196	4,576	0,439		-50
Intestino del.	2,561	0,537	1,231	0,184		-52
Vejiga	2,396	0,365	1,387	0,429		-42
Piel	1,100	0,350	0,833	0,168		-24
Músculo	0,726	0,111	0,528	0,093		-27
Hueso	0,608	0,051	0,587	0,082		-4
Cola	0,565	0,370	0,413	0,084		-27
Intestino gru.	6,299	0,759	3,975	1,001		-37
Cerebro	0,039	0,002	0,023	0,002		-42
Tumor (+)	1,416	0,195	1,756	0,359		24
Tumor (-)	0,233	0,011	0,178	0,084		-23
(% ID/g barras: para 1, 2, 4 h-excl. orina)					vs. 5 (mismo órgano y tiempo)	
Relaciones capt.						
Órgano 1/Órgano 2						
TUM(+)/TUM(-)	6,08		9,85			62
TUM(+)/Sangre	4,64		16,83			262
TUM(+)/Riñón	0,04		0,14			233
TUM(+)/Hígado	4,74		18,68			294
TUM(+)/Músculo	1,95		3,33			70
TUM(+)/Páncreas	4,25		13,01			206
					vs. 5 (mismo órgano y tiempo)	

15 Conclusión

Con respecto a la adición de unidades de PEG, solo la PEGilación biterminal era capaz de conferir buenas características de direccionamiento y un buen perfil general *in vivo* sobre los radiotrazadores basados en A20FMDV2, como se ve para el compuesto **5**: Se muestra un perfil farmacocinético muy mejorado, más allá de lo previsto a partir de la PEGilación N- o C-terminal. Las dos unidades de PEG actuaron de manera sinérgica para conseguir estabilidad muy mejorada junto con la alta captación en el tumor $\alpha\beta$ 6(+) y retención. Esta estrategia de PEGilación biterminal también puede ser beneficiosa para otros péptidos de direccionamiento específico, similar a la ciclación (White et al., *Nat Chem.*, 2011;3:509-24; Okarvi, *Med Res Rev.*, 2004;24:357-97; Roxin et al., *Future Med. Chem.*, 2012;4:1601-18). Notablemente, la PEGilación es biocompatible y, en comparación con otras estrategias (por ejemplo, ciclación), no impone restricciones conformacionales, es sintéticamente simple y directa y puede combinarse fácilmente con un rango de otras modificaciones peptídicas.

Cuando se evaluaron la estrategia de PEGilación biterminal para los péptidos que se dirigen a $\alpha\beta$ 6(+) basándose en A20FMDV2, se investigaron las modificaciones en el residuo lisina y se encontró que la sustitución de K16R era particularmente beneficiosa. El compuesto **5R** mantuvo alta afinidad a $\alpha\beta$ 6/retención/selectividad *in vitro* y produjo mejores resultados *in vivo* (incluida la mejor relación de xenoinjerto $\alpha\beta$ 6(+) DX3puro β 6/ $\alpha\beta$ 6(-) Dx3puro de 12,9/1),

mostró buen aclaramiento del riñón, y alta estabilidad del radiotrazador.

Ejemplo 3. Desarrollo de los péptidos PEGilados biterminales con mejores afinidades y farmacocinéticas para la obtención de imágenes moleculares dirigida a $\alpha_v\beta_6$ y terapia.

Este ejemplo ilustra el desarrollo de nuevos agentes de obtención de imágenes moleculares con mejores afinidades y farmacocinéticas y el desarrollo y el ensayo de la eficacia de las varias nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a $\alpha_v\beta_6$. En concreto, este ejemplo proporciona terapia dirigida a $\alpha_v\beta_6$ basada en PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ como un vehículo de administración para las tres estrategias terapéuticas: (i) el péptido proapoptótico D(KLAKLAK)₂; (ii) el radionúclido terapéutico ⁹⁰Y; y (iii) un nanovehículo de paclitaxel (PTX) basado en micela. Este ejemplo también proporciona modificaciones que incluyen multimerización y/o la adición de un motivo de unión a albúmina en sangre para mejora más la afinidad, la estabilidad *in vivo*, las capacidades de direccionamiento y/o el comportamiento del aclaramiento de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈.

Antecedentes y significancia clínica

La integrina $\alpha_v\beta_6$ como diana molecular para el diagnóstico por imágenes y la terapia del cáncer: Existe un cuerpo de la bibliografía significativo y rápidamente creciente que sugiere que la integrina $\alpha_v\beta_6$ es una molécula extremadamente atractiva para el diagnóstico por imágenes y la terapia. $\alpha_v\beta_6$ es un receptor de superficie celular específico al epitelio que es indetectable en el epitelio adulto sano pero se regula al alza significativamente en un amplio rango de cánceres derivados del epitelio (1-12). Este receptor con frecuencia se localiza hacia el frente invasivo y los bordes infiltrantes de los tumores y juega un papel clave en la invasión y la metástasis y su expresión con frecuencia está asociado a pronóstico malo (13-19). Siendo la única expresión de $\alpha_v\beta_6$ un indicador de la disminución de la supervivencia libre de progresión (SLP), la tasa de respuesta (TR) y la supervivencia general (SG) (20, 21), nosotros y otros creemos que lo positivo de esta correlación negativa es la oportunidad muy necesitada para utilizar $\alpha_v\beta_6$ para tanto las mediciones diagnósticas como terapéuticas. El alto contraste entre tejido maligno y sano y la relevancia funcional de $\alpha_v\beta_6$, especialmente en aquellas enfermedades con un fenotipo más agresivo, junto con el lugar de $\alpha_v\beta_6$ justo en una lista élite de dianas para las cuales el desarrollo de los compuestos de diagnóstico y terapéuticos serán vitales para el manejo futuro de un rango muy amplio de enfermedades invasivas.

Impacto clínico de $\alpha_v\beta_6$, agentes de obtención de imágenes moleculares dirigidos y productos terapéuticos: Además del alto contraste ganado debido a la expresión aberrante, pero específica de $\alpha_v\beta_6$, el alcance de las enfermedades que presentan este contraste no estará limitado en utilidad para un grupo pequeño de pacientes. En su lugar, estos agentes de obtención de imágenes y terapéuticos dirigidos a $\alpha_v\beta_6$ tienen el potencial para destacar en el tratamiento y el manejo de varias malignidades que, por origen o grado, caen fuera de nuestro actual potencial curativo. Los artículos de la bibliografía para apoyar estas reivindicaciones (22-25) son numerosas y están aumentando exponencialmente puesto que el amplio impacto biológico y la utilidad clínica de $\alpha_v\beta_6$ llega a ser dogma. En este punto, resaltamos que la mayoría de las recientes indicaciones/aplicaciones en el cáncer colorrectal y de mama que demuestran acumulativamente la urgencia con la cual debe suceder el desarrollo de los productos de diagnóstico y los productos terapéuticos dirigidos por $\alpha_v\beta_6$.

El cáncer colorrectal (CRC) es la segunda causa más común del cáncer relacionado con la muerte, altamente atribuible a metástasis hepática (11, 18, 26). Numerosos artículos revelan un papel definitivo de $\alpha_v\beta_6$ en la migración celular, la proliferación y la invasión dentro de los modelos de CRC así como informan de comunicación cruzada entre $\alpha_v\beta_6$ y CXCR4 definiendo además el papel de $\alpha_v\beta_6$ en la metástasis hepática (25). En un reciente ensayo de fase II, se exploró la eficacia de Abituzumab combinada con el estándar de referencia (SoC) de cetuximab/irinotecán en el tratamiento de pacientes con KRAS sin cáncer colorrectal metastásico (27). Este estudio confirmó $\alpha_v\beta_6$ como pronóstico negativo para SG de pacientes que reciben SoC. Adicionalmente, se determinó la expresión de $\alpha_v\beta_6$ aumentada mediante análisis con biomarcador retrospectivo para estar positivamente correlacionado con SG aumentado (riesgo de muerte reducido en hasta un 59 % sobre SoC) y probablemente para también ser un indicador positivo de SLP y TR para el régimen de tratamiento con Abituzimab/SoC combinado. El criterio de valoración (SLP) no se encontró en este estudio aleatorizado; un resultado que los autores sugirieron puede ser invertido mediante la selección de una población de paciente más probable de beneficiarse del tratamiento combinado (es decir, pacientes con $\alpha_v\beta_6$ + metástasis). En otras palabras de los autores y resaltando el criterio pero no la necesidad no satisfecha de productos de diagnósticos dirigidos a $\alpha_v\beta_6$, "Desarrollo de un ensayo de diagnóstico con fines terapéuticos para seleccionar la población paciente apropiada será crucial para ensayos adicionales".

El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) tiene en cuenta un 25-30 % de los cánceres de mama, de los cuales solo un pequeño subconjunto progresará a cáncer invasivo; sin embargo, la falta de un indicador de pronóstico para las mujeres con DCIS ha conducido a sobrediagnóstico y sobretratamiento. Tras el diagnóstico, los pacientes de DCIS inmediatamente se enfrentan a decisiones serias respecto al tratamiento; la ausencia de biomarcadores relevantes para ayudar a la guía de estas decisiones es un fallo en la asistencia sanitaria que debe corregirse. La gran cuestión que todavía queda para los pacientes es, "¿Se transformará mi DCIS en cáncer invasivo durante mi vida?" En la actualidad, los pacientes de DCIS se tratan como si fueran a progresar ya que no hay disponibles marcadores robustos para distinguir DCIS de carcinoma invasivo. "Estamos tratando DCIS no porque el DCIS por sí mismo cause ningún problema sino porque es un factor de riesgo principal para el desarrollo de cáncer invasivo". Monica Morrow, M.D., Chief of Breast Service at

MSKCC. El dilema para aquellas mujeres de más de 50 cuya enfermedad podría tomar décadas en progresar es si observar y esperar sería una opción mejor que la mastectomía radical. *"Si se pudiera identificar un marcador molecular que pudiera predecir qué DCIS progresaría a cáncer invasivo frente al que permanecería DCIS para siempre sería una enorme ventaja clínica"*. Monica Morrow, M.D (28). Esta claro que si este agente de obtención de imágenes tiene éxito tendrá un impacto significativo y será beneficioso tanto para los pacientes con enfermedad avanzada así como para identificar aquellos pacientes cuya enfermedad podría avanzar y podría usarse en tanto un ajuste predictivo como de pronóstico que da la información desesperadamente necesaria y las opciones a las mujeres que se enfrentan con las decisiones del tratamiento increíblemente difíciles. En respuesta a esta situación desafiante, la investigación en biomarcadores predictivos ha acelerado y $\alpha\text{v}\beta_6$ está entre los candidatos más prometedores. El análisis retrospectivo ha revelado que la expresión de $\alpha\text{v}\beta_6$ en células mioepiteliales en DCIS es un indicador de la progresión así como de la recurrencia, con el 100 % de DCIS $\alpha\text{v}\beta_6$ + asociado a la enfermedad invasiva (14). Por lo tanto, el desarrollo de un agente de obtención de imágenes dirigido a $\alpha\text{v}\beta_6$ fortalecerá significativamente la capacidad de los médicos para estratificar los pacientes en riesgo de progresión a cáncer invasivo y proporcionar a los pacientes de DCIS mucha información necesaria cuando consideran las condiciones de tratamiento.

De aquellos pacientes diagnosticados con cáncer de mama, aproximadamente el 25-30 % son HER2+, un subgrupo más agresivo. Trastuzumab se usa como un adyuvante de tratamiento para los pacientes HER2+, pero desafortunadamente más del 70 % de los pacientes desarrollan resistencia y nuevas terapias son extremadamente necesarias. La evidencia reciente ha mostrado que la enfermedad $\alpha\text{v}\beta_6$ + /HER2+ es una de las clases más devastadoras de cáncer de mama con SG casi por encima del 50 % (SG para pacientes HER2+, independiente del estado de $\alpha\text{v}\beta_6$, es del 65,1 %). Mientras que la patología de la resistencia a trastuzumab es heterogénea, los miembros de la señalización de PI3K están comúnmente implicados y hay datos sustanciales que demuestran enlace directo y comunicación cruzada entre $\alpha\text{v}\beta_6$ y esta ruta. De nuevo, esta observación permite, como mínimo, estratificación de pacientes basándose en la expresión de $\alpha\text{v}\beta_6$ y consideraciones de tratamiento más informadas, ambas de las cuales son dependientes del trascurso de la disponibilidad de un diagnóstico dirigido a $\alpha\text{v}\beta_6$. En el contexto de tratamiento de la enfermedad HER2+, la adquisición de resistencia a trastuzumab es un asunto clínico crítico. Para aquellos pacientes cuya enfermedad finalmente elude el efecto de trastuzumab, los productos terapéuticos que directamente se dirigen a la señalización de $\alpha\text{v}\beta_6$ o simplemente se dirigen a células $\alpha\text{v}\beta_6$ + ofrecen una opción de tratamiento adicional en una fase que carece de alternativas.

Aunque la lista de enfermedades en las que $\alpha\text{v}\beta_6$ se ha identificado continua expandiéndose mucho, $\alpha\text{v}\beta_6$ se identificó inicialmente en el cáncer de páncreas. Sipos et al. demostraron altos niveles de expresión de $\alpha\text{v}\beta_6$ en los adenocarcinomas ductales pancreáticos (PDAC), con un 94 % (32/34) de muestras que recibían la puntuación máxima (29). El cáncer pancreático es la malignidad más mortal en los Estados Unidos, muriendo finalmente de ella más del 98 % de aquellas personas diagnosticadas con la enfermedad (30). El único tratamiento curativo para el cáncer de páncreas existe cuando se identifica la enfermedad localizada; sin embargo, solo el 20 % de los pacientes será diagnosticado cuando el cáncer se limita al páncreas o los ganglios linfáticos regionales para los cuales la extracción quirúrgica ofrece una opción de cura. Componiendo la dificultad del actual manejo, hasta el 50 % de los pacientes pensaron tener la enfermedad localizada basándose en las modalidades de diagnóstico por imágenes actualmente disponibles (escaneo por tomografía computerizada aumentada por contraste [CT] o tomografía de emisión de positrones ^{18}F FDG PET/CT) tendrá enfermedad metastásica en el momento de la cirugía exploratoria (31, 32). Existe una clara necesidad de obtención de imágenes no invasiva para determinar con precisión el alcance de la enfermedad para que los pacientes con tumores localizados puedan proceder a la cirugía exploratoria con una alta probabilidad de someterse a extirpación potencialmente curativa, aunque aquellos pacientes con cáncer avanzado puedan evitar la cirugía exploratoria realizada únicamente para identificar el alcance de la enfermedad. Un grupo de expertos patrocinados por NCI sobre PDAC identificó métodos para la detección temprana como una de las necesidades insatisfechas más críticas para combatir esta enfermedad. La visión consenso era que las herramientas que permiten la detección temprana, la estratificación de paciente y la evaluación de la eficacia terapéutica en puntos temporales tempranos son de importancia principal. Existe claramente una necesidad insatisfecha de mejores agentes de obtención de imágenes y productos terapéuticos y los compuestos dirigidos a $\alpha\text{v}\beta_6$ son tremendamente prometedores para encontrar esa necesidad.

Resumiendo, la obtención de imágenes dirigida a $\alpha\text{v}\beta_6$ y la terapia proporcionará la información crítica de fase y grado (indolencia/agresividad), las decisiones de terapia guía que son difíciles de tomar sobre los planteamientos de diagnóstico actuales, y tienen un resultado significativo para tanto los pacientes de cáncer sub y sobretratados. El impacto clínico de los planteamientos descritos en este ejemplo es inmediato para un amplio espectro de enfermedades y conserva el potencial para romper las barreras en el tratamiento de algunas de las malignidades a las que se enfrentan los médicos hoy en día.

Agentes de obtención de imágenes moleculares específicos a $\alpha\text{v}\beta_6$: Hasta la fecha, ningún agente de obtención de imágenes molecular para $\alpha\text{v}\beta_6$ ha llegado a la clínica y pocos están en desarrollo. A través del biocribado de fago imparcial sobre las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar, Brown et al. identificaron el péptido de 20 aminoácidos H2009.1 y posteriormente identificaron la diana de unión como $\alpha\text{v}\beta_6$ (33). Demuestran que $\alpha\text{v}\beta_6$ se regula al alza en muchos pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), es un indicador de pronóstico negativo independiente e informa que $\alpha\text{v}\beta_6$ se "activa" en la progresión de la enfermedad de NSCLC (2). En 2013, Brown describió el uso de este péptido como un tetrámero para mejorar el direccionamiento de una formulación liposómica

de doxorubicina (34). Otro planteamiento tomado por el grupo de Gambhir era un péptido de $\alpha_v\beta_6$ anudado a cisteína modificada por ingeniería genética e informaron de dos péptidos radiomarcados con ^{18}F -flúor. Aunque los péptidos estaban >80 % intactos en el suero humano (*ex vivo*) después de una hora, la evaluación *in vivo* de estos péptidos de enlace mostraron captación en riñón de >27 % ID/g (35, 36).

Nuestro planteamiento: Hemos elegido dos planteamientos para identificar ligandos peptídicos específicos a $\alpha_v\beta_6$. Usamos un planteamiento "racional" basado en el bucle GH de una proteína de cubierta del virus de la enfermedad de pies y boca (FMDV) y un planteamiento de biblioteca de un compuesto una perla combinatoria (OBOC) (37). El planteamiento racional ha proporcionado resultados exitosos que están presentes a continuación. Aunque los planteamientos de biblioteca tales como OBOC y fago tienen gran potencial en la identificación de muchos péptidos de aislamiento guías a partir de la plataforma de presentación (perla o fago) da como resultado con frecuencia monómeros con afinidad moderada después de la separación que requiere optimizaciones adicionales (34, 38). Esto también era nuestra experiencia con las bibliotecas OBOC en donde las guías identificadas para el cribado tenían considerable optimización restante antes de que se enfrentasen a la alta afinidad y selectividad *in vivo* de nuestros actuales péptidos basados en A20FMDV2.

Datos que usan péptidos basados en A20FMDV2: La integrina $\alpha_v\beta_6$ es un receptor para la fibronectina, tenascina, vitronectina, el péptido asociado a la latencia (LAP) de TGF β y la proteína de la cubierta VP1 de FMDV. Nuestra primera generación de péptido que se dirige a $\alpha_v\beta_6$ era A20FMDV2, un péptido de 20 aminoácidos, NAVPNLRGDLQVLAQKVART, basado en la secuencia del bucle GH de la proteína VP1 de FMDV. A20FMDV2 demostró alta afinidad, 3 nM para $\alpha_v\beta_6$ inmovilizada con al menos selectividad 1.000 veces por encima de las otras integrinas de unión RGD (39, 40). Inicialmente demostramos la promesa de A20FMDV2 como un agente de obtención de imágenes *in vivo* para $\alpha_v\beta_6$ con [^{18}F]FBA-A20FMDV2. Aunque se observó direccionamiento específico a $\alpha_v\beta_6$ *in vivo*, rápido lavado de tumor (0,66 % ID/g en 1 h, 0,06 % ID/g en 4 h) y escasa estabilidad *in vivo* excluyó su aplicación adicional y condujo a una serie de mejoras (principalmente a través del tamaño y las localizaciones de PEG y el grupo prostético de radiomarcado usado) para llegar al conjugado [^{18}F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ (39-44). [^{18}F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈, un péptido bi-PEGilado que se caracteriza por una sustitución de lisina a arginina, tiene retención de tumor $\alpha_v\beta_6$ positivo de 2,64 % ID/g en 4 h, muestra excreción renal preferente con riñones que contienen <8 % ID/g en 4 h, está un 90 % intacto en suero en 2 h y tiene una relación de tumor $\alpha_v\beta_6$ positivo y negativo de 12,5:1 en 4 h (Figura 20). El reemplazo de la lisina da como resultado el péptido que porta solo un grupo amina en el extremo N, permitiendo así solo radiomarcado en fase de disolución, específico a sitio con [^{18}F]SFB o ésteres activados similares. En conjunto, [^{18}F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ demuestra excelente potencial como un péptido que se dirige a $\alpha_v\beta_6$.

Innovación

La amplia prevalencia de la expresión de $\alpha_v\beta_6$ y la correlación con el fenotipo invasivo del cáncer, así como con la correlación negativa a la supervivencia del paciente, claramente indican que $\alpha_v\beta_6$ es una diana particularmente atractiva para tanto la obtención de imágenes como la terapia. Sin tener aún ningún agente de obtención de imágenes moleculares específicos a $\alpha_v\beta_6$ en la clínica y, hasta donde comprende el conocimiento de los inventores, solo una terapia dirigida a $\alpha_v\beta_6$ basada en anticuerpo está siendo evaluada (NCT01371305; clinicaltrials.gov, fibrosis pulmonar idiopática), existe claramente una necesidad insatisfecha del desarrollo de tanto agentes de obtención de imágenes como estrategias terapéuticas dirigidas. Por lo tanto, se requieren esfuerzos significativos tanto hacia el desarrollo de agentes de obtención de imágenes para diagnóstico así como nuevos productos terapéuticos dirigidos. Este ejemplo describe el desarrollo de nuevos agentes de obtención de imágenes moleculares con mejores afinidades y farmacocinéticas y el desarrollo y el ensayo de la eficacia de las nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a $\alpha_v\beta_6$, resumido como sigue:

1. Terapia dirigida a $\alpha_v\beta_6$ basada en PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ como un vehículo de administración. PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ se usa como un vehículo para tres estrategias terapéuticas: i) D(KLAKLAK)₂ (un péptido proapoptótico); ii) el radionúclido terapéutico ^{90}Y trio (β -emisor, energía adecuada para tratar grandes tumores); y iii) un nanovehículo de paclitaxel (PTX) basado en micela. La eficacia de tres estrategias se evalúa tanto *in vitro* en ensayos celulares como *in vivo* en modelos de ratón. La tomografía de emisión de positrones (PET), la obtención de imágenes por luminiscencia (BLI) y la obtención de imágenes por luminiscencia Cerenkov (CLI) se usaron tanto para rastrear la biodistribución *in vivo* como cuantificar la eficacia terapéutica.

2. Avance hacia los primeros estudios en seres humanos para mejorar las propiedades farmacocinéticas de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈. La multimerización y/o la adición de un motivo de unión a albúmina en sangre se usa para mejorar más la afinidad, la estabilidad *in vivo*, las capacidades de direccionamiento y el comportamiento del aclaramiento de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈. Diferentes grupos prostéticos covalentes, quelantes y química de "click" se usan para diseñar el mejor planteamiento de radiomarcado. Los criterios de selección generales son los rendimientos, la facilidad y la velocidad de síntesis, el marcado de sitio específico, la afinidad y la selectividad, y la retención del direccionamiento a tumor *in vivo* y el aclaramiento de tejidos no tumorales.

Planteamiento

1. Terapia dirigida $\alpha_v\beta_6$

Fundamento: El tratamiento exitoso del cáncer requiere administración dirigida eficaz de la terapia, penetración intracelular en el direccionamiento y lo más probable se beneficiará en el futuro a partir de la combinación de terapias con diferentes mecanismos. El hecho de que el receptor $\alpha_v\beta_6$ no se exprese en epitelio adulto normal lo sugiere como una buena diana molecular para la terapia (el tejido adyacente normal no debe estar afectado). El "direccionamiento específico" único del péptido PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ al receptor $\alpha_v\beta_6$ y su rápida internalización lo hace un vehículo ideal para la terapia dirigida a $\alpha_v\beta_6$. PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ se usa como un vehículo para tres productos terapéuticos con diferentes mecanismos: administración de i) D(KLAKLAK)₂ (un péptido proapoptótico que causa citotoxicidad a través de la alteración de las membranas mitocondriales); ii) el radionúclido terapéutico ⁹⁰Ytrio (β -emisor, energía adecuada para tratar grandes tumores); y iii) una formulación de nanovehículo basado en micela de paclitaxel (PTX, que causa arresto mitótico a través de la estabilización aberrante de microtúbulos que sucesivamente conduce a la muerte celular). La eficacia de las tres estrategias se evalúa tanto *in vitro* en ensayos celulares (por ejemplo, WST-1, TUNEL y Caspasa 3/7) e *in vivo* en modelos de ratón (por ejemplo, xenoinjertos subcutáneos positivos y negativos emparejados y un xenoinjerto ortotópico antígeno positivo). La tomografía de emisión de positrones (PET), la obtención de imágenes por luminiscencia (BLI) y la obtención de imágenes por luminiscencia Cerenkov se usan tanto para rastrear la biodistribución *in vivo* y medir la eficacia terapéutica de estas terapias dirigidas.

Descripción de los modelos: Estudios *in vitro*: DX3/mTFL/ITGB6 y DX3/mTFL (ambos derivados de la línea celular del melanoma DX3 parental) sirven como controles positivos y negativos para todos los ensayos *in vitro* a menos que se indique lo contrario. DX3/mTFL/ITGB6 expresan establemente la integrina β_6 (no expresada en la línea parental o DX3/mTFL) en control de un promotor de CMV. Como integrina α_v (la única integrina capaz de heterodimerizarse con β_6) normalmente se expresa en la línea celular DX3, la expresión endógena de β_6 da como resultado la presencia de $\alpha_v\beta_6$ en la superficie celular. Modelos de ratón: Las líneas DX3/mTFL/ITGB6 y DX3/mTFL emparejadas también permiten el examen *in vivo* de la selectividad basada en $\alpha_v\beta_6$ de la acción de los tres productos terapéuticos. Así, un modelo de xenoinjerto DX3/mTFL/ITGB6 y DX3/mTFL emparejado se usa para determinar la dosis máxima tolerada (DMT) y el efecto terapéutico de los tres productos terapéuticos dirigidos PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈. Para los estudios DMT, se usan ratones portadores de tumor para evitar la influencia sobre la distribución del fármaco, la salud general y el peso corporal y el crecimiento rápido de tumores que confunden la interpretación. Para establecer los xenoinjertos emparejados, los ratones anestesiados (isoflurano) reciben inyecciones bilaterales, subcutáneas (SC) de células DX3/mTFL/ITGB6 y DX3/mTFL (3×10^6 en 100 μ l de medio sin suero) a la región subescapular. Cuando los tumores emparejados han alcanzado 100-200 mg determinado por la medición del calibre y BLI, los ratones se dividen en cohortes como se describe a continuación. Al final de los estudios de SC emparejados, se selecciona un producto terapéutico guía único para el análisis adicional en un modelo de xenoinjerto ortotópico usando BxPC-3/mTFL (una línea celular de adenocarcinoma pancreático humano con expresión de ITGB6 elevada de origen natural). Las células BxPC-3/mTFL (1×10^6 en 100 μ l de solución salina) se inyectan en el páncreas distal con acceso a través de una incisión subcostal. La presión se mantiene durante 1 min para facilitar la hemostasia del sitio de punción así como para prevenir el derrame de la suspensión celular. A continuación, la incisión quirúrgica se cierra con suturas de nailon 5-0 o hemoclips, que se eliminan después de una semana. Dada la rápida eliminación de la anestesia, la recuperación sucede en los primeros 10 min y los ratones se observan continuamente durante 1 h para la actividad respiratoria, la turgencia de la piel y el movimiento. La buprenorfina se administra después de la operación y se continúa cada 12 h durante un total de 48 h tras el procedimiento. Los ratones se guardan en un vivero y se monitorean diariamente hasta que habían desarrollado tumores palpables en el momento en que los ratones se dividen en cohortes como se describe a continuación. Tras la finalización de los procedimientos de estudio, todos los animales se someten a eutanasia (dislocación cervical bajo anestesia). Todas las líneas celulares y los xenoinjertos resultantes expresan mTFL, una variante termoestable de luciferasa de luciérnaga, que permite la obtención de imágenes por bioluminiscencia de tumores resultantes para los estudios longitudinales.

1.1 Direccionamiento selectivo de un péptido proapoptótico D(KLAKLAK)₂ con PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈

El péptido anfipático de 14 aminoácidos D(KLAKLAK)₂ se describió originalmente como un péptido antibacteriano que altera las membranas celulares bacterianas (56). Dada la similitud evolutiva de la estructura de la membrana mitocondrial y bacteriana, cuando se internaliza en células eucariotas D(KLAKLAK)₂ altera la membrana mitocondrial que, a su vez, desencadena la apoptosis (57). Cuando se conjuga con los péptidos "de direccionamiento específico" D(KLAKLAK)₂ se ha demostrado éxito en acumular específicamente células y causar la muerte celular (58-60). Se evalúa la eficacia y la especificidad de un conjugado de D(KLAKLAK)₂ y PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈. El "direccionamiento específico" único al receptor $\alpha_v\beta_6$ y la rápida internalización de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ (>70 % de unión y >50 % de internalización en células $\alpha_v\beta_6$ en 1 h) lo hace un vehículo de administración ideal para D(KLAKLAK)₂ (Figura 20).

En realizaciones particulares, el conjugado D(KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ se sintetiza usando síntesis de péptido en fase sólida (SPPS). En otras realizaciones, el conjugado D(KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ puede sintetizarse usando un planteamiento de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen de azida-alquino convergente (reacción de "click") entre los dos péptidos. En determinadas realizaciones, pueden usarse una nanoformulación para conseguir el efecto terapéutico, por ejemplo, si D(KLAKLAK)₂ demuestra ser tóxica.

1.1.a) Síntesis del conjugado $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2\text{-GG-PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$

Todos los péptidos usados se sintetizan manualmente sobre resinas Rink usando la química de Fmoc estándar. Para el conjugado $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2$ - y $\text{PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$, un enlazador glicina-glicina (GG) se incorpora entre los dos péptidos para minimizar el impedimento estérico que podría prevenir la unión y la internalización. Todos los péptidos se purifican usando métodos RP-HPLC convencionales y se caracterizan usando MALDI-MS. Se prepararon $\text{PEG}_{28}\text{-A20FMDV2-GG-D}(\text{KLAKLAK})_2\text{-K}$ y $\text{D}(\text{KLAK-LAK})_2\text{-GG-PEG}_{28}\text{-A20FMDV2-K}$, se caracterizaron y se radiomarcaron usando ^{18}F FBA y se realizaron estudios de unión (Figura 21). Los resultados indican que la conjugación de $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2$ y $\text{PEG}_{28}\text{-A20FMDV2-PEG}_{28}$ no afecta a su afinidad, especificidad y potencial de internalización hacia la integrina $\alpha_v\beta_6$. La estabilidad en suero del conjugado peptídico se evalúa durante un periodo de 24 h. El conjugado $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2\text{-GG-PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$ se incuba con suero a 37 °C, se toman alícuotas a 1, 2, 4, 12 y 24 h, las proteínas plasmáticas se precipitan con etanol y el sobrenadante se analiza por HPLC para determinar el porcentaje del conjugado intacto.

1.1.b) Eficacia *in vitro* del conjugado $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2\text{-GG-PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$

Se utilizan ensayos de proliferación celular con tetrazolio soluble en agua (WST-1, Roche), marcación final de la mella de desoxinucleotidil transferasa dUTP terminal (Click-iT TUNEL, Life Technologies) y Caspasa 3/7 (Caspasa-Glo, Promega) para determinar la eficacia terapéutica de $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2\text{-GG-PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$. Las células cultivadas en placas de 96 pocillos (WST-1, Caspasa 3/7) o portaobjetos de cámara con 8 pocillos (ensayo TUNEL) se tratan con 20 concentraciones de $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2\text{-GG-PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$ que oscilan de 0-500 μM o las correspondientes concentraciones de uno de los siguientes controles: i) $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2$ y $\text{PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$ no conjugados; ii) $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2$ solo; iii) $\text{PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$ solo; o iv) vehículo (solución salina) solo. A las 2, 6, 24 y 48 h después del tratamiento, los ensayos se completan según las recomendaciones del fabricante. Se completa el análisis de regresión no lineal de los datos usando el programa informático Prism 6.0 (GraphPad) para determinar la concentración inhibidora semimáxima (CI_{50}) para conjugar y controlar.

1.1.c) Determinación de la dosis máxima tolerada (DMT)

DMT es dependiente de tanto la terapia administrada como del modelo en el que se completa el estudio y debe determinarse empíricamente para cada producto terapéutico propuesto. Los ratones no portadores de tumor se dividen en seis cohortes que reciben uno de un intervalo de concentraciones del conjugado $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2\text{-GG-PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$ (0, 5, 10, 15, 20 o 25 $\mu\text{g/g}$) en una dosis única a través de inyección en la vena de la cola. A continuación, en los animales se monitorean durante un periodo de 30 días las señales de angustia, efectos secundarios inaceptables o pérdida de peso. Al final del estudio, DMT se calcula y estos datos se usan para determinar la dosis terapéutica que se va a usar en el estudio de eficacia descrito a continuación.

1.1.b) Eficacia terapéutica del conjugado $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2\text{-GG-PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$

Los ratones portadores de xenoinjertos derivados de DX3/mTFL/ITGB6 y DX3/mTFL emparejadas (100-200 mg) se dividen en seis cohortes y reciben una inyección única de o bien el conjugado (Grupo experimental N.º 1), $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2$ y $\text{PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$ no conjugados (grupo control N.º 1), $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2$ solo (Grupo control N.º 2) $\text{PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$ solo (Grupo control N.º 3) o solución salina (Grupo control N.º 4). A las 96 h después del tratamiento, tres ratones de cada cohorte se someten a eutanasia y se reservan el tejido, los tumores y los órganos para el análisis inmunohistoquímico de la morfología (IHC) (H&E) y otros indicadores del dolor/muerte (caspasa-3, TUNEL, etc.). Para los ratones restantes, se determinan los tamaños tumorales dos veces a la semana por BLI. Para completar BLI, los ratones anestesiados (isoflurano) se inyectan intraperitonealmente con D-luciferina (150 mg/kg) 15 minutos antes de la adquisición de imagen. Tras este periodo de captación, los ratones (hasta cinco de una vez) se colocan en una superficie de obtención de imágenes precalentada con isoflurano constante. Las imágenes fotográficas y de luminiscencia se adquieren con tiempo de escaneo total de <1 min. En cada punto temporal de obtención de imagen, se registran los pesos de los animales para asegurarse que ningún animal muestra inaceptable pérdida de peso (superior a un 10 % del peso del animal) tras el tratamiento. Este programa se sigue para todos los animales hasta que los tumores han alcanzado tamaños máximos como se define por la política de la IACUC sobre los criterios de evaluación humano.

1.2. Radioterapia dirigida a $\alpha_v\beta_6$ con $^{90}\text{Y-DOTA-PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$

Los péptidos han demostrado éxito en la clínica como vehículos de administración dirigida para la terapia radionuclídica, de otro modo conocida como terapia dirigida a receptor peptídico (PRTT). Los artículos con más éxito de PRTT hasta la fecha han sido el uso de los análogos peptídicos del receptor de somatostatina (SSTR), $^{90}\text{Y-DOTA-TOC}$ y $^{177}\text{Lu-DOTA-TATE}$ para tratar pacientes con tumores neuroendocrinos (NET) (66-68). El éxito de PRTT requiere: i) direccionamiento específico del péptido para administrar una dosis de radiación eficaz; ii) buena estabilidad *in vivo* e internalización del péptido; y iii) propiedades físicas apropiadas del radionúclido. Como con $^{111}\text{In-Octreoscán}$ (el agente de diagnóstico para tumores que expresan SSTR), las terapias dirigidas a $\alpha_v\beta_6$ pueden comprender radiomarcado de $\text{PEG}_{28}\text{-A20FMDV2(K16R)-PEG}_{28}$ con un radionúclido terapéutico (69). ^{90}Y es un radionúclido útil

ilustrativo debido a que la alta energía de la β -partícula (2,3 MeV) con un intervalo máximo en el tejido de 12 mm (bien adecuado para tratar tumores grandes) así como la capacidad de obtener imágenes de las β -emisiones usando CLI para monitorear la acumulación en el sitio del tumor. Para PRTT, la infusión simultánea de aminoácidos básicos tales como lisina que se han usado en pacientes como agentes protectores del riñón y, nefrotoxicidad reducida con éxito (70, 71). La multimerización y/o la adición de motivos de unión a albúmina para PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ que tiene el potencial de mejora de las propiedades farmacocinéticas del péptido pueden también reducir la retención en riñón. En determinadas realizaciones, se usa la combinación de PRTT con tanto el planteamiento de radionúclido múltiple así como el planteamiento de vehículo multireceptor/albumina. En otras realizaciones, tomar ventaja de las diferentes propiedades físicas de ^{90}Y y ^{177}Lu permite el amplio direccionamiento en un intervalo de tamaños tumorales ya que se demuestra en pacientes NET con $^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE (72).

1.2 a) Síntesis de ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈

PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ se marca con ^{90}Y usando los métodos convencionales y DOTA como el quelante. El acetato de amonio acuoso (1 M, pH 8,0-8,5) y una solución del DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ (20 nmol) se añaden a una solución de [^{90}Y]Cl₃ (1-5 mCi) en ácido clorhídrico acuoso 0,05 M. El pH se ajusta a 7 a 8 con acetato de amonio acuoso (1 M) y la mezcla de reacción incubada a t.a durante 1 h. Se añadió DTPA para limpiar cualquier $^{90}\text{Y}^{3+}$ libre. El ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ se purifica por C-18 Sep-Pak, se formula en PBS/solución salina y se analiza por RP-HPLC.

1.2 b) Unión celular e internalización

La unión celular y la internalización se evalúan usando métodos convencionales. Se añaden alícuotas de 200 nCi de ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ a las células ($3,75 \times 10^6$ DX3/mTFL/ITGB6 o DX3/mTFL) y se incuban durante 1 h a t.a. ($n = 4/\text{línea celular}$). Tras la centrifugación, se elimina el sobrenadante y el sedimento celular se lava con 0,5 ml de DMEM sin suero. La fracción de radiactividad unida se determina con un γ -contador (sedimento celular frente a sobrenadantes combinados). Para determinar la fracción de radiactividad internalizada, las células se tratan posteriormente con tampón de lavado ácido para liberar la actividad unida a superficie seguido de un lavado con PBS. La fracción internalizada se determina con un γ -contador (sedimento celular frente a radiactividad liberada en el sobrenadante).

1.2 c) Estabilidad en suero *in vitro*

Para conferir estabilidad, se incuba ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ (27 μCi) con suero a 37 °C (o con control de PBS), alícuotas tomadas a 0, 4, 24, 48 y 144 h y proteínas plasmáticas precipitadas con etanol. La fracción de radiactividad unida a proteína se determina con un γ -contador (sedimento frente a sobrenadante) y la HPLC analítica del sobrenadante realizada para determinar el porcentaje de ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ intacto.

1.2 d) Eficacia *in vitro* de ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈

El análisis *in vitro* de ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ cubre un intervalo de 0-1 μCi por muestra y se completa y se analiza como en el anterior 1.1.b) (ensayos de WST-1, TUNEL y Caspasa 3/7). Los controles son las correspondientes concentraciones de [^{90}Y]Cl₃ y DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈.

1.2. e) Determinación de la dosis máxima tolerada (DMT)

DMT se determinada como se describe en el anterior 1.1.c). Los ratones portadores de xenoinjertos SC emparejados reciben 0, 5, 8,75, 12,5, 16,25 o 20 $\mu\text{Ci/g}$ of ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ y se monitorean como se ha descrito anteriormente. Ya que este radionúclido permite CLI, se adquieren imágenes de 0-72 h después de la inyección (PI) para monitorear de manera no invasiva la acumulación y la retención de ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ en el sitio del tumor. El procedimiento de adquisición de imágenes por CLI es idéntico al de BLI (descrito en el anterior 1.1.d) con un tiempo de escaneo total de <15 min.

1.2 f) Eficacia terapéutica de ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈

La eficacia del tratamiento con ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ se determina a través del método descrito en el anterior 1.1.d). Los ratones portadores de xenoinjertos SC emparejados se dividen en dos cohortes que reciben o bien ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ (DMT) o control de solución salina, cada uno se libera a través de una inyección sencilla en la vena de la cola. Se toman imágenes de los ratones y se monitorean después del tratamiento como se describe en el anterior 1.1.d).

1.3 Administración dirigida de Paclitaxel a través de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈

Las nanopartículas (NP) mostraron promesa significativa como vehículos de administración para los productos terapéuticos y los agentes de obtención de imágenes moleculares (61). Aumentando la tolerabilidad y/o la eficacia de

nuevos fármacos, las nanopartículas están haciendo una contribución significativa a los resultados clínicos. Una de las nanomedicinas de primera generación, Abraxane® (paclitaxel estabilizado con albúmina, nab-PTC), fue recientemente aprobada por la FDA junto con Gemcitabina como el tratamiento de primera línea para pacientes con cáncer pancreático metastásico (62). Es probable que muchos más regímenes de combinación serán aprobados con los efectos anticancerosos mejorados ya que nos esforzamos en tratar la miríada de enfermedades agresivas. Como el direccionamiento activo ha demostrado ser prometedor en la acumulación de nanopartícula creciente en el sitio del tumor cuando el direccionamiento pasivo es ineficaz [revisión en (63)], se usa una NP dirigida a $\alpha\text{v}\beta_6$ para administrar el compuesto quimioterapéutico, PTX. PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ se une a NP (es decir, el vehículo de terapia) en lugar de la unión directa del péptido al producto terapéutico como se ha descrito anteriormente. El armazón de telodendrímico es PEG^{5K}CA₈, un nanovehículo basado en micela, se puede usar como un vehículo (NP) y se conjuga al péptido para conseguir la administración dirigida a $\alpha\text{v}\beta_6$ de PTX (64, 65). Este sistema de nanovehículo es un copolímero bloque dendrítico lineal anfifílico que usa tres bloques de construcción biocompatibles: polietilenglicol (PEG), L-lisina y ácido cólico (CA). PEG^{5K}CA₈ es soluble en agua y se autoensambla en micelas (21 ± 4 nm) con una alta capacidad de carga de PTX (12 mg/ml). Se demostró eficacia antitumoral *in vivo* de PEG^{5K}CA₈ cargado con PTX en modelos de ratón de cáncer de ovario con toxicidad superior en comparación con Taxol® y Abraxane®. La combinación de la ventajas de este sistema NP con el "direccionamiento específico" único del péptido PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ al receptor $\alpha\text{v}\beta_6$ y su rápida internalización puede superar el reto activo frente a pasivo. En realizaciones alternativas, se usa un planteamiento de liposoma. En otras realizaciones, se usa un planteamiento multivalente usando un núcleo de lisina divalente y/o tetravalente para añadir 2 a 4 copias del péptido a la superficie de la NP. En realizaciones adicionales, se usa un planteamiento de maleimida-tiol.

1.3 a) Síntesis de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈-PTX

N₃-PEG^{5K}CA₈ y alquínil-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ se sintetizan para ligación a través de la reacción de 1,3-dipolar cicloadición de Huisgen de azida-alquino. N₃-PEG^{5K}CA₈ se sintetiza en solución, se somete a diálisis y se liofiliza (Figura 22). Alquínil-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ se sintetiza usando SPPS. Las micelas se caracterizan usando TEM. Se mide el tamaño y la distribución de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS). La carga de PTX se realiza como se ha descrito previamente (por ejemplo, PTX y PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈ se disuelven en cloroformo, se secan y posteriormente se someten a sonicación en solución tampón PBS, los precipitados de fármaco no cargados eliminados por filtración de 0,22 μm y la carga se calculan a partir de RP-HPLC). La estabilidad del suero de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈-PTX se estudia como se describe en el anterior 1.1.a) y la liberación de PTX se evalúa usando diálisis y RP-HPLC.

1.3 b) La eficacia *in vitro* de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈-PTX

El análisis *in vitro* de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈-PTX cubre las concentraciones que oscilan de 0-25 ng/ml y se completa y se analiza como se describe en el anterior 1.1.b) (por ejemplo, WST-1, TUNEL y Caspasa 3/7). Los tratamientos control son las correspondientes concentraciones de tres controles: i) PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈; ii) PEG^{5K}CA₈-PTX; y iii) PEG^{5K}CA₈.

1.3. c) Determinación de la dosis máxima tolerada (DMT)

DMT se determina como se describe en SA 1.1.c) anterior. Los ratones no portadores de tumor se dividen en seis cohortes que reciben 0, 12, 24, 36, 48 o 60 $\mu\text{g/g}$ PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈-PTX y se monitorean como se ha descrito previamente.

1.3 d) La eficacia terapéutica de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈-PTX

Eficacia del tratamiento con PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈-PTX se determina a través del método descrito en el anterior 1.1.d). Los ratones portadores de xenoinjertos SC se dividen en cinco cohortes que reciben PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈-PTX (Grupo experimental N.º 1), PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈ (Grupo control N.º 1), PEG^{5K}CA₈-PTX (Grupo control N.º 2), PEG^{5K}CA₈ (Grupo control N.º 3), o solución salina (Grupo control N.º 4). Se toman imágenes de los ratones y se monitorean después del tratamiento como se describe en el anterior 1.1.d).

1.4 Eficacia terapéutica del producto terapéutico guía en un modelo ortotópico de cáncer de páncreas

Tras la conclusión de los estudios de DMT y xenoinjerto subcutáneo, se selecciona un único compuesto guía basándose en la fracción más alta de la regresión tumoral/no progresión (basado en análisis estadístico) para análisis adicional dentro del modelo ortotópico BxPC-3/mTFL. Con este modelo, las lesiones se desarrollan dentro de su microambiente normal. Adicionalmente, la administración del producto terapéutico al sitio tumoral en este modelo puede confirmar más precisamente las farmacocinéticas deseadas. Los ratones portadores de tumores BxPC-3/mTFL ortotópicos se dividen en cuatro cohortes que reciben una de las tres dosis de producto terapéutico dirigido (por ejemplo, 0,25X, 0,5X o 1X DMT) o solución salina control. El análisis del efecto terapéutico y todo el monitoreo después del tratamiento de los ratones se completan como se describe en el anterior 1.1.d).

1.5 Análisis estadístico

El efecto terapéutico puede determinarse principalmente mediante la reducción del tamaño del tumor/tasa de crecimiento y la supervivencia de los animales. El primer objetivo analítico es estimar la dosis máxima tolerada

(DMT) para cada producto terapéutico candidato, definido como la dosis más alta con no más del 10 % de los animales experimentando una toxicidad limitante de la dosis (TLD). Podemos ajustar los modelos de respuesta a la dosis cuánticos logarítmica lineal al número de ratones que experimentan TLD y estimar la DMT-10 % por calibración, con intervalos de confianza del 95 % calculados por un planteamiento del teorema de Fieller modificado. Si no se observa DLT, podemos estimar un límite superior en la probabilidad de un TLD a través del intervalo de 5 dosis, para obtener un límite inferior en la DMT. El segundo objetivo analítico para evaluar la eficacia del péptido dirigido radiomarcado con ^{90}Y o conjugado con $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2$ o $\text{PEG}^{5\text{K}}\text{CA}_8$ comparado con controles apropiados en un modelo de tumor emparejado dentro del ratón (diana positivo y diana negativo). El resultado primario puede ser la tasa de crecimiento, medida dos veces semanalmente por BLI. Podemos ajustar los modelos de regresión de la curva de crecimiento de las medidas repetidas de efecto mezclado, comparando la tasa de crecimiento bajo tratamiento activo con el crecimiento lineal anticipado en los tumores tratados con solución salina, usando un planteamiento de coeficiente de regresión estructurado. La comparación primaria puede estar entre el tratamiento conjugado/radiomarcado de los tumores diana positivos y los tumores diana positivos no tratados; las comparaciones secundarias pueden evaluar el efecto de los controles apropiados y la diferencia en los efectos sobre los tumores de diana positivos frente a los tumores de diana negativos. Asumiendo el crecimiento tumoral lineal en los animales no tratados con un intervalo de ± 50 % de la media, los ensayos bilaterales en $\alpha = 0,05$ tienen al menos un 85 % de poder para detectar una reducción de dos tercios en la tasa de crecimiento usando las formas conjugadas/radiomarcadas del producto terapéutico experimental, una mejora clínicamente significativa. Los modelos pueden validarse gráfica y analíticamente y alternativas consideradas (ajustes no lineales, transformaciones) si se infringen las suposiciones.

2. Avance hacia los primeros estudios en seres humanos para mejorar las propiedades farmacocinéticas de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈

La alta afinidad y selectividad de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ para el receptor $\alpha_v\beta_6$ se ha demostrado tanto *in vitro* (ELISA y unión celular) como *in vivo* (obtención de imágenes por PET en animal pequeño) como se describe en el presente documento. El conjugado peptídico posee particularmente direccionamiento favorable y propiedades farmacocinéticas. Como se describe en esta sección, pueden realizarse mejoras adicionales a este péptido con respecto a su afinidad así como farmacocinéticas *in vivo* y el tiempo de circulación. Por ejemplo, el uso de la multimerización y/o la adición de un motivo de unión a albúmina en sangre no covalente puede mejorar además la afinidad, el comportamiento *in vivo* y las capacidades de direccionamiento. Diferentes grupos prostéticos covalentes, quelantes y química de "click" pueden consultarse para diseñar el mejor planteamiento para radiomarcado el péptido.

2.1 Un planteamiento multimérico

En comparación con los péptidos monoméricos, los derivados multiméricos han presentado afinidad de diana muy aumentada para los receptores de superficie celular. Particularmente, la mejora no lineal en la afinidad con frecuencia se observa cuando se hace la transición de péptido monomérico a péptidos diméricos y tetraméricos, dando como resultado más del doble/cuádruple de afinidades (34). Se cree que el beneficio adicional está basado en la avidéz, se deriva de interacción sinérgica (multivalente) de las subunidades multiméricas con receptores de superficie celular múltiple. Probablemente esto inducirá la reorganización estructural de los receptores de superficie celular, dando como resultado mejor unión a través de la formación de los puntos calientes de la adhesión local. Este impulso de la afinidad basada en la multivalencia se ha documentado lo más a conciencia para la obtención de imágenes *in vivo* dirigido de una integrina relacionada, $\alpha_v\beta_3$, con péptidos ciclo(RGD) (45-47). Los parámetros clave para el éxito son: i) la afinidad a diana y la selectividad del monómero de partida; y ii) el tamaño del multímero (número de monómeros y la longitud de los enlazadores entre ellos - con enlazadores mayores que facilitan la unión polivalente). También, un reciente informe preliminar ha mostrado similares efectos positivos para un péptido lineal que se dirige a $\alpha_v\beta_6$, ^{64}Cu -M10, en donde la captación tumoral aumentada en como mucho casi 3 veces para el ^{64}Cu -(M10)₂ dimérico en los primeros puntos temporales (0,55 a 1,6 % ID/g en 1 h) (34). Cabe destacar que, en comparación, nuestro compuesto guía monómero actual (es decir, PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈) tiene unión a tumor en 1 h de un 2,51 % ID/g y permanece constante durante 4 horas. La evaluación de la mejora de la afinidad para el receptor $\alpha_v\beta_6$ *in vitro* e *in vivo* a través de la multimerización de péptidos derivados de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈, por lo tanto, es una etapa significativa para tanto la obtención de imágenes moleculares como la terapia como se destaca en lo anterior. En realizaciones alternativas, los enlazadores de PEG de diferentes longitudes (por ejemplo, PEG₅, PEG₁₁) y la multimerización cabeza a cola (por ejemplo, usando química de click en fase de solución) puede usarse para determinar los efectos de avidéz.

2.1.a) Síntesis

Pueden prepararse péptidos monoméricos, diméricos y tetraméricos y sus análogos radiomarcados (Figura 23). El impedimento estérico se minimiza por los espaciadores de PEG₂₈ C-terminales que se conectan a la lisina de ramificación. Todos los péptidos se sintetizan sobre resinas Rink usando la química de Fmoc estándar. Tras un

espaciador de β -alanina, se introduce un residuo Lys(Alloc) para el radiomarcado específico a sitio en el extremo de la síntesis peptídica después de la desprotección con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ("Pd"). La ramificación se consigue a través del uso de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, o bien una vez (para dímeros) o dos veces (para tetrámeros; véase la Figura 23); para el monómero se usa un Fmoc-Lys(ivDde)-OH, que, después de la desprotección con hidrazina, se protege con acetato (usando anhídrido acético) para proporcionar un control con equivalente en el extremo C al de los multímeros. El ensamblaje del péptido restante usa Fmoc-aminoácidos y Fmoc-PEG₂₈-COOH y anhídrido acético (para la protección terminal), con equivalentes de reactivo ajustados para los multímeros.

2.1. b) Planteamientos de radiomarcado

En determinados casos, el grupo prostético usado para el radiomarcado del péptido puede afectar a todas las farmacocinéticas. Así, el planteamiento de radiomarcado (covalente frente a basado en quelante) no está influido, sino que se presenta una estrategia modular que facilita el radiomarcado con radioisótopos que incluyen ^{18}F , ^{64}Cu , y ^{90}Y . Se utilizan métodos establecidos, incluyendo un planteamiento de radiomarcado en fase sólida usando ácido 4- ^{18}F fluorobenzoico (^{18}F FBA) (48). Una vez que se establecen la estabilidad *in vitro* e *in vivo*, la afinidad y selectividad de los péptidos ^{18}F -radiomarcados para el receptor $\alpha_v\beta_6$, se deben requerir semividas radioactivas mayores debido a la circulación o la retención *in vivo* en la diana, pueden usarse radioisótopos y estrategias alternativas. En determinadas realizaciones, se usan quelantes metálicos fiables tales como DOTA, NOTA y NOTA-TCO (TCO = trans-cicloocteno) para los radioisótopos de mayor vida. Para el radiomarcado, se acoplan DOTA(OtBu)₃-COOH o NOTA(OtBu)₂-COOH, seguido de escisión de TFA, purificación por HPLC y quelación metálica en solución.

2.1 c) Análisis *in vitro* (ELISA competitivo)

El ELISA competitivo puede usarse para determinar la afinidad y la selectividad para la integrina $\alpha_v\beta_6$ purificada. La integrina $\alpha_v\beta_3$ puede usarse en paralelo como control para determinar la selectividad. La integrina se captura en una placa de 96 pocillos (anticuerpo P2W7 capturador de α_v). Para el experimento de competición, se revisten los pocillos por triplicado con volúmenes iguales de fibronectina biotinilada (BtFn; ligando natural biotinilado para $\alpha_v\beta_6$) o vitronectina (BtVn; para $\alpha_v\beta_3$) y una dilución serial de péptido (análogo no radioactivo; solución de trabajo: 2 mM; intervalo de concentración final 10 pM a 100 μM) para 1 h. Controles: i) no péptido, ii) no péptido y no anticuerpo, iii) no péptido y no ligando de Bt. Se detecta la BtFn unida (o BtVn) mediante la adición de ExtrAvidina-peroxidasa de rábano picante, seguido de solución de tetrametilbenzidina (TMB). La reacción se termina con el ácido sulfúrico 1N y la absorbancia se mide en 450 nm. Los valores de CI_{50} se determinan por el trazado de la gráfica del % de Bt-ligando unido frente a la concentración peptídica. Todos los compuestos con $\text{CI}_{50} < 5$ nM y la selectividad de > 1.000 veces para $\alpha_v\beta_6$ sobre $\alpha_v\beta_3$ pueden progresar a los estudios de unión celular. Este planteamiento permite la identificación de péptidos que se dirigen a $\alpha_v\beta_6$ y elimina aquellos que se unen a otros miembros muy cercanos de la familia de la integrina tal como $\alpha_v\beta_3$. Utilizando esta estrategia, A20FMDV2 demostró alta afinidad, (por ejemplo, 3 nM) para la $\alpha_v\beta_6$ inmovilizada, con al menos una selectividad de 1.000 veces sobre las otras integrinas de unión (40).

Descripción de los modelos. *Estudios in vitro:* DX3/mTFL/ITGB6 y DX3/mTFL (ambas derivadas de la línea celular de melanoma DX3 parental y equivalentes a DX3puro β_5 DX3puro, respectivamente, con expresión adicional de mTFL, una variante termoestable de luciferasa de luciérnaga, que permite la obtención de imágenes por bioluminescencia [BLI] de los tumores en los estudios animales) sirven como controles positivos y negativos, respectivamente, para todos los ensayos *in vitro* a menos que se indique lo contrario. DX3/mTFL/ITGB6 expresa establemente integrina β_6 bajo control de un promotor de CMV. Como integrina α_v (la única integrina capaz de heterodimerizarse con β_6) normalmente se expresa en la línea celular DX3, la expresión endógena de β_6 da como resultado la presencia de $\alpha_v\beta_6$ en la superficie celular. La integrina $\alpha_v\beta_6$ no se expresa en el DX3/mTFL (o la línea parental) y ambas líneas celulares expresan $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$ y otros miembros muy relacionados de la familia de la integrina. *Modelos de ratón:* Las líneas DX3/mTFL/ITGB6 y DX3/mTFL emparejadas permiten el examen *in vivo* de la selectividad basada en $\alpha_v\beta_6$ de tanto los péptidos radiomarcados como los productos terapéuticos potenciales descritos anteriormente. Para establecer los xenoinjertos emparejados, los ratones anestesiados (isoflurano) reciben inyecciones bilaterales, subcutáneas (SC) de células DX3/mTFL/ITGB6 y DX3/mTFL (3×10^6 en 100 μl de medio sin suero) subescapular. Cuando los tumores emparejados han alcanzado 100-200 mg determinados por palpación, los ratones se usan para los estudios de diagnóstico por imágenes o terapia.

2.1 d) Análisis *in vitro* (unión celular)

La unión celular puede evaluarse para cada péptido radiomarcado usando DX3/mTFL/ITGB6 y DX3/mTFL como se ha descrito anteriormente. Las alícuotas del péptido radiomarcado pueden incubarse con una suspensión celular (por ejemplo, $3,75 \times 10^6$ células/100 μl ; $n = 4$ /línea celular) durante 1 h. Estudios previos demostraron que la unión celular sucedía rápidamente, en los primeros 30 min (39). Tras la centrifugación, se elimina el sobrenadante y el sedimento celular se lava con 0,5 ml de SF-DMEM. La fracción de radiactividad unida se determina con un γ -contador. Para determinar la fracción de radiactividad internalizada, las células se tratan posteriormente con tampón de lavado ácido para liberar la actividad unida a superficie y se miden en un γ -contador. Todos los péptidos radiomarcados con un > 50 % de unión y un > 40 % de internalización y con 10 veces de selectividad para DX3/mTFL/ITGB6 pueden progresar a los estudios de estabilidad en suero.

2.1 e) Análisis *in vitro* (estabilidad en suero)

La estabilidad en suero para cada péptido radiomarcado puede evaluarse durante un periodo de tiempo de 2 h (^{18}F) o 24 h (^{64}Cu) mediante la incubación con suero a 37 °C (control: en PBS). Las alícuotas pueden tomarse a 0,5, 1, 2 h (^{64}Cu : también 4, 12 y 24 h), las proteínas plasmáticas se precipitan con etanol y el sobrenadante se analizan por HPLC para determinar el porcentaje de los péptidos radiomarcados intactos. Todos los péptidos radiomarcados que están >95 % intactos después de 2 horas y atienden a todos los anteriores criterios de unión a célula pueden progresar a los estudios *in vivo*.

2.1 f) Obtención de imágenes por PET/CT de animal pequeño

El modelo de xenoinjerto DX3/mTFL/ITGB6 y DX3/mTFL emparejado se ha descrito anteriormente. Para cada péptido radiomarcado, cuando los tumores han alcanzado 100-200 mg los animales se usan para los estudios de obtención de imágenes (PET/CT) y biodistribución siguiendo los protocolos aprobados por IACUC. Para los estudios de imagen, los péptidos radiomarcados (aproximadamente 200 μCi) se administran a través inyección en la vena de la cola en ratones anestesiados (isoflurano) y se realizan imágenes de los ratones (por ejemplo, ^{18}F : 0-1, 2, 4 h; ^{64}Cu : 1, 4, 24 h). Cada escaneo de emisión puede estar acompañado por un escaneo de transmisión (para la corrección de la atenuación) y un escaneo CT (para la referencia anatómica). Los datos de la imagen pueden descartarse, reconstruirse, registrarse conjuntamente y analizarse dibujando regiones de interés (RdI) alrededor de los tumores y los órganos de interés (riñón, vejiga, hígado, corazón, músculo) en función de los datos de referencia de CT, y se trazan en la gráfica como curvas de actividad con el tiempo. Para los estudios de biodistribución, los péptidos radiomarcados (aproximadamente 20 μCi) se inyectan como se ha descrito anteriormente. Los tejidos, órganos y tumores se extirpan rápidamente (por ejemplo, puntos temporales para ^{18}F : 1, 2, 4 h; ^{64}Cu : 1, 4, 24 h), se aclaran con PBS y se mide la radiactividad en un γ -contador. Las concentraciones de radiactividad calibradas, corregidas por desintegración se pueden expresar como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de muestra (% ID/g). Adicionalmente, para los experimentos de bloqueo, el péptido que se dirige a $\alpha_v\beta_6$ demostrado [^{19}F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2 puede inyectarse i.v. (30 mg/kg, 10 mg/ml en solución salina) diez minutos antes del radiotrazador; la disección y el análisis puede realizarse en el punto temporal de 1 h como se ha descrito anteriormente. Para la evaluación de la estabilidad del trazador *in vivo*, se analizan muestras de tumor, riñón y orina. Para evaluar la estabilidad en el tumor y el riñón pueden inyectarse los péptidos radiomarcados como se ha descrito anteriormente. El tumor $\alpha_v\beta_6$ positivo y los riñones pueden recogerse (1 h) y homogenizarse en PBS. Las proteínas se precipitan con etanol, la radiactividad medida y el sobrenadante analizado por HPLC para determinar el porcentaje de los péptidos radiomarcados intactos. Cuando estaba disponible, la orina en exceso se recoge durante los estudios de biodistribución para el análisis por HPLC. Adicionalmente, pueden insertarse dos conjuntos de tumores en el medio de congelación y seccionarse inmediatamente (20 μm para la autorradiografía, 5 μm para IHC, alternante). Las muestras de autorradiografía se exponen a una pantalla de fósforo de almacenamiento durante la noche y se leen usando una fosforócamara. La IHC puede hacerse una vez que la radiactividad se ha desintegrado; las secciones se fijan (formaldehído), se bloquean (3 % de H_2O_2 ac.), se incuban con el anticuerpo anti-integrina β_6 y el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, seguido del desarrollo con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y se contratiñe con Hematoxilina de Mayer.

2.2 Motivos de unión a albúmina para mejorar las farmacocinéticas *in vivo*

Una desventaja de la aplicación de péptidos "de direccionamiento específico" para el direccionamiento tumoral es su semivida *in vivo* corta. Los esfuerzos anteriores para aumentar la semivida incluían la unión covalente a las moléculas vehículo tales como la albúmina purificada antes de la administración (49, 50). También se han investigado otros planteamientos no covalentes; Dennis et al. describieron la interacción no covalente entre la albúmina y un fragmento de anticuerpo conjugado con un péptido de unión a albúmina (51). En este punto, los beneficios farmacocinéticos se realizan por interacción no covalente del radiotrazador con la albúmina presente en la corriente sanguínea. En este planteamiento no solo era un aumento en la captación tumoral del fragmento observado sino también no retención en el riñón. Más recientemente, una pequeña molécula basada en ácido 4-(4-iodofenil)butírico descubierta por el cribado de una biblioteca química codificada por ADN que se une a HSA, se usó para facilitar el primer direccionamiento del receptor de ácido fólico usando un conjugado de ácido fólico pequeño (52). Como se describe en el estudio por Schibli et al., cuando este aglutinante de albúmina (Figura 24) se conjugó con ácido fólico marcado con ^{177}Lu , se observó alta captación tumoral y acumulación renal significativamente reducida (53, 54). Este planteamiento no covalente puede usarse para mejorar la semivida en sangre de PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ y otros análogos. El planteamiento basado en quelante para el radiomarcado ofrece la mayor flexibilidad con respecto a la elección del radioisótopo así como la fácil purificación final. Adicionalmente, la carga formal del radiomarcador del grupo prostético, que se cree que desempeña un papel en la captura renal, puede modificarse eligiendo los quelantes con diferentes números de cargas negativas (por ejemplo, DOTA, NOTA, CB-TE2A). Además del aumento del tiempo de circulación del péptido, este planteamiento también tiene el potencial de reducir la problemática retención en el riñón observada con los análogos del quelato radiomarcado. Al [^{18}F]NOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 mostró captación en riñón en 4 h de un 229 % ID/g frente a [^{18}F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ que en 4 h era solo de un 7,87 % ID/g (Figura 25).

En determinados casos, el yodo en el ácido 4-(4-iodofenil)butírico se reemplaza con grupos tales como metilo o bromo y/o la cadena alquilo se acorta, ya que se ha mostrado que la afinidad del aglutinante de albúmina es ajustable. En

otros casos, una modificación de monocisteína del péptido que se introduce como residuos de cisteína sencillos ha mostrado que forma un enlace disulfuro temporal con Cys34 de albúmina, ayudando en el direccionamiento tumoral de los trazadores peptídicos (55).

5 2.2 a) Síntesis

El aglutinante de albúmina puede ensamblarse usando la química de Fmoc (Esquema 1 en la Figura 26) del ácido 4-(4-iodofenil)butírico (IPA) y Fmoc-Lys-OAll. Tras la eliminación de Fmoc, el aglutinante de albúmina alil protegido (Figura 24) puede acoplarse a la cadena lateral del primer aminoácido (Fmoc-Glu(OH)-) en fase sólida, seguido de
10 ensamblaje peptídico convencional. (La alil-protección puede eliminarse del aglutinante de albúmina antes de la escisión del ácido trifluoroacético (TFA)). Para el marcado radiometálico, los quelantes (DOTA, NOTA) se introducen como ácidos mononoprotectados, seguido de ácidos, seguido de escisión, purificación por HPLC y radiomarcado en fase de solución (Esquema 1 en la Figura 26). El radiomarcado en fase sólida (por ejemplo, con [¹⁸F]FBA), el grupo
15 prostético puede acoplarse al extremo terminal N libre (en lugar del quelante) antes de la escisión, seguido de purificación por radio-HPLC.

Los estudios con un grupo de unión a albúmina, denominado K(IPA)E (es decir., ε-(4-(4-iodofenil)butil amida)lisina-ácido glutámico), introducido en el extremo N del péptido A20FMDV2 PEGilado biterminal (es decir, FBA-K(IPA)E-PEG₂₈-NAVPNLRGDLQVLAQKVART-PEG₂₈) mostró (en ELISA) alta afinidad para la diana (CI₅₀ = 1 nM), comparable
20 a la del A20FMDV2 PEGilado que no porta K(IPA)E (CI₅₀ = 2 nM). La especificidad de diana y la selectividad también se mostraron en los ensayos de unión basada en célula e internalización usando células DX3puroβ₆ que expresan integrina α_vβ₆ y el control Dx3puro α_vβ₆ negativo (Figura 27). Tanto el radiotrazador portador de K(IPA)E como su control libre de K(IPA)E se unieron en un 52 % a las células DX3puroβ₆; se internalizó un 56 % de la radiactividad unida para el radiotrazador portador de K(IPA)E (frente a un 44 % del control). En comparación, la unión y la
25 internalización para ambos radiotrazadores era baja en el control Dx3puro α_vβ₆ negativo.

2.2 b) Análisis *in vitro* (ensayo de la unión proteica)

Se usa un ensayo de ultrafiltración para determinar la unión del péptido aglutinante a albúmina radiomarcado usando
30 métodos previamente descritos. Los dispositivos de ultrafiltración Centrifree pueden usarse para separar péptido radiomarcado libre de la fracción unida a albúmina plasmática al final del periodo de incubación. Los filtrados pueden medirse en un γ-contador y determinarse el porcentaje de unión. El HPLC de exclusión por tamaño puede realizarse sobre muestras plasmáticas sanguíneas incubadas con el péptido (37 °C; 5, 15, 30, 60 m) para evaluar las cinéticas de unión. Todo el otro cribado *in vitro* e *in vivo* puede procederse como se describe en las Secciones anteriores 1.2
35 b), 1.2.c) y 2.1.

2.2 c) Estudios en primates no humanos

El impacto de la multimerización y la adición del motivo de unión a albúmina puede cuantificarse claramente *in vitro* e
40 *in vivo* y pueden identificarse los compuestos que tienen alta afinidad (por ejemplo, <1 nM), buena selectividad para α_vβ₆ (por ejemplo, más de 1.000 veces mayor afinidad sobre las otras integrinas) junto con buen comportamiento *in vivo* y estabilidad significativamente mejorada *in vivo*. Otros criterios tales como la captación tumoral total, el aclaramiento rápido de los órganos tales como riñones, la velocidad de síntesis, la simplicidad, el marcado de sitio específico, los rendimientos de la radioquímica y las actividades específicas pueden tenerse en cuenta para más
45 selección de compuestos para ser avanzados para la evaluación adicional en primates no humanos (PNH) tales como monos rhesus. Para evaluar la biodistribución y la seguridad de los péptidos optimizados, pueden realizarse estudios en PNH. PNH proporcionan los necesarios y previstos modelos translacionales y preclínicos debido a las similitudes reproductivas, del desarrollo, fisiológicas, genéticas e inmunológicas cuando se compara con seres humanos. Para estos estudios, pueden seleccionarse 2 péptidos guías basados en la afinidad a α_vβ₆ y la selectividad, y pueden
50 evaluarse el direccionamiento al tumor α_vβ₆(+) *in vivo* y la retención y el aclaramiento de los tejidos no tumorales en 4 monos rhesus (2 machos y 2 hembras) usando las técnicas establecidas. Para los monos rhesus (*Macaca mulatta*) se incluyen como dos parejas (un macho, y una hembra cada uno) para cada uno de los péptidos ensayados después de amplios estudios en los ratones. Este planteamiento permite el estudio de pares de macho/hembra simultáneamente, eliminando las variables que confunden mientras que se conservan los números de los animales.
55 Estos estudios también permiten que se realicen imágenes de los animales simultáneamente.

Puede determinarse toda la dosimetría corporal. Los animales están en ayunas durante la noche, a continuación, se sedan con telazol/ketamina para estos procedimientos usando protocolos estandarizados. Se colocan en posición
60 supina sobre el lecho de escaneo por PET/CT, se inyectan con el péptido radiomarcado intravenosamente (IV) (ambos se inyectan simultáneamente) y se realizan las imágenes durante 30 min, a continuación, se repite a las 2 y 4 h después de la inyección. Se recogen muestras de sangre (vasos periféricos; aproximadamente 2 ml) y muestras de orina (cistocentesis guiada por ultrasonidos; aproximadamente 1 ml) en cada punto temporal para el análisis por HPLC. Se monitorea la saturación de oxígeno con un oxímetro de pulso durante la obtención de la imagen y una almohadilla calentada por agua circulante para mantener la temperatura corporal. Después de la obtención de las imágenes, los
65 animales se colocan en una habitación de metabolismo diseñado para el monitoreo de la radiactividad y, a continuación, se vuelve a su jaula regular una vez limpiado. Elegido a partir de la riqueza de los datos murinos y

primates generados, el agente de obtención de imágenes guía puede seleccionarse para llegar al equilibrio más favorable de la captación y retención tumoral dirigida a $\alpha_v\beta_6$ (modelo de ratón) y farmacocinéticas totales favorables, notablemente aclaramiento renal (obtención de imágenes de primates). La Figura 28 muestra las imágenes PET/CT coronales de los escaneos de [^{18}F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈ en monos rhesus sanos.

Sumario

Este ejemplo demuestra el diseño, la síntesis y la evaluación de los nuevos agentes de obtención de imágenes moleculares que se dirigen a $\alpha_v\beta_6$ y las estrategias terapéuticas. La prevalencia de este receptor en los cánceres, su asociación con el potencial metastásico y la correlación negativa a la supervivencia del paciente y los informes crecientes en la bibliografía que citan $\alpha_v\beta_6$ como una diana para la obtención de imágenes y la terapia hacen de estos nuevos agentes de obtención de imágenes moleculares y estrategias terapéuticas oportuna y altamente relevantes de manera clínica.

Referencias

1. Ahmed et al., Alpha(v)beta(6) integrin-A marker for the malignant potential of epithelial ovarian cancer. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. 2002;50(10):1371-80.
2. Elayadi et al., A peptide selected by biopanning identifies the integrin alphavbeta6 as a prognostic biomarker for nonsmall cell lung cancer. *Cancer research*. 2007;67(12):5889-95.
3. Liu et al., Integrin alphavbeta6 as a novel marker for diagnosis and metastatic potential of thyroid carcinoma. *Head & neck oncology*. 2013;5(1):7.
4. Jones et al., ADAM 10 is over expressed in oral squamous cell carcinoma and contributes to invasive behaviour through a functional association with alphavbeta6 integrin. *FEBS letters*. 2013;587(21):3529-34.
5. Zhuang et al., Clinical significance of integrin alphavbeta6 expression effects on gastric carcinoma invasiveness and progression via cancer-associated fibroblasts. *Medical oncology*. 2013;30(3):580.
6. Vogetseder et al., alphav-Integrin isoform expression in primary human tumors and brain metastases. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;133(10):2362-71.
7. Ahmed et al., $\alpha_v\beta_6$ Integrin-A Marker for the Malignant Potential of Epithelial Ovarian Cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2002;50(10):1371-9.
8. Ahmed et al., Association between alphavbeta6 integrin expression, elevated p42/44 kDa MAPK, and plasminogen-dependent matrix degradation in ovarian cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2002;84(4):675-86.
9. Kawashima et al., Expression of alphav integrin family in gastric carcinomas: increased alphavbeta6 is associated with lymph node metastasis. *Pathology, research and practice*. 2003;199(2):57-64.
10. Hsiao et al., Cyclic alphavbeta6-targeting peptide selected from biopanning with clinical potential for head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2010;32(2):160-72.
11. Bates, The alphaVbeta6 integrin as a novel molecular target for colorectal cancer. *Future oncology*. 2005;1(6):821-8.
12. Bandyopadhyay et al., Defining the role of integrin alphavbeta6 in cancer. *Current drug targets*. 2009;10(7):645-52.
13. Thomas et al., $\alpha_v\beta_6$ integrin in wound healing and cancer of the oral cavity. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2006;35(1):1-10.
14. Allen et al., Altered Microenvironment Promotes Progression of Preinvasive Breast Cancer: Myoepithelial Expression of alphavbeta6 Integrin in DCIS Identifies High-risk Patients and Predicts Recurrence. *Clinical cancer research*. 2014;20(2):344-57.
15. Dutta et al., Integrin $\alpha_v\beta_6$ promotes an osteolytic program in cancer cells by upregulating MMP2. *Cancer research*. 2014.
16. Prudkin et al., Epithelial-to-mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Modern pathology*. 2009;22(5):668-78.
17. Annes et al., Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding

protein-1. *The Journal of cell biology*. 2004;165(5):723-34.

18. Bates et al., Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(2):339-47.

19. Berghoff et al., Invasion patterns in brain metastases of solid cancers. *Neuro-Oncology*. 2013;15(12):1664-72.

20. Peng et al., Integrin alphavbeta6 and transcriptional factor Ets-1 act as prognostic indicators in colorectal cancer. *Cell & bioscience*. 2014;4(1):53.

21. Moore et al., Therapeutic targeting of integrin alphavbeta6 in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(8).

22. Berghoff et al., alphavbeta3, alphavbeta5 and alphavbeta6 integrins in brain metastases of lung cancer. *Clinical & experimental metastasis*. 2014;31(7):841-51.

23. Niu et al., Protein expression of eIF4E and integrin alphavbeta6 in colon cancer can predict clinical significance, reveal their correlation and imply possible mechanism of interaction. *Cell & bioscience*. 2014;4:23.

24. Sun et al., Interleukin-8 promotes cell migration through integrin alphavbeta6 upregulation in colorectal cancer. *Cancer letters*. 2014;354(2):245-53.

25. Wang et al., SDF-1/CXCR4 axis promotes directional migration of colorectal cancer cells through upregulation of integrin alphavbeta6. *Carcinogenesis*. 2014;35(2):282-91.

26. Bates, Colorectal cancer progression: integrin alphavbeta6 and the epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Cell cycle*. 2005;4(10):1350-2.

27. Elez et al., Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the randomised phase I/II POSEIDON trial. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO*. 2014.

28. Nelson, DCIS prognostic markers: a few new candidates emerge. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(9):588-90.

29. Sipos et al., Immunohistochemical screening for beta6-integrin subunit expression in adenocarcinomas using a novel monoclonal antibody reveals strong up-regulation in pancreatic ductal adenocarcinomas *in vivo* and *in vitro*. *Histopathology*. 2004;45(3):226-36.

30. Siegel et al., Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(1):9-29.

31. Chari, Detecting early pancreatic cancer: problems and prospects. *Seminars in oncology*. 2007;34(4):284-94.

32. Pelaez-Luna et al., Resectability of presymptomatic pancreatic cancer and its relationship to onset of diabetes: a retrospective review of CT scans and fasting glucose values prior to diagnosis. *The American journal of gastroenterology*. 2007;102(10):2157-63.

33. McGuire et al., Biopanning of phage displayed peptide libraries for the isolation of cell-specific ligands. *Methods in molecular biology*. 2009;504:291-321.

34. Gray et al., From Phage Display to Nanoparticle Delivery: Functionalizing Liposomes with Multivalent Peptides Improves Targeting to a Cancer Biomarker. *Bioconjugate Chemistry*. 2012;24(1):85-96.

35. Miao et al., An engineered knottin peptide labeled with 18F for PET imaging of integrin expression. *Bioconjug Chem*. 2009;20(12):2342-7.

36. Hackel et al., 18F-fluorobenzoate-labeled cystine knot peptides for PET imaging of integrin alphavbeta6. *Journal of nuclear medicine*. 2013;54(7):1101-5.

37. Gagnon et al., High-throughput *in vivo* screening of targeted molecular imaging agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(42): 17904-9.

38. Gray et al., Combinatorial Peptide libraries: mining for cell-binding peptides. *Chemical reviews*. 2014;114(2):1020-81.

39. Hausner et al., Targeted *in vivo* imaging of integrin alphavbeta6 with an improved radiotracer and its relevance

in a pancreatic tumor model. *Cancer research*. 2009;69(14):5843-50.

40. Hausner et al., Use of a peptide derived from foot-and-mouth disease virus for the noninvasive imaging of human cancer: generation and evaluation of 4-[18F]fluorobenzoyl A20FMDV2 for *in vivo* imaging of integrin alphavbeta6 expression with positron emission tomography. *Cancer research*. 2007;67(16):7833-40.

41. Hausner et al., *In vitro* and *in vivo* evaluation of the effects of aluminum [(1)(8)F]fluoride radiolabeling on an integrin alphavbeta(6)-specific peptide. *Nuclear medicine and biology*. 2014;41(1):43-50.

42. Hausner et al., Evaluation of an integrin alphavbeta6-specific peptide labeled with [18F]fluorine by copper-free, strain-promoted click chemistry. *Nuclear medicine and biology*. 2013;40(2):233-9.

43. Hausner et al., Evaluation of [64Cu]Cu-DOTA and [64Cu]Cu-CB-TE2A chelates for targeted positron emission tomography with an alphavbeta6-specific peptide. *Molecular imaging*. 2009;8(2):111-21.

44. Hausner et al., *In vivo* positron emission tomography (PET) imaging with an alphavbeta6 specific peptide radiolabeled using 18F-"click" chemistry: evaluation and comparison with the corresponding 4-[18F]fluorobenzoyl- and 2-[18F]fluoropropionyl-peptides. *Journal of medicinal chemistry*. 2008;51(19):5901-4.

45. Semmler et al., Molecular Imaging II. Preface. Handbook of experimental pharmacology. 2008(185 Pt 2):vii-ix.

46. Li et al., (64)Cu-labeled tetrameric and octameric RGD peptides for small-animal PET of tumor alpha(v)beta(3) integrin expression. *Journal of nuclear medicine*. 2007;48(7):1162-71.

47. Zhou et al., Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Radiotracers for Imaging Tumors and Thrombosis by SPECT. *Theranostics*. 2011;1:58-82.

48. White et al., Optimization of the solid-phase synthesis of [18F] radiolabeled peptides for positron emission tomography. Applied radiation and isotopes: including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine. 2012;70(12):2720-9.

49. Dou et al., Expression, purification, and characterization of recombinant human serum albumin fusion protein with two human glucagon-like peptide-1 mutants in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*. 2008;61(1):45-9.

50. Smith et al., Prolonged *in vivo* residence times of antibody fragments associated with albumin. *Bioconjug Chem*. 2001;12(5):750-6.

51. Nguyen et al., The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin. *Protein engineering, design & selection: PEDS*. 2006;19(7):291-7.

52. Dumelin et al., A portable albumin binder from a DNA-encoded chemical library. *Angewandte Chemie*. 2008;47(17):3196-201.

53. Muller et al., DOTA conjugate with an albumin-binding entity enables the first folic acid-targeted 177Lu-radionuclide tumor therapy in mice. *Journal of nuclear medicine*. 2013;54(1):124-31.

54. Fischer et al., Improved PET imaging of tumors in mice using a novel (18) F-folate conjugate with an albumin-binding entity. *Molecular imaging and biology*. 2013;15(6):649-54.

55. Pang et al., A free cysteine prolongs the half-life of a homing peptide and improves its tumor-penetrating activity. *Journal of controlled release*. 2014;175:48-53.

56. Ellerby et al., Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nature medicine*. 1999;5(9):1032-8.

57. Barbu et al., An Antimicrobial Peptidomimetic Induces Mucorales Cell Death through Mitochondria-Mediated Apoptosis. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e76981.

58. Arap et al., Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(3):1527-31.

59. Fantin et al., A bifunctional targeted peptide that blocks HER-2 tyrosine kinase and disables mitochondrial function in HER-2-positive carcinoma cells. *Cancer research*. 2005;65(15):6891-900.

60. Karjalainen et al., Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma. *Blood*. 2011;117(3):920-7.

61. Bertrand et al., Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013(0).

62. Von Hoff et al., Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(18):1691-703.

63. Friedman et al., The smart targeting of nanoparticles. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(35):6315-29.

64. Luo et al., Well-defined, size-tunable, multifunctional micelles for efficient paclitaxel delivery for cancer treatment. *Bioconjug Chem*. 2010;21(7):1216-24.

65. Li et al., A novel size-tunable nanocarrier system for targeted anticancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2010;144(3):314-23.

66. Waldherr et al., Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq (90Y)DOTATOC. *Journal of nuclear medicine*. 2002;43(5):610-6.

67. Bodei et al., Receptor radionuclide therapy with 90Y-[DOTA]0-Tyr3-octreotide (90Y-DOTATOC) in neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31(7):1038-46.

68. Van Essen et al., Peptide Receptor Radionuclide Therapy with radiolabelled somatostatin analogues in patients with somatostatin receptor positive tumours. *Acta oncologica*. 2007;46(6):723-34.

69. Norenberg et al., 213Bi-[DOTA0, Tyr3]octreotide peptide receptor radionuclide therapy of pancreatic tumors in a preclinical animal model. *Clinical cancer research*. 2006;12(3 Pt 1):897-903.

70. Imhof et al., Response, survival, and long-term toxicity after therapy with the radiolabeled somatostatin analogue [90Y-DOTA]-TOC in metastasized neuroendocrine cancers. *Journal of clinical oncology*. 2011;29(17):2416-23.

71. Rolleman et al., Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003;30(1):9-15.

72. Kunikowska et al., Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with 90Y-DOTATATE and tandem 90Y/177Lu-DOTATATE: which is a better therapy option? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011; 38(10): 1788-97.

Ejemplo 4. Péptidos PEGilados biterminales con mejorada estabilidad, rendimientos de radiomarcado y lipofilicidad para obtención de imágenes moleculares dirigida a $\alpha_v\beta_6$ y terapia.

Este ejemplo ilustra que la PEGilación biterminal usando una fracción de PEG más corta tal como PEG₁₁ (es decir, polietilenglicol de 11 unidades de repetición) era capaz de conferir características *in vitro* superiores a un péptido de 8 aminoácidos que se une a integrina $\alpha_v\beta_6$ (es decir, RSDLTPLF) mejorando su estabilidad en suero, los rendimientos de radiomarcado y la lipofilicidad. Aunque el péptido progenitor, H-RSDLTPLFNH₂, tiene una alta afinidad de 7 nM y es 100 veces más selectivo para $\alpha_v\beta_6$ sobre $\alpha_v\beta_3$, estudios de estabilidad en suero de este péptido revelaron escasa estabilidad *in vitro*. Así, este ejemplo demuestra que una versión PEGilada biterminal de este péptido proporciona de manera ventajosa alta selectividad para integrina $\alpha_v\beta_6$ y alta estabilidad en suero para la obtención de imágenes *in vivo* y terapia.

I. Materiales y métodos

Materiales

Todos los productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Acros (New Jersey), Fluka (St. Louis MO), y Fisher Scientific (Waltham, MA) a menos que se especifique lo contrario. La resina NovaSyn TGR se adquirió de Novabiochem (La Jolla, California). Los 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) aminoácidos y los reactivos de síntesis peptídica se adquirieron de Novabiochem y GLS-China (Shanghai, China). El polietilenglicol de 11 unidades de repetición (PEG₁₁) se adquirieron de Polypure (Oslo, Noruega). Todos los aminoácidos usados fueron L-aminoácidos.

Se realizó síntesis peptídica en fase sólida manual usando química de Fmoc estándar en 1 ml o 5 ml de viales de reactor frito adquiridos de Breakwood Enterprises (Akron, OH) y Fisher Scientific. La cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) se realizó usando sistemas de cromatografía Beckman-Coulter (Brea, CA) con detectores de UV de matriz de diodo a 220 nm y 254 nm, junto con el programa informático 32Karat o el sistema de RP-HPLC Ultimate 3000 por Dionex (Sunnyvale, CA) con detectores de UV de matriz de diodos, con el programa informático Chromeleon. La purificación y el análisis se realizaron usando columnas Jupiter C-12 (250 x 460 mm, 4 micras, Phenomenex) con fases móviles que consistían en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05 % en agua (disolvente A) y 100 % de acetonitrilo (disolvente B). Los productos se eluyeron de las columnas usando un gradiente lineal de un

disolvente B al 9 % durante dos minutos y aumentando durante 30 minutos hasta un disolvente B al 81 % con un flujo constante de 1,5 ml/minuto. La espectrometría de masas (MS) de los compuestos purificados se obtuvo usando un sistema de tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser asistida por matriz de alta resolución ABI 4700 (MALDI-TOF) (Applied Biosystems, Foster City, CA).

El [^{18}F]fluoruro para el radiomarcado se produjo por la reacción $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})\ ^{18}\text{F}$ usando un ciclotrón de laboratorio de ion negativo 11 MeV Siemens RDS III en el "Center for Molecular and Genomic Imaging" (Davis, CA) o se adquirió de PETNET Solutions (Sacramento, CA). La radiactividad se midió usando un calibrador de dosis Capintec (Capintec Inc, Ramsey, NJ). HPLC gold 168 (Beckman-Coulter) en serie con un detector de radiación Gabistar (Raytest, Straubenhardt, Alemania) se usó para medir la pureza y la pureza radioquímica de las muestras respectivamente. Los detectores se conectaron en serie, dando como resultado una diferencia ligera en los tiempos de retención observados para los compuestos radiactivo y sus correspondientes patrones fríos.

La afinidad de cada péptido era ELISA evaluada sobre placas de 96 pocillos de fondo plano Nunc Maxisorp (affymetrix ebioscience, San Diego, CA). El anticuerpo P2W7 de integrina $\alpha\text{V}\beta_6$ se adquirió de Novus Biologicals (Littleton, CO). La albúmina de suero (BSA) se adquirió de VWR (Randor, PA) y TMB una solución se adquirió de Promega (Madison, WI). La integrina $\alpha\text{V}\beta_6$ se adquirió de R&D systems (Minneapolis, MN). El kit de biotinilación de proteína se adquirió de Amersham plc (Amersham, UK) mientras que la fibronectina ligando natural competitiva se adquirió de Invitrogen (Carlsbad, CA). La afinidad se midió en unidades de absorbancia por el lector de placa Thermo Multiscan con programa informático Ascent asociado (ThermoFisher, Waltham, MA).

Síntesis en fase sólida de NH_2 -péptidos

La síntesis peptídica se realizó manualmente usando técnicas de fase sólida de Fmoc estándar (Tabla 3) (Chan et al., (2003) Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach. Oxford University Press). La resina TGR Novasyn (300 mg) se pesó y se transfirió a un vial de reactor de 5 ml. Se añadió *N,N*-dimetilformamida (DMF) al vial de reactor durante 1,5 horas para permitir que las resinas se hincharan y, a continuación, se drenaran en vacío. El acoplamiento del aminoácido se realizó añadiendo 3 equiv. de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU) y aminoácidos protegidos por (Fmoc) y 6 equiv. de *N,N*-diisopropiletelamina (DIPEA) al vial reactor y se acopló durante 1,5 horas sobre un agitador automático.

Tabla 3. Lista de péptidos sintetizados. Péptidos sintetizados sin [^{19}F]FBA (columna izquierda), péptidos sintetizados con FBA (columna derecha).

NH_2-péptidos	Péptidos [^{19}F]FBA
H-RSDLTPLF-NH ₂	FBA-RSDLTPLF-NH ₂
Boc-RSDLTPLFK(NH ₂)-NH ₂	Boc-RSDLTPLFK(FBA)-NH ₂
H-RSDLTPLFK(Boc)-NH ₂	FBA-RSDLTPLFK(Boc)-NH ₂
H-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-NH ₂	FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-NH ₂
H-RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	FBA-RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂
H-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂
c(RSDLTPLFE)K(IvdDe)-NH ₂	C(RSDLTPLFE)K(FBA)-NH ₂

Las reacciones de acoplamiento se monitorearon mediante el ensayo de ácido picrilsulfónico (PSA) para todos los aminoácidos excepto para la prolina en la que se usó el ensayo de cloranil (Chen et al., 2003). Se colocó una muestra de perlas de resina sobre una placa de ensayo cerámico, se añadió una gota de la solución de ensayo de PSA que consistía en 100 μl de DMF, 10 μl de DIPEA y una gota de PSA a la muestra. En el caso de amina secundaria, el ensayo de cloranil se realizó después de lavar con DMF (3x); una gota de solución de chloranil que consistía en 53 mg de *p*-tetrachlorobenzoquinona y 50 μl de acetaldehído en 2,5 ml de DMF (Chan et al., 2003). La presencia de aminas libres no reactivas producen perlas rojas para el ensayo de PSA; azul para el ensayo de cloranil. Después de las reacciones de acoplamiento completas las perlas se aclararon con DMF (3x) y se drenaron. La eliminación de Fmoc se consiguió usando un piperidina al 20 % en DMF durante 15 minutos (2x). La resina se lavó posteriormente con DMF (3x), Metanol (3x) y DMF (3x) seguido del ensayo de PSA o el ensayo de cloranil. El procedimiento de acoplamiento de un aminoácido se repitió hasta que se completó la secuencia peptídica deseada.

En el caso de Boc-RSDLTPLFK(NH₂)-NH₂, inicialmente Fmoc-Lys(IvdDe)-OH se acopló a la resina mediante la adición de Fmoc-Lys(IvdDe)-OH (3 equiv.), HATU (2,99 equiv.), y DIPEA (6 equiv.) en DMF y se acopló con las condiciones descritas para la síntesis peptídica en fase sólida. El acoplamiento de las secuencia restante usó aminoácidos con grupos protectores estándar, excepto para la adición de arginina, se usó Boc-Arg(Pbf)-OH en lugar de Fmoc-Arg(Pbf)-OH para producir una amina N-terminal libre después de la escisión de la resina. Después de que se completara la elongación de la secuencia, se realizó la desprotección del grupo protector 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-

ilideno)isovaleril (ivDde) en Lisina mezclando el péptido con 60 µl de hidrazina en 2,94 ml de DMF durante 15 minutos (2x) (Conroy *et al.*, (2008) Efficient use of the Dmab protecting group: applications for the solid-phase synthesis of N-linked glycopeptides. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7(11):2255-2258). La resina se aclaró con DMF (3x), MeOH (3x), y DMF (3x) y se ensayó con la solución de PSA para determinar la presencia de una amina libre.

En el caso de H-RSDLTPLFK(Boc)-NH₂, inicialmente Fmoc-Lys(Boc)-OH se acopló a la resina mediante la adición de Fmoc-Lys(Boc)-OH (3 equiv.), HATU (2,99 equiv.), y DIPEA (6 equiv.) en DMF y se acopló con las condiciones descritas para la síntesis peptídica en fase sólida. Los acoplamientos restantes usaron aminoácidos con grupos protectores estándar.

Para la síntesis de H-RSDLTPLF-PEG₁₁-NH₂ y H-PEG₁₁-RSDLTPLF-PEG₁₁-NH₂, inicialmente Fmoc-PEG₁₁-OH se acopló a la resina mediante la adición de Fmoc-PEG₁₁-OH (1,1 equiv.), HATU (1.1 equiv.), y DIPEA (2 equiv.) en DMF y se colocó sobre un agitador automático durante 16 horas, seguido de un segundo acoplamiento durante 6 horas. Las reacciones de acoplamiento se monitorearon mediante el ensayo de PSA. Después de las reacciones de acoplamiento completas las perlas se aclararon con DMF (3x) y se drenaron. Se realizó la eliminación de Fmoc. La secuencia restante se completó mediante el acoplamiento de los aminoácidos con grupos protectores estándar. La PEGilación N-terminal para H-PEG₁₁-RSDLTPLF-NH₂ y H-PEG₁₁-RSDLTPLF-PEG₁₁-NH₂ se realizó después del acoplamiento exitoso y la desprotección de Fmoc de la arginina N-terminal. Fmoc-PEG₁₁-OH se acopló a la resina (peptidil resina) mediante la adición de Fmoc-PEG₁₁-OH (1,1 equiv.), HATU (1.1 equiv.), y DIPEA (2 equiv.) en DMF y se colocó sobre un agitador automático durante 16 horas, seguido de un segundo acoplamiento durante 6 horas. Las reacciones de acoplamiento se monitorearon mediante el ensayo de ácido picrílsulfónico (PSA).

La síntesis y la ciclación de c(RSDLTPLFE)K se consiguió con la síntesis peptídica en fase sólida. La síntesis de c(RSDLTPLFE)K-NH₂ se consiguió mediante el primer acoplamiento de Fmoc-Lys(ivDde)-OH a la resina mediante la adición de Fmoc-Lys(ivDde)-OH (3 equiv.), HATU (2,99 equiv.), y DIPEA (6 equiv.) en DMF y se acopló con las condiciones descritas para la síntesis peptídica en fase sólida. Después de eso, Fmoc-Glu(OA11)-OH se acopló mediante la adición de Fmoc-Glu(OA11)-OH (3 equiv.), HATU (2,99 equiv.) y DIPEA (6 equiv.) en DMF. Los acoplamientos restantes usaron aminoácidos con grupos protectores estándar. Después de que la secuencia se ensamblara completamente, la resina se secó a través de un liofilizador durante la noche. La peptidil resina se aclaró y se hinchó en diclorometano (DCM). La cadena lateral Allil del ácido glutámico se desprotegió mediante la adición de 20 equivalentes de fenilsilano y 0,5 equivalentes de tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) en alrededor de 2-3 ml de DCM.

La solución de fenilsilano/tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) se burbujeó brevemente con nitrógeno, se pipeteó en el vaso de reacción para añadirse a la peptidil resina y se colocó en el agitador durante 30 minutos (2x). Después de que se lavara la peptidil resina con un DIPEA al 1 % en DMF (v/v) (3x), 100 % de DMF (3x), sal de sodio de ácido dietilditiocarbámico (p/v) al 5 % en DMF (3x) y 100 % de DMF (3x) (Chan *et al.*, 2003). A continuación, se lavó la peptidil resina con MeOH (3x) y DMF (3x). Se eliminó el grupo protector Fmoc. Para ciclar el péptido, se mezcló HATU (0,99 equiv.) y DIPEA (2,0 equiv.) con 2 ml de DMF, se añadió a peptidil resina y se colocó sobre el agitador durante 16 horas. El acoplamiento completo se midió por el ensayo de PSA. Tras la ciclación, se eliminó la cadena lateral de (ivDde) mezclando la peptidil resina con solución de hidrazina al 2 % en DMF durante 15 minutos (2x). La peptidil resina se aclaró con DMF (3x), MeOH (3x), y DMF (3x) y se ensayó con la solución de PSA para determinar la presencia de una amina libre.

Para probar la pureza, se separaron las muestras de los péptidos de la resina (10 mg) y los grupos protectores de la cadena lateral se eliminaron mediante el uso del ácido trifluoroacético (TFA)/1, 2-etanodiol/TIPS/agua en 94:2,5:1:2,5 (v/v/v/v) durante 3 horas. El tratamiento final de después de la escisión consistía en la evaporación de TFA mediante una corriente de aire de baja presión seguido de la adición de 1 ml de agua. A continuación, se disolvió el péptido en bruto en agua y etil éter, se mezcló suavemente y se retiró la capa de éter. La mezcla y la eliminación del éter se realizó (3x) con el péptido crudo aislado en la capa de agua. La capa de agua se liofilizó. La purificación analítica se consiguió por RP-HPLC sobre un gradiente lineal del disolvente B durante dos minutos; aumentado de un 9 % a un 81 % de disolvente B durante 30 minutos. Los productos se recogieron, se liofilizaron y la masa del producto se confirmó usando MALDI-TOF.

Síntesis de [¹⁹F]FBA péptidos

Después de completar las secuencias de NH₂-péptido, [¹⁹F]FBA (FBA frío) se conjugó específicamente a sitio a cada péptido (Tabla 3). 10 mg de cada una de la peptidil resina se acoplaron con [¹⁹F]FBA (10 equiv.), HATU (20 equiv.) y DIPEA (40 equiv.) durante 1,5 horas. A continuación, se escindieron los péptidos. Los productos se analizaron por RP-HPLC y se confirmó la masa por MALDI-TOF.

ELISA de los péptidos [¹⁹F]FBA para la integrina α_vβ₆

La afinidad de cada péptido [¹⁹F]FBA hacia α_vβ₆ y α_vβ₃ se compararon mediante ELISA de unión competitiva (Gagnon *et al.*, (2009) High-throughput *in vivo* screening of targeted molecular imaging agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(42):17904-17909). Los péptidos se dejaron competir durante 1 h con fibronectina biotinilada, ligando natural para α_vβ₆; o vitronectina biotinilada, cuando compite frente a α_vβ₃. Brevemente, se revistió una placa

de 96 pocillos con 50 µl/pocillo de 5 µg/ml de P2W7 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 37 °C durante 1 h. La placa se lavó tres veces con PBS seguido de tratamiento con PBS que contenía albúmina de suero bovino al 5 % (BSA; fracción V; p/v) y Tween 20 al 1 % (v/v) a 4 °C durante 16 h para bloquear la unión no específica. La placa se lavó con PBS y se recubrió con 50 µl/pocillo de integrina en tampón fosfato (WaB) durante 1 h y, a continuación, se lavó tres veces con WaB. WaB consistía en una solución de 2 mmol/l de tampón Tris (pH 7,6), 150 mmol/l de cloruro de sodio, 1 mmol/l de cloruro de manganeso y Tween 20 al 0,1 % (v/v) en agua desionizada. Los pocillos por triplicado se recubrieron con 50 µl/pocillo de una mezcla de volúmenes iguales de fibronectina biotinilada (BtFn) para $\alpha_v\beta_6$ o vitronectina biotinilada (BtVn) para $\alpha_v\beta_3$, en tampón conjugado, que consistía en BSA al 1 % (fracción V; p/v) en WaB y una dilución seriada de la solución de trabajo de péptido (2 mmol/l; DMSO al 10 % (v/v) en agua) de 1 µM a 1 pM. Los pocillos que contenían no péptido, no péptido y no anticuerpo, o no péptido y no ligando sirvieron como controles. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y se lavó tres veces con WaB antes de que se añadiera el conjugado de peroxidasa de rábano picante ExtrAvidina (50 µl/pocillo, la dilución 1:1.000 en el tampón de conjugado) a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado con WaB, se detectó la BtFn o BtVn unida mediante la adición de TMB (50 µl/pocillo) y la incubación durante 10 a 15 min. La reacción se terminó mediante la adición de 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1N y se midió la absorbancia a 450 nm (el color amarillo de TMB oxidada acidificada que indica la unión a fibronectina). Los cálculos de los valores de CI_{50} se basan en el análisis de datos con el programa informático Prism (programa informático GraphPad).

Radiomarcado en fase sólida de los péptidos que se dirigen a $\alpha_v\beta_6$ con [^{18}F]FBA

Las técnicas de radiomarcado en fase sólida se adaptaron de los métodos previamente publicados (Hausner et al., (2009) Targeted *In vivo* imaging of integrin $\alpha_v\beta_6$ with an improved radiotracer and its relevance in a pancreatic tumor model, *Cancer Research*, 69:5843). Se produjo [^{18}F]fluoruro (0,6 - 2,8 Ci) por el ciclotrón y se administró sobre una trampa de intercambio iónico y la columna de liberación (ORTG, Oakdale, TN). A continuación, el [^{18}F]fluoruro se eluyó en un vial cónico de 5 ml con 2 ml de un 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,-10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosano (K_{222}) y solución de carbonato de potasio (K_2CO_3) (100 mg K_{222} en 9,4 ml de ACN, 20 mg de K_2CO_3 en 0,6 ml de H_2O). El agua residual se eliminó mediante evaporación a 100 °C usando una corriente de nitrógeno y se secó mediante la destilación azeotrópica con la adición de 1 ml de ACN (3x). Se añadió solución precursora de [^{18}F]FBA (etil 4-(trimetilamoniotriflato) benzoato, 5 mg, en 0,5 ml de DMSO anhidro) al vial cónico (15 minutos, 100 °C) y seguido de 1,0 ml de hidróxido de sodio 0,5 N (NaOH) y se calentó a 100 °C durante 10 minutos. A continuación, se aspiró la solución en una jeringuilla que contenía 2 ml de IN ácido clorhídrico (HCl) y 6 ml de H_2O . El producto se atrapó en una columna C-18 SepPak (Waters, Milford, MA) y se lavó con 5 ml de H_2O y se eluyó con 2,2 ml de ACN en un vial cónico de 5 ml que contenía 50 µl de DMF. Los disolventes restantes se evaporaron dejando [^{18}F]FBA en DMF.

[^{18}F]FBA (500 mCi) se acopló a cada peptidil resina usando técnicas de acoplamiento en fase sólida. El peptidil resina (3-5 mg) se colocó en una jeringuilla frita de 1 ml y se hinchó durante 1 h en DMF antes del radiomarcado. DMF se expulsó de la jeringuilla de cada péptido y 0,5 - 1,0 Ci de [^{18}F]FBA en DMF se sacaron en cada una de las jeringuillas de péptidos para acoplarse a los péptidos unidos a resina. A continuación, se sacaron HATU (15-30 equiv. en 30 µl de DMF) y DIPEA (30-60 equiv. en 20 µl de DMF) en la jeringuilla y se hicieron reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del acoplamiento del [^{18}F]FBA se lavó la peptidil resina a conciencia con DMF (3x), MeOH (3x) y aire (3x) y se registró la radiactividad. Los productos finales se separaron de la resina mediante la adición de 250 µl de TFA/TiPS/agua 95:2.5:2.5 (v/v/v) durante 15 minutos (2x). La radiactividad se midió por un calibrador de dosis Capintec y se registró en el comienzo de la síntesis, después del acoplamiento y después de la evaporación de TFA (final de la síntesis). A continuación, las mezclas de escisión se evaporaron bajo nitrógeno y los productos finales se reconstituyeron en una mezcla de 0,5 ml de disolvente A de HPLC/ACN 50/50 (v/v). Se registraron el tiempo de síntesis total antes de la HPLC y la radiactividad del producto final. Las purificaciones se realizaron usando radio-RP-HPLC con condiciones previamente descritas para RP-HPLC. A continuación, se atrapó cada péptido [^{18}F]FBA purificado por HPLC en una C18 SepPak plus (acondicionada con 10 ml de EtOH abs, 10 ml de agua, 3 x 10 ml de aire). El SepPak se lavó con 5 ml de agua y 20 ml de aire, seguido de 250 µl de EtOH abs y 20 ml de aire. A continuación se eluyó el [^{18}F]FBA péptido de la SepPak con 1 ml de EtOH abs/ácido acético glacial 100:1 seco (50 °C, 25 minutos) y, a continuación, se formularon en 1 ml de PBS.

Estabilidad en suero de [^{18}F]FBA péptidos

Se determinó la susceptibilidad del péptido a las proteasas en suero de ratón. Se incubó [^{18}F]FBA péptido (100 µCi) formulado con 1 ml de suero de ratón durante 1 hora a 37 °C. Se tomó una alícuota de 100 µl en 1 hora y se transfirió en un Eppendorf que contenía 500 µl de EtOH abs (4 °C) para precipitar las proteínas en suero. La muestra se mezcló brevemente y se enfrió durante 3 minutos en hielo seco, seguido de centrifugación a 10.000 g durante 2,5 minutos. A continuación, se mezcló 100 µl del sobrenadante con 700 µl de disolvente A de HPLC (TFA al 0,05 %/agua) y 20 µl de ácido acético glacial (HOAc) y se analizó por radio-RP-HPLC.

Coefficiente de distribución de péptidos que se dirigen a $\alpha_v\beta_6$

El coeficiente de distribución (logD) mide la lipofilicidad del compuesto en una solución ionizada. El [^{18}F]FBA péptido formulado se diluyó en PBS hasta una concentración de 4 µCi/ml para formar la solución madre de péptido radiomarcado. Las alícuotas de 50 µl de la solución madre de péptido radiomarcado se transfirieron en un tubo

Eppendorf (1,5 ml). Se añadieron 450 µl de PBS (capa hidrófila) y 500 µl de n-octanol (capa lipófila). El Eppendorf se agitó durante 3 minutos (experimento llevado a cabo por cuadruplicado). Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 6 minutos formando dos capas separadas que consistían en la capa superior (n-octanol) y la capa inferior (PBS). Se pipetearon 100 µl de cada capa y la radiactividad en cada capa se midió y registró por un contador gamma. El logD se calcula a partir de la ecuación:

$$\log D = \frac{\log\left(\frac{\text{Recuentos por minuto de Octanol}}{\text{Recuentos por minuto de PBS}}\right)}{1}$$

II. Resultados

ELISA de [¹⁹F]FBA péptidos

La afinidad para tanto α_vβ₆ como α_vβ₃ para las secuencias de [¹⁹F]FBA péptido se midieron con ELISA. La Cl₅₀ de los péptidos para α_vβ₆ oscilaron de 1,97 nM (H-RSDLTPLFK([¹⁹F]FBA)-NH₂) a >300 nM (c(RSDLT-PLFE)K([¹⁹F]FBA)-NH₂) (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de Cl₅₀ en nM de [¹⁹F]FBA péptidos de ELISA frente a α_vβ₆, calculados por PRISM.

Secuencia	Cl ₅₀
[¹⁹ F]FBA-RSDLTPLF-NH ₂	7 nM
H-RSDLTPLFK([¹⁹ F]FBA)-NH ₂	34 nM
[¹⁹ F]FBA-RSDLTPLFK(NH ₂)-NH ₂	1,97 nM
[¹⁹ F]FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-NH ₂	40 nM
[¹⁹ F]FBA-RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	40 nM
[¹⁹ F]FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	25 nM
c(RSDLTPLFE)K([¹⁹ F]FBA)-NH ₂	>300 nM

La Cl₅₀ de todos los péptidos para α_vβ₃ era de >100 µM. La selectividad de los [¹⁹F]FBA péptidos para α_vβ₆ sobre α_vβ₃ oscilaron de 300 a 10.000 veces en favor de α_vβ₆. La ELISA de los [¹⁹F]FBA péptidos mostró alta afinidad para α_vβ₆ con una Cl₅₀ en el bajo, dígito sencillo a doble, intervalo nanomolar, con la excepción de (RSDLTPLFE)K([¹⁹F]FBA)-NH₂.

Radiomarcado en fase sólida de los péptidos que se dirigen a α_vβ₆ con [¹⁸F]FBA

[¹⁸F]FBA se sintetizó con una pureza final de un >95 % de pureza. [¹⁸F]FBA se sintetizó en un 80,5 ± 12 % de rendimiento y se confirmó que era un >95 % de pureza por la radio-RP-HPLC. Los [¹⁸F]FBA péptidos se sintetizaron con rendimientos de radiomarcado de 6,8 ± 1,0 % a 65,9 ± 5,5 % después de la corrección por desintegración desde el inicio del acoplamiento de [¹⁸F]FBA hasta el final de la evaporación de TFA (Tabla 5).

Tabla 5. [¹⁸F]FBA péptidos y sus rendimientos de radiomarcado corregidos por desintegración para el inicio del acoplamiento de [¹⁸F]FBA.

Secuencia peptídica	Rendimiento del radiomarcado
[¹⁸ F]FBA-RSDLTPLF-NH ₂	9,2 ± 4,1 %
H-RSDLTPLFK([¹⁸ F]FBA)-NH ₂	32,6 ± 1,0 %
[¹⁸ F]FBA-RSDLTPLFK(NH ₂)-NH ₂	22,4 ± 0,3 %
[¹⁸ F]FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-NH ₂	17,0 ± 7,1 %
[¹⁸ F]FBA-RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	42,2 ± 5,5 %
[¹⁸ F]FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	65,9 ± 5,5 %
c(RSDLTPLFE)K([¹⁸ F]FBA)-NH	6,8 ± 1,0 %

La adición de un PEG₁₁ aumentó los rendimientos de radiomarcado en 2 a 7 veces. Con PEG₁₁ en el extremo N en [¹⁸F]FBA-PEG₁₁-RSDLTPLF casi se dobló los rendimientos de radiomarcado desde un 9,2 % hasta un 17 %, mientras que PEG₁₁ en el extremo C aumentó los rendimientos de radiomarcado cuatro veces desde un 9,2 % hasta un 42,2 %. El péptido [¹⁸F]FBA-PEG₁₁-RSDLTPLF-PEG₁₁-NH₂ PEGilado aumento el rendimiento de radiomarcado siete veces desde un 9,2 % hasta un 65,9 %. Sin quedar ligados a teoría particular alguna, se cree que, mediante la adición de

unidades de PEG, la amina libre se extiende más desde la resina, haciéndola potencialmente más accesible para [^{18}F]FBA, aumentando así los rendimientos de radiomarcado.

Estabilidad en suero de [^{18}F]FBA péptidos

- 5 El nivel del péptido intacto se midió para cada uno de los [^{18}F]FBA péptidos después de la incubación en suero de ratón durante 1 hora (Tabla 6). El péptido no modificado [^{18}F]FBA-RSDLTPLF-NH₂ mostró un 66 % intacto en suero de ratón después de 1 hora. En general, el porcentaje de [^{18}F]FBA péptidos intactos osciló de un 18,6 a un 99,7 %.

10 **Tabla 6.** [^{18}F]FBA péptidos y su estabilidad en suero en 1 hora medida por la radio RP-HPLC.

Secuencia peptídica	Estabilidad en suero
[^{18}F]PBA-RSDLTPLP-NH ₂	66,0 %
H-RSDLTPLFK([^{18}F]FBA)-NH ₂	18,6 %
[^{18}F]FBA-RSDLTPLFK(NH ₂)-NH ₂	95,2 %
[^{18}F]FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-NH ₂	94,6 %
[^{18}F]FBA-RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	99,1 %
[^{18}F]FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	99,7 %
c(RSDLTPLFE)K([^{18}F]FBA)-NH	98,4 %

- 15 La primera modificación, NH₂-RSDLTPLFK([^{18}F]FBA)-NH₂, mostró peores resultados ya que el péptido se degradó hasta un 18,6 % después de 1 h en suero de ratón. El extremo N expuesto es susceptible a las enzimas tales como amino y endo-peptidasas, dando como resultado degradación peptídica rápida. Para el extremo N marcado con [^{18}F]FBA en [^{18}F]FBA-RSDLTPLFK(NH₂)-NH₂, casi no se observó degradación del péptido por las proteasas con un 95,2 % de péptido intacto después de 1 hora en suero de ratón.

- 20 La adición de lisina en el extremo C de H-RSDLTPLF-NH₂ parece desempeñar un papel en la reducción del reconocimiento de la proteasa de la secuencia peptídica, permitiendo potencialmente que el péptido permanezca en gran medida intacto. Igualmente, la PEGilación en el extremo N o C, o la biPEGilación mostró mejoras significativas en la estabilidad en suero con estabilidades en suero de un 94,6 %, 99,1 % y 99,7 %, respectivamente. La adición de PEG₁₁ en el extremo N o C desempeña un papel en la prevención la interacción de la proteasa; por tanto, [^{18}F]FBA-PEG₁₁-RSDLTPLF-PEG₁₁-NH₂ biPEGilado perpetuó más la tendencia de tener el mayor porcentaje del péptido intacto después de la incubación en suero de ratón durante 1 hora.

- 25 Coeficiente de distribución de péptidos que se dirigen a $\alpha_v\beta_6$

- 30 Se midió la lipofilicidad de cada uno de los péptidos radiomarcados para cada modificación. El logD osciló desde -1,86 \pm 0,26 hasta 0,45 \pm 0,03 (Tabla 7). El péptido base [^{18}F]FBA-RSDLTPLF-NH₂ tenía un valor logD inicial de 0,45, revelando una ligera lipofilicidad. Los péptidos que son lipófilos con frecuencia están asociados con el aclaramiento hepatobiliar, dando como resultado imágenes *in vivo* con mayor señal en el abdomen (Hosseinimehr et al., (2012) *Drug Discovery Today* 17(21-22): 1224-32). Todas las modificaciones redujeron la lipofilicidad, siendo la menor c(RSDLTPLFE)K([^{18}F]FBA)-NH₂ con un logD de 0,02, y siendo la mayor de la biPEGilación con un logD de -1,86. La reducción de la lipofilicidad tiene varias ventajas farmacocinéticas potenciales tales como un movimiento del aclaramiento hepatobiliar al aclaramiento renal y permitiendo la deseable rápida excreción renal, reduciendo potencialmente el fondo abdominal para la obtención de imágenes *in vivo* (Hosseinimehr et al., 2012).

Tabla 7. Valores de LogD para [^{18}F]FBA péptidos.

Secuencia peptídica	LogD
[^{18}F]FBA-RSDLTPLF-NH ₂	0,45 \pm 0,03
H-RSDLTPLFK([^{18}F]FBA)-NH ₂	-0,49 \pm 0,09
[^{18}F]FBA-RSDLTPLFK(NH ₂)-NH ₂	-1,44 \pm 0,10
[^{18}F]FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-NH ₂	-1,18 \pm 0,22
[^{18}F]FBA-RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	-1,29 \pm 0,09
[^{18}F]FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	-1,86 \pm 0,26
c(RSDLTPLFE)K([^{18}F]FBA)-NH ₂	0,02 \pm 0,04

En conclusión, este ejemplo demuestra que un péptido PEGilado biterminal de la presente invención que tiene la estructura PEG₁₁-RSDLTPLF-PEG₁₁ proporciona ventajosamente alta selectividad para la integrina $\alpha_v\beta_6$ y mejorada la estabilidad en suero, rendimientos del radiomarcado y lipofilicidad cuando se compara con la secuencia peptídica parental, una versión cíclica del péptido y versiones PEGiladas N o C-terminales individuales de la invención.

5

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende:

- 5 (a) un péptido que se une específicamente a una integrina $\alpha_v\beta_6$, en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos RGD $X_1X_2X_3$, en donde X_1 y X_2 son aminoácidos independientemente seleccionados y X_3 es L o I;
 (b) una primera fracción de polietilenglicol (PEG) covalentemente unida al extremo amino del péptido; y
 (c) una segunda fracción de PEG covalentemente unida al extremo carboxilo del péptido,

10 en donde la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG tienen cada una un peso molecular de menos de aproximadamente 3.000 daltons (Da).

2. El conjugado de la reivindicación 1, en donde

- 15 (a) X_1 es Q, X_2 es V, y X_3 es L; y/o
 (b) el péptido comprende la secuencia de aminoácidos RGD $X_1X_2X_3$ AQ X_6 , en donde X_6 es R o K.

3. El conjugado de las reivindicación 1 o 2, en donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en NAVPNLRGDLQVLAQRVART (A20FMDV2 K16R) y
 20 NAVPNLRGDLQVLAQKVART (A20FMDV2).

4. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido se une a la integrina y un receptor que se expresa conjuntamente con la integrina; opcionalmente en donde el receptor que se expresa conjuntamente con la integrina es CXCR4.

25

5. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde

- (a) el conjugado comprende además un agente de obtención de imágenes o un agente terapéutico covalentemente unido al péptido, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG;
 30 (b) el péptido tiene entre aproximadamente 8 y aproximadamente 45 aminoácidos o entre aproximadamente 8 y aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, o el péptido tiene entre aproximadamente 21 o más aminoácidos de longitud;
 (c) la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG se seleccionan independientemente del grupo que consiste en PEG₁₂ (PEG 800), PEG₂₈ (PEG 1500) y (PEG₂₈)₂ (PEG 1500x2);
 35 (d) la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG son iguales; opcionalmente en donde la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG son ambas PEG₂₈ (PEG 1500); y/o
 (e) la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG son fracciones de PEG monodispersas que tienen una longitud de cadena definida opcionalmente en donde las fracciones de PEG monodispersas tienen más de aproximadamente un 95 % de pureza de oligómero.

40

6. El conjugado de la reivindicación 5, en donde

- (a) el agente de obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, biotina, un fluoróforo, una proteína fluorescente, un anticuerpo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y combinaciones de los mismos; opcionalmente en donde el radionúclido

45

(i) se selecciona del grupo que consiste en ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸F, ¹⁹F, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹²⁴I, ¹²⁵I, y ¹³¹I; y/o

50

(ii) se une a través de un grupo prostético al péptido, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG;

(b) el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, un péptido proapoptótico, una nanopartícula, un agente quimioterapéutico, una nanogotita, un fármaco liposómico, una citocina y combinaciones de los mismos; opcionalmente en donde

55

(i) el radionúclido

- se selecciona del grupo que consiste en ⁹⁰Y y ¹⁷⁷Lu; y/o
- se une a través de un agente quelante al péptido, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG;

60

(ii) el péptido proapoptótico

- comprende D(KLAKLAK)₂; y/o
- se une a través de un enlazador de glicina al péptido, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG;

65

- (iii) la nanopartícula comprende PEG^{5K}CA₈ cargada con un agente quimioterapéutico; y/o
- (iv) el agente quimioterapéutico es paclitaxel (PTX).

7. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conjugado comprende además un motivo de unión a albúmina covalentemente unido al péptido, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG; opcionalmente en donde el motivo de unión a albúmina es ácido 4-(4-iodofenil)butírico.

8. Una composición que comprende un conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una pluralidad de los mismos; opcionalmente en donde

- (a) fracciones de PEG monodispersas que tienen una longitud de cadena definida están presentes en la pluralidad de conjugados; y/o
- (b) la pluralidad de conjugados se ligan entre sí para formar un conjugado multimérico; opcionalmente en donde

- (i) el conjugado multimérico es un dímero o un tetrámero de la pluralidad de conjugados; y/o
- (iii) la pluralidad de conjugados se ligan entre sí en la segunda fracción de PEG de cada conjugado a través de al menos un residuo de lisina.

9. La composición de la reivindicación 8, en donde la composición comprende además un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. Un kit para el diagnóstico por imágenes o la terapia, comprendiendo el kit:

- (a) un conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición de la reivindicación 8 o 9; y
- (b) direcciones para su uso del conjugado o la composición en obtención de imágenes o terapia.

11. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición de la reivindicación 8 o 9 para su uso en un método para la obtención de imágenes *in vivo* de un tejido diana que contienen integrina $\alpha_v\beta_6$, comprendiendo el método:

- (a) administrar a un sujeto que necesite dicha obtención de imágenes el conjugado o la composición, en donde un agente de obtención de imágenes está unido covalentemente al péptido, la primera fracción de PEG y la segunda fracción de PEG; y
- (b) detectar el conjugado para determinar dónde se concentra el conjugado en el sujeto.

12. El conjugado o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde

- (a) el tejido diana es un tejido canceroso o un órgano; en donde opcionalmente el tejido canceroso está asociado al cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata o carcinoma oral de células escamosas;
- (b) el agente de obtención de imágenes es un radionúclido, y en donde la radiación del radionúclido se usa para determinar dónde se concentra el conjugado en el sujeto;
- (c) el conjugado se detecta por imágenes por resonancia magnética (MRI), espectroscopia de resonancia magnética (MRS), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), tomografía por emisión de positrones (PET) u obtención de imágenes ópticas; y/o
- (d) el conjugado se detecta para el diagnóstico o el pronóstico de una enfermedad o trastorno mediado por la integrina; opcionalmente en donde la enfermedad o trastorno:

- (i) está asociado a la expresión, sobreexpresión o activación de la integrina; y/o
- (ii) una enfermedad o trastorno mediado por integrina $\alpha_v\beta_6$.

13. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición de la reivindicación 8 o 9, para su uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por integrina $\alpha_v\beta_6$ en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método:

administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado o composición, en donde un agente terapéutico está unido covalentemente al péptido, la primera fracción de PEG o la segunda fracción de PEG.

14. El conjugado o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde

- (a) la enfermedad o el trastorno está asociado a la expresión, sobreexpresión o activación de la integrina;
- (b) la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en cáncer, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema de pulmón y dermatopatía de herida crónica;
- (c) la enfermedad o trastorno es cáncer de pancreático, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata o carcinoma oral de células escamosas; y/o
- (d) la cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado o la composición es una cantidad suficiente para la

administración objeto del agente terapéutico a una célula que expresa la integrina.

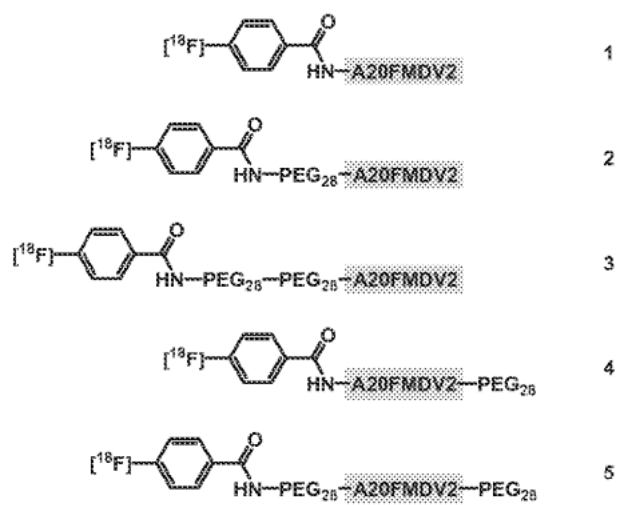


FIG. 1

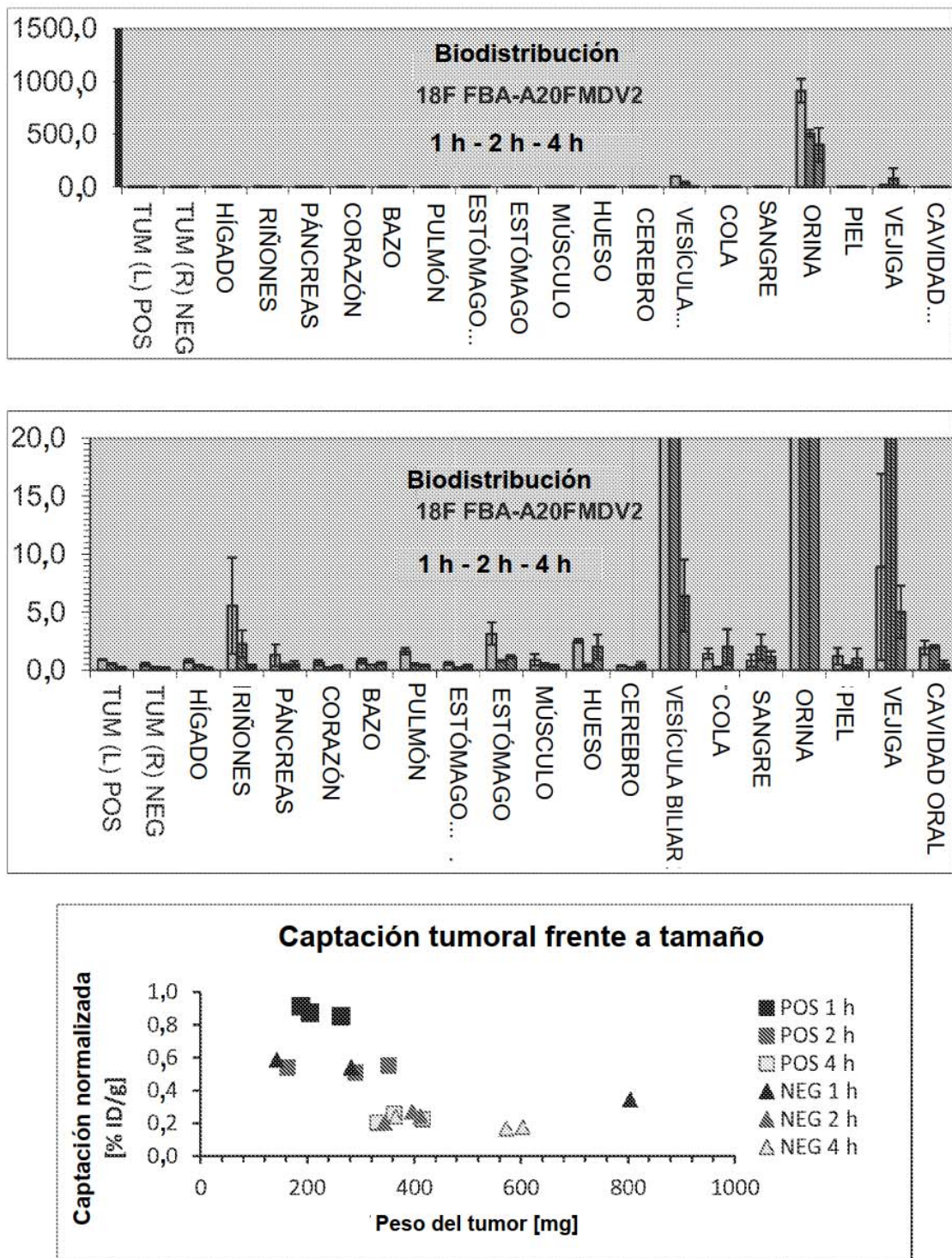


FIG. 2

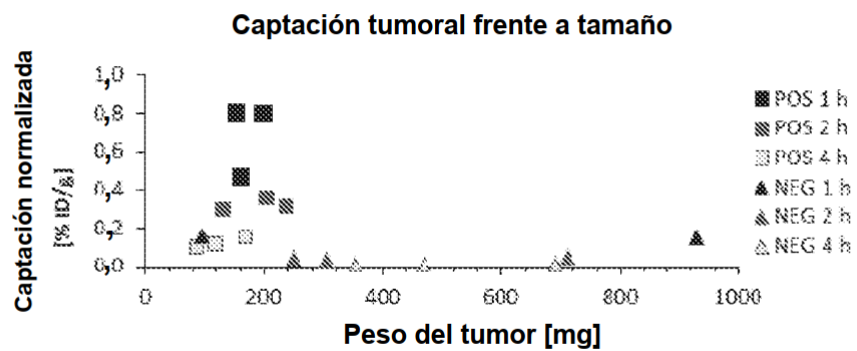
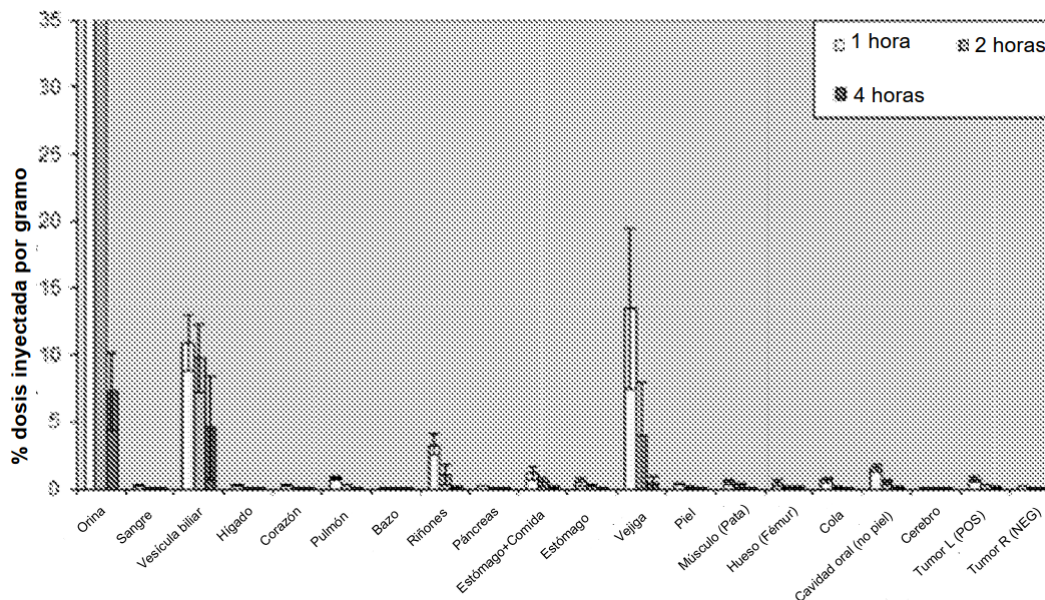
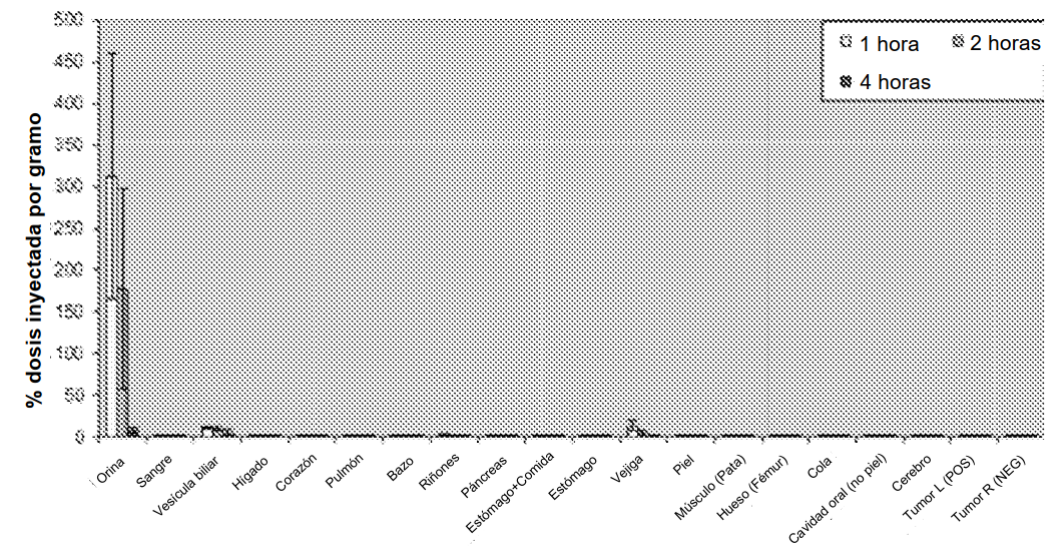


FIG. 3

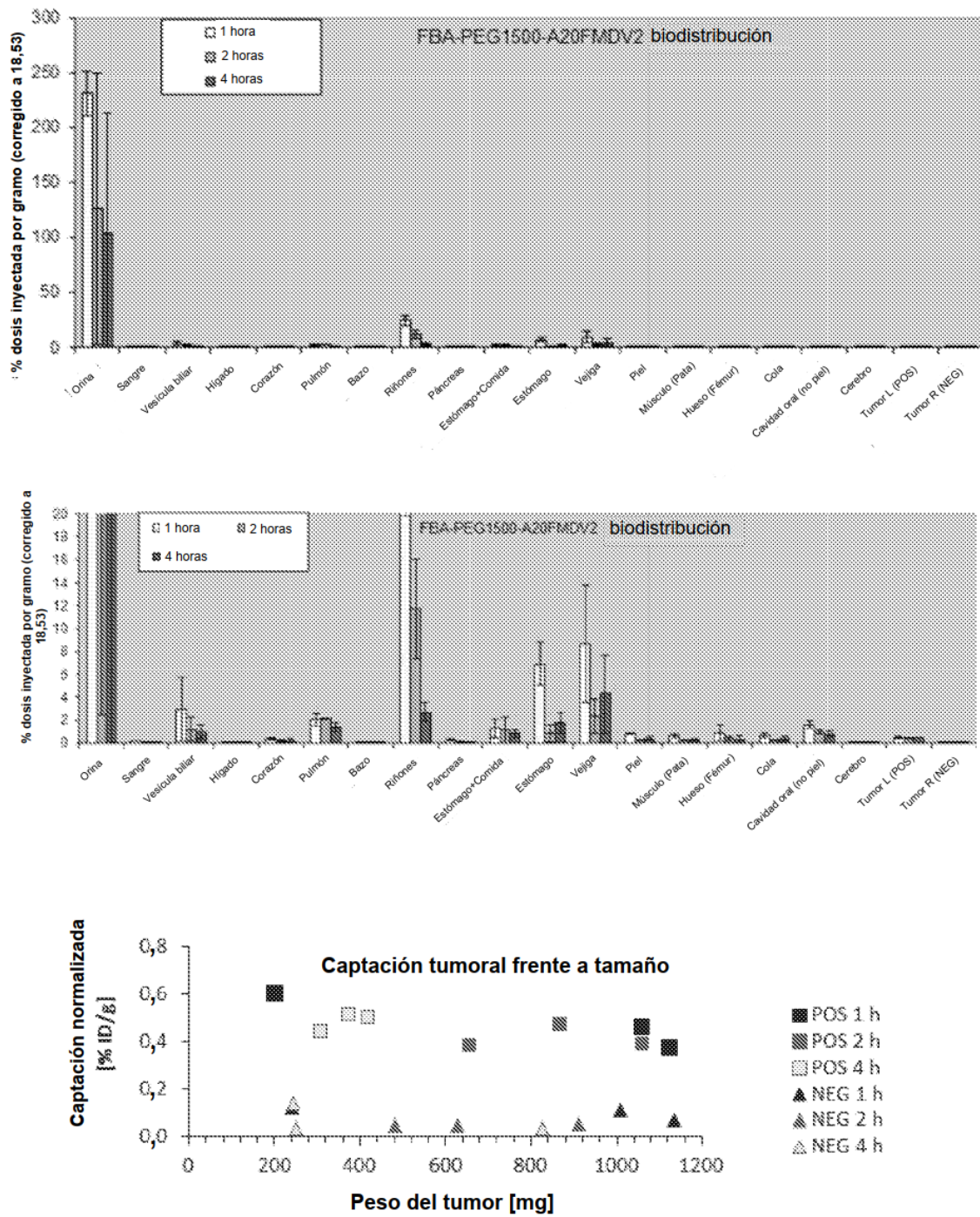


FIG. 4

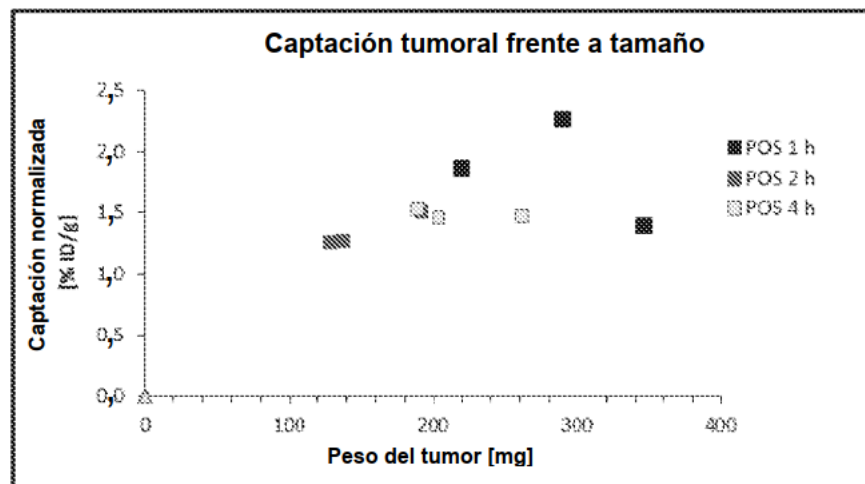
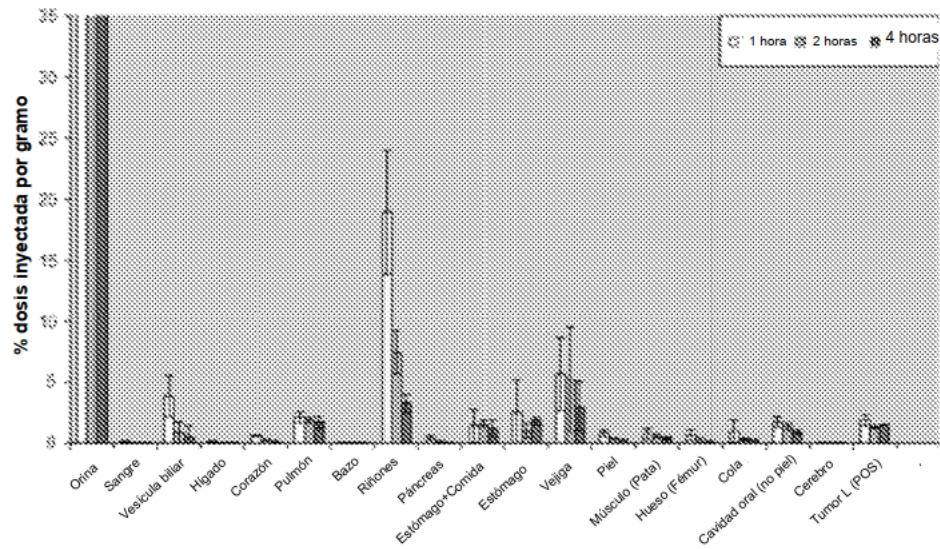
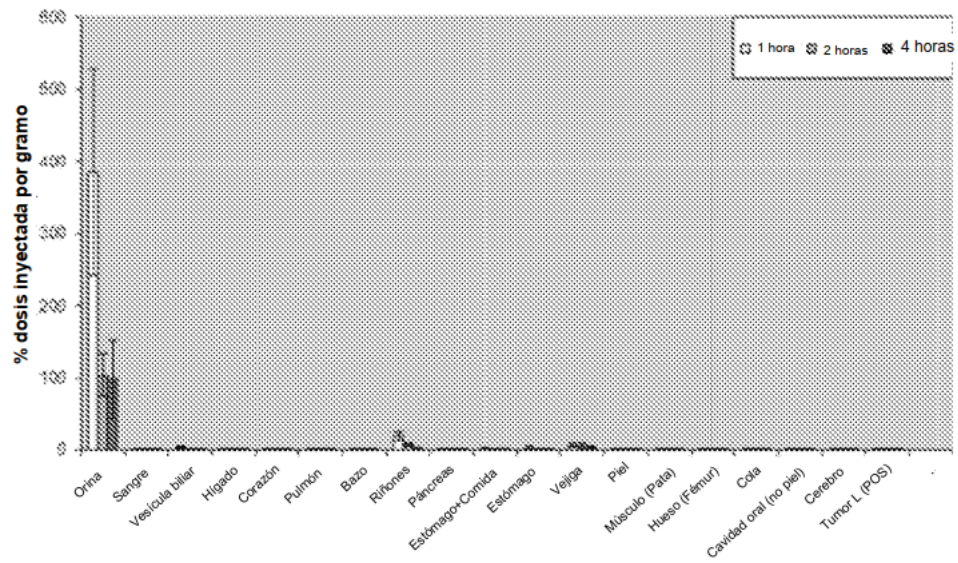


FIG. 5

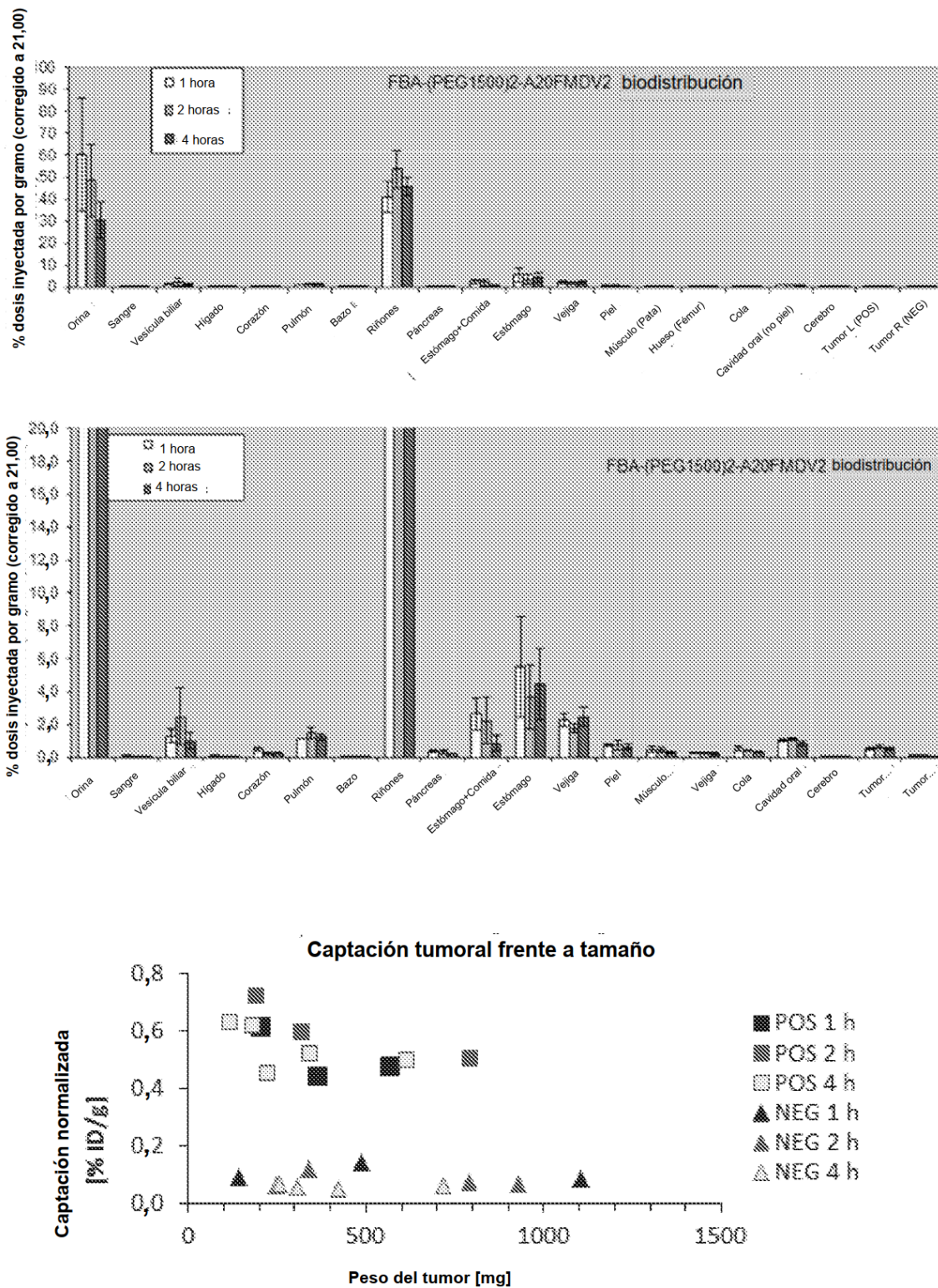


FIG. 6

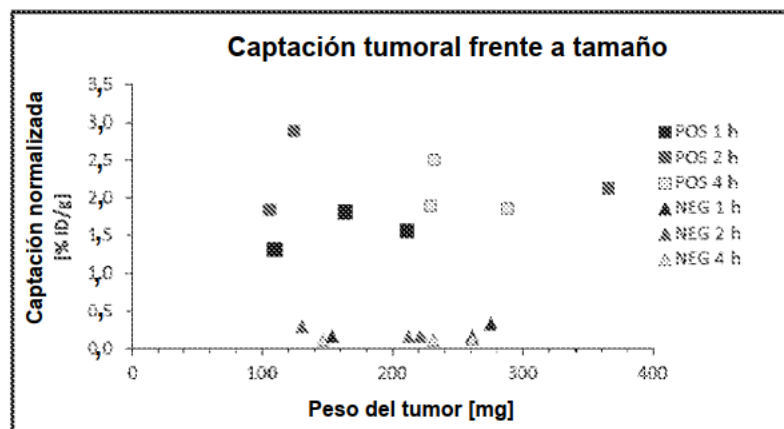
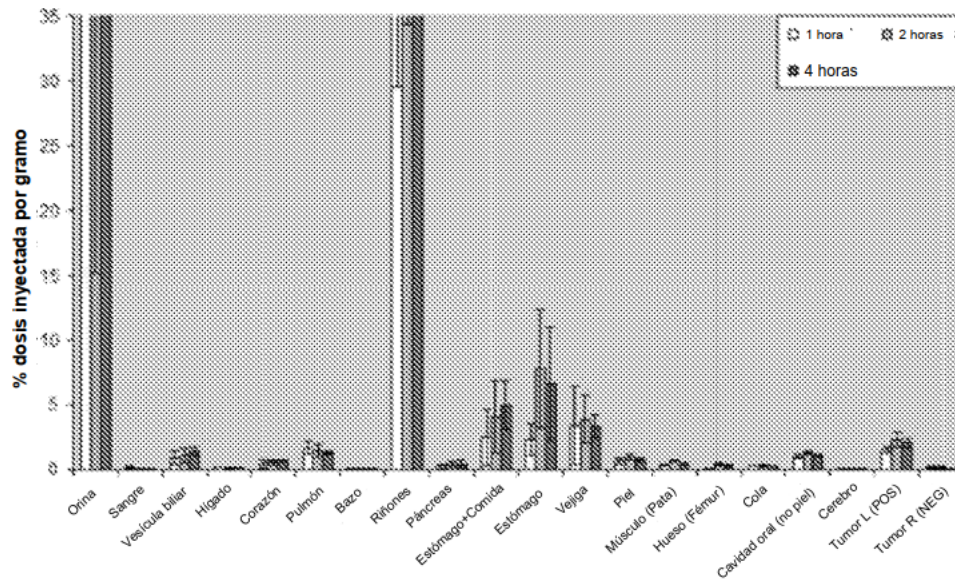
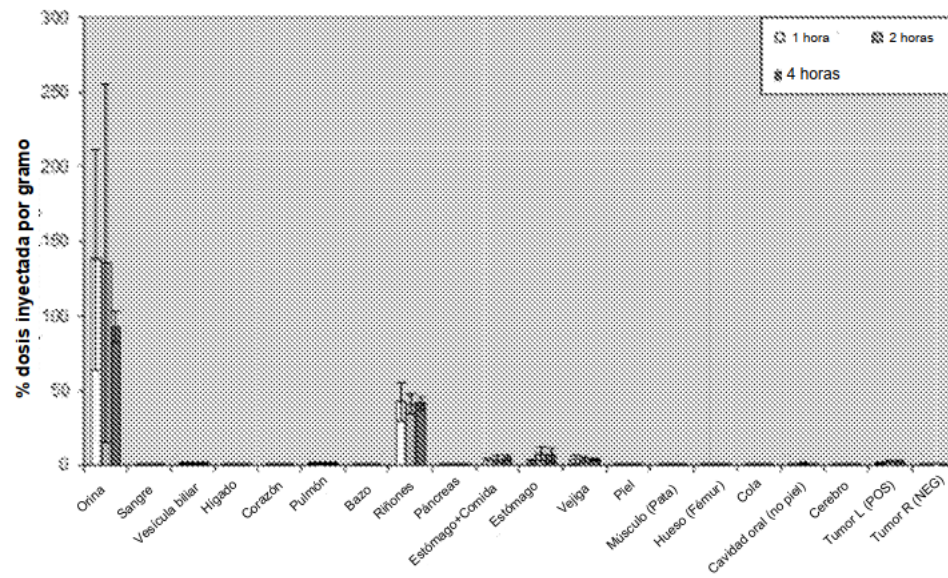


FIG. 7

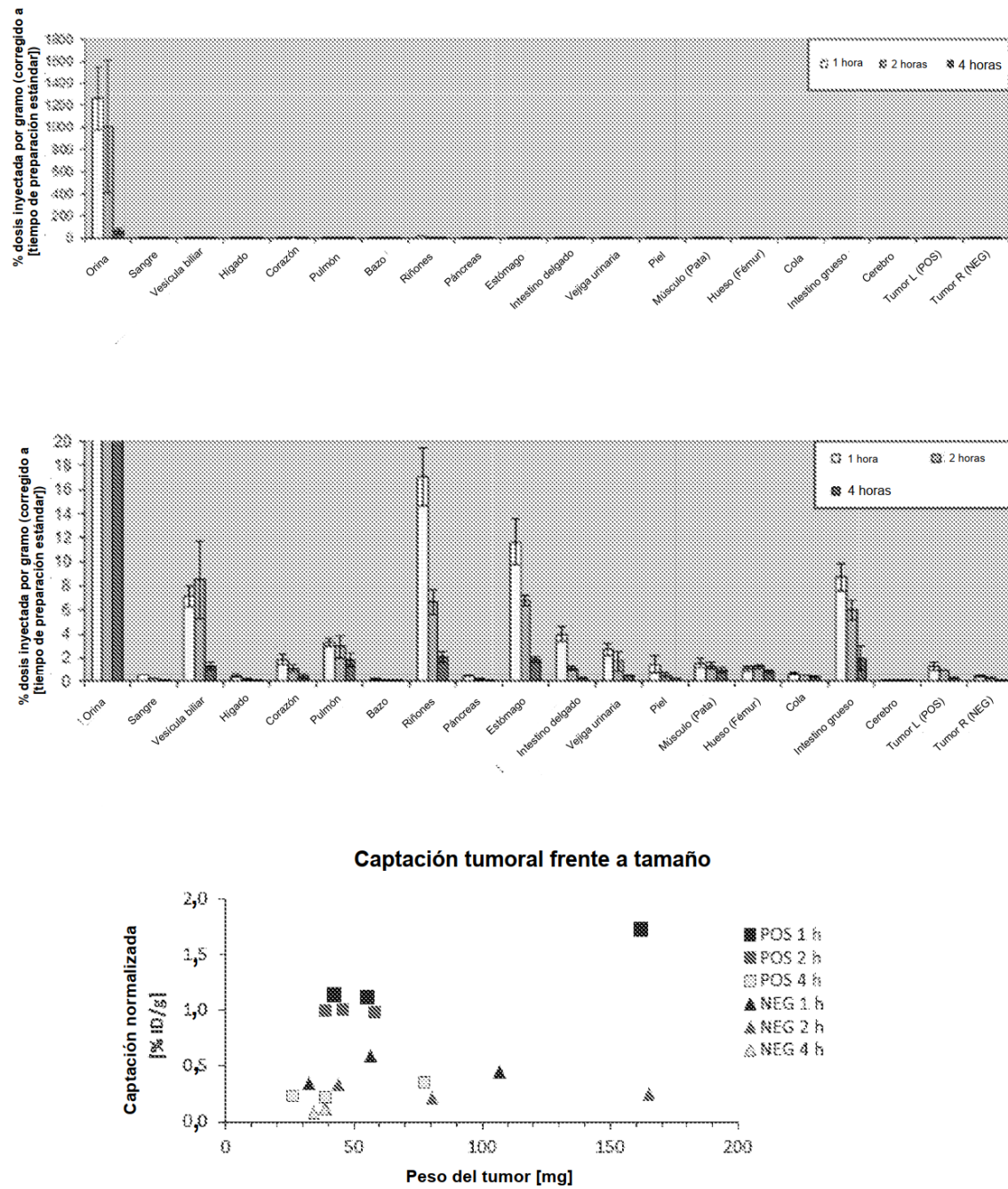
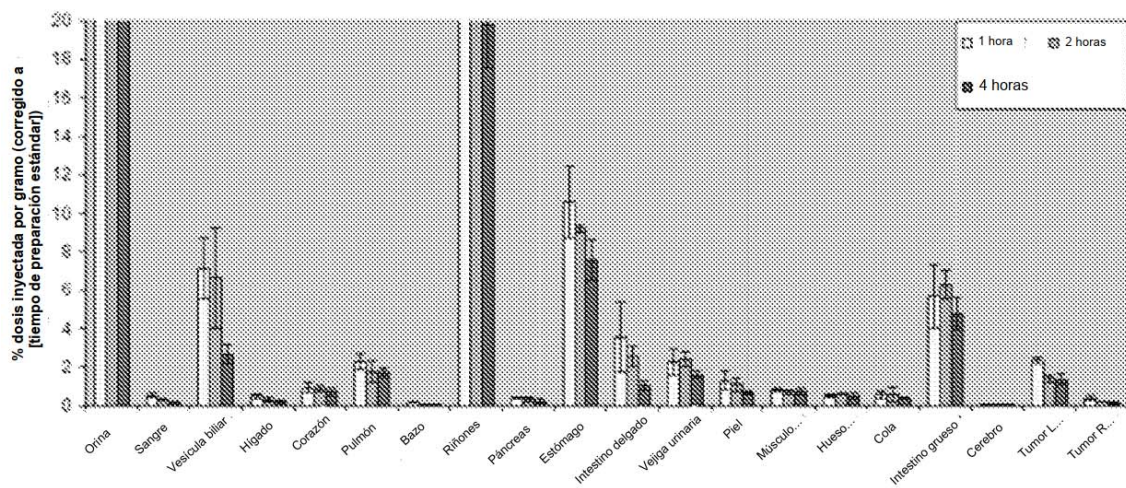
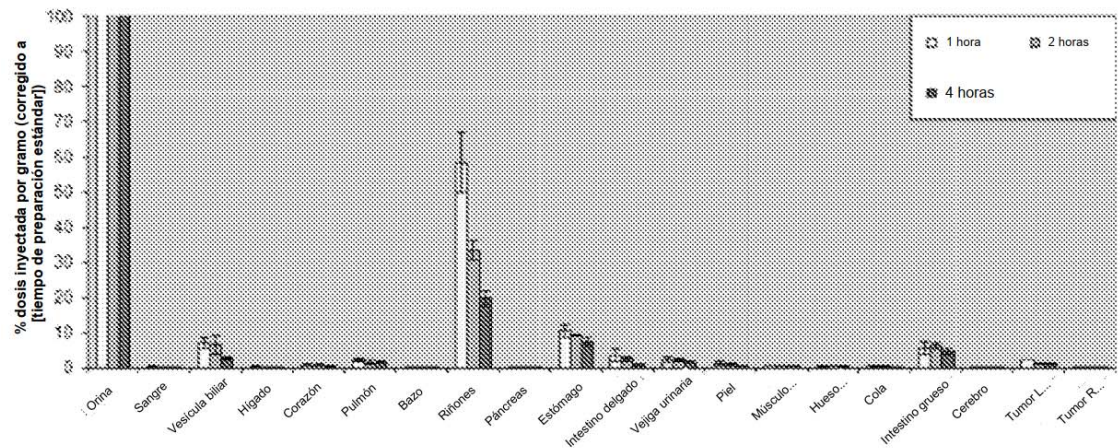


FIG. 8



Captación tumoral frente a tamaño

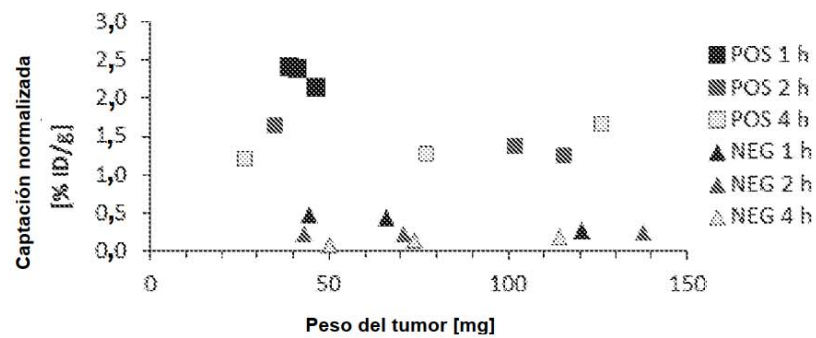


FIG. 9

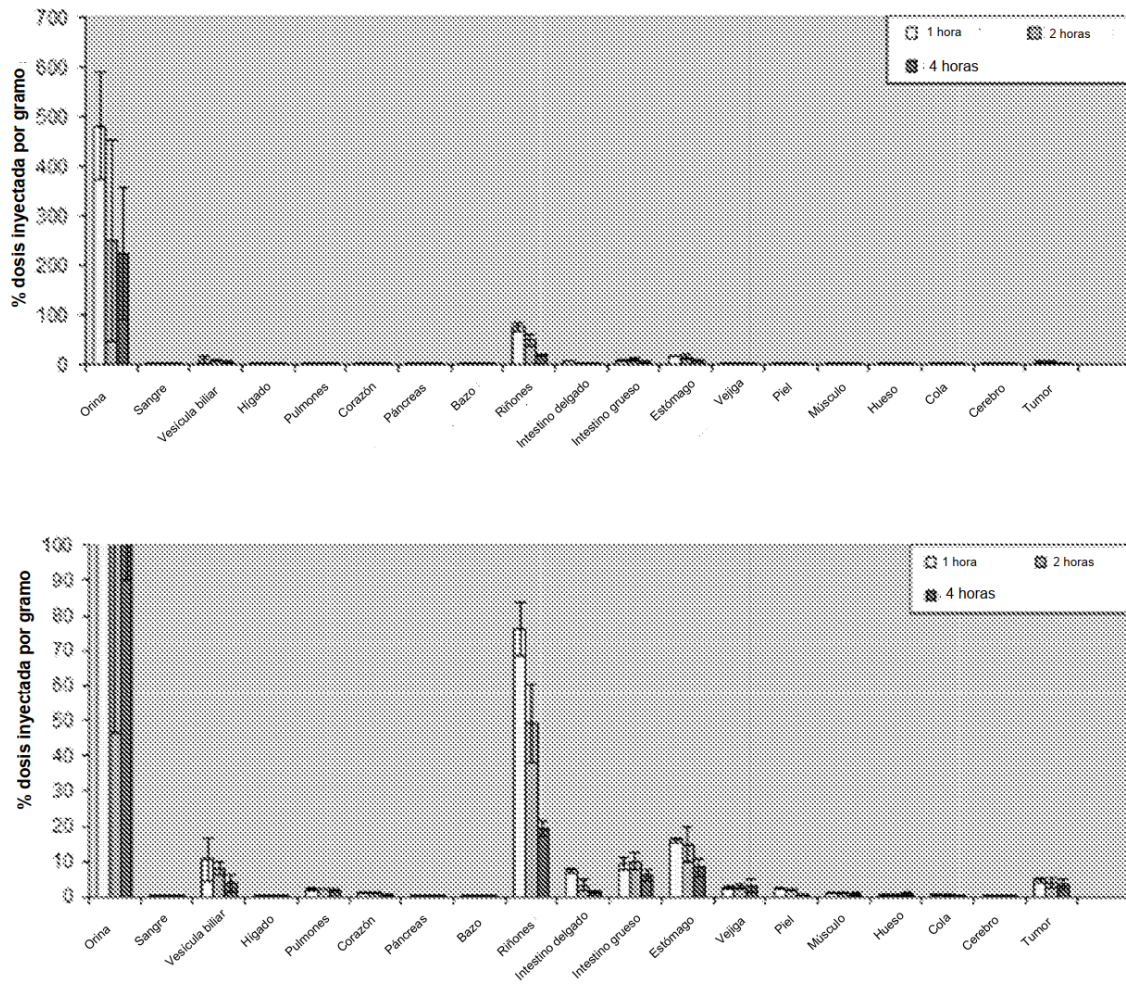


FIG. 10

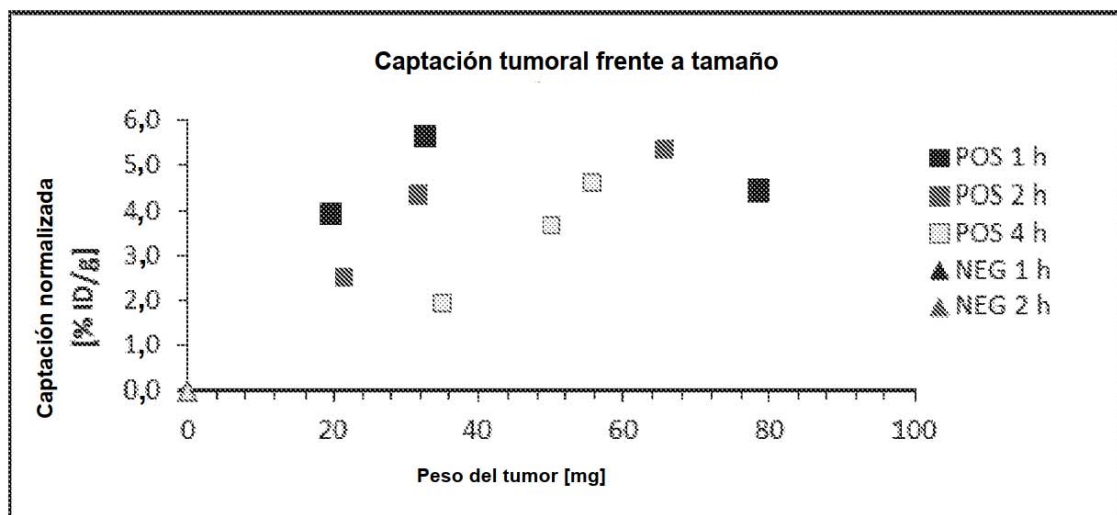
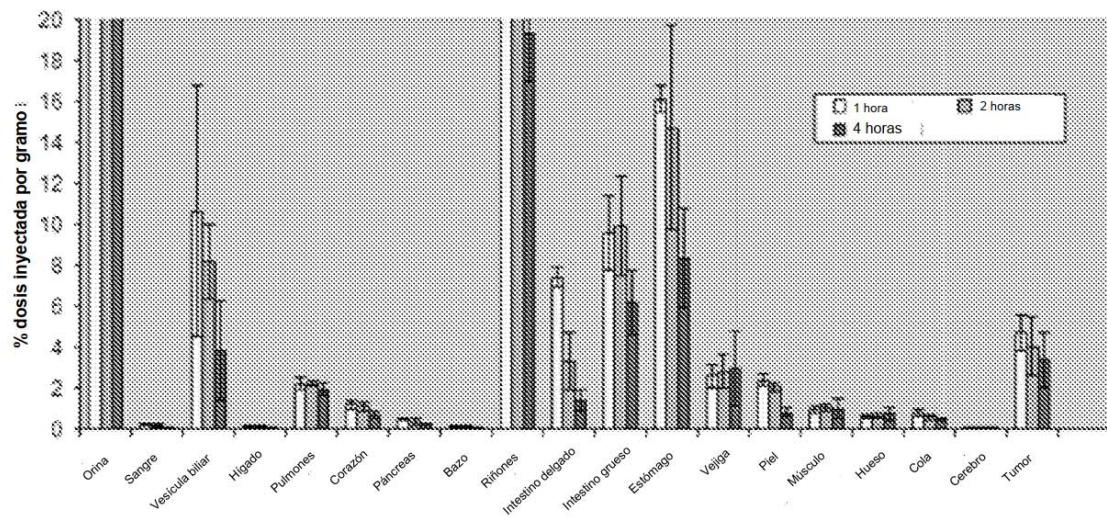


FIG. 10 (cont.)

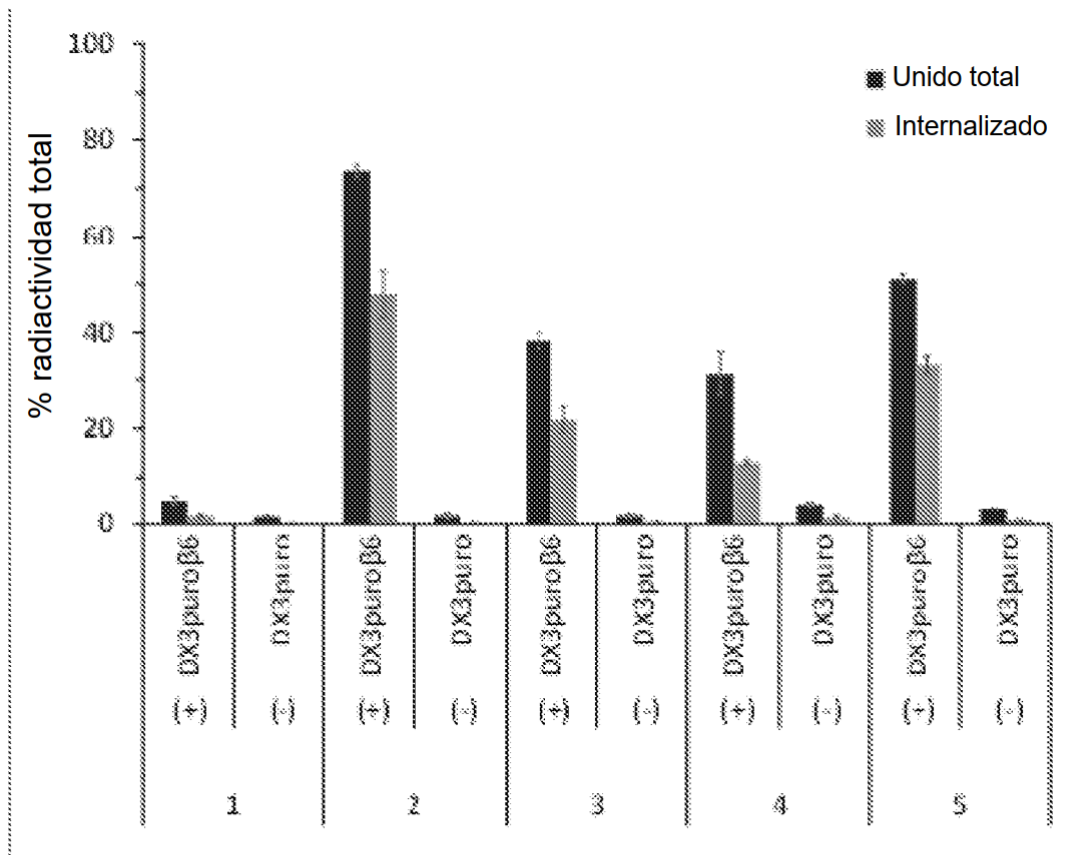
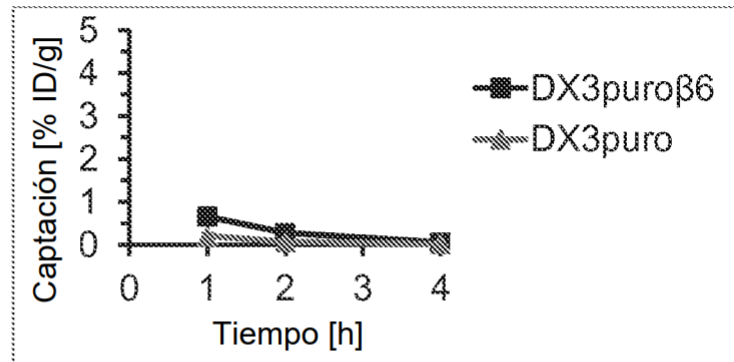
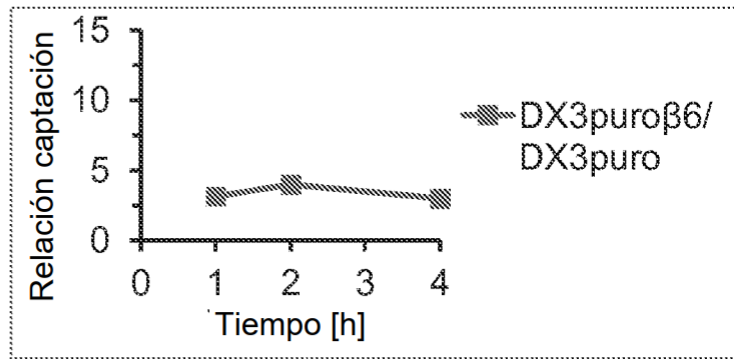


FIG. 11

A



B



C

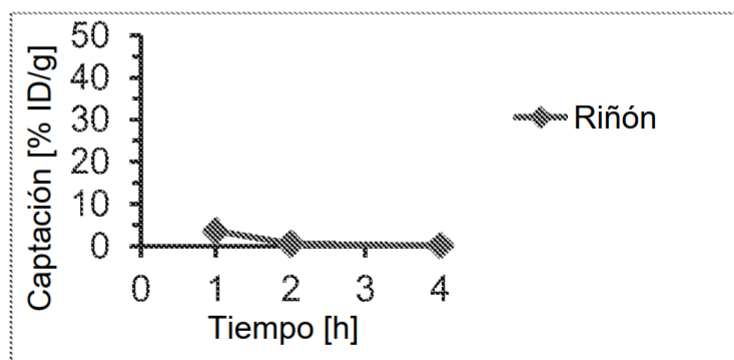
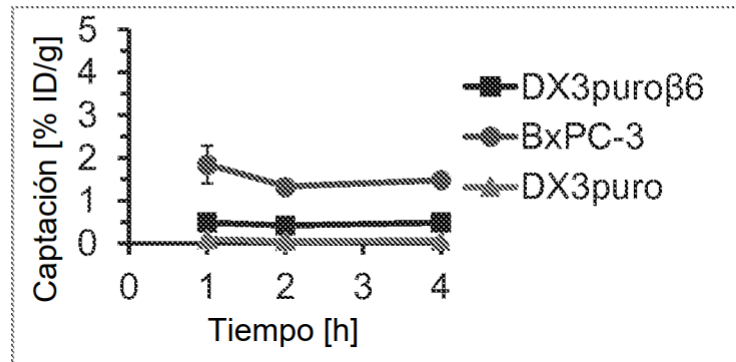
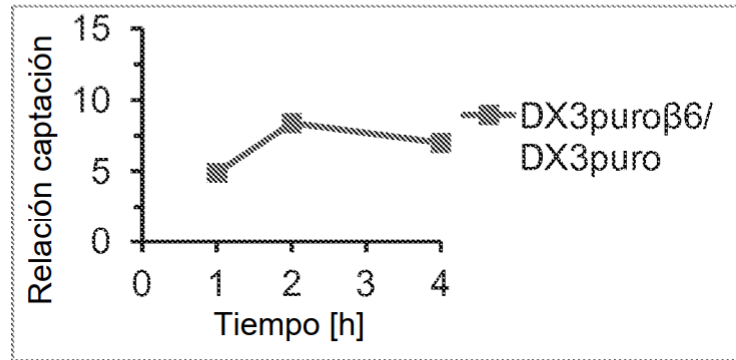


FIG. 12

A



B



C

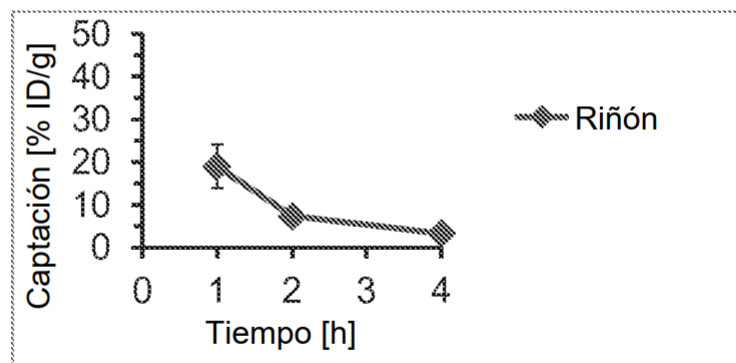
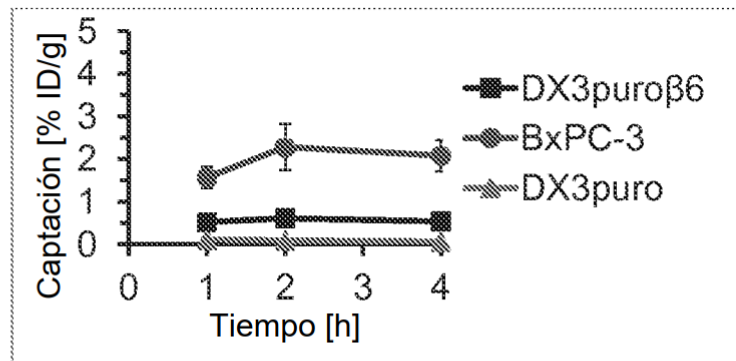
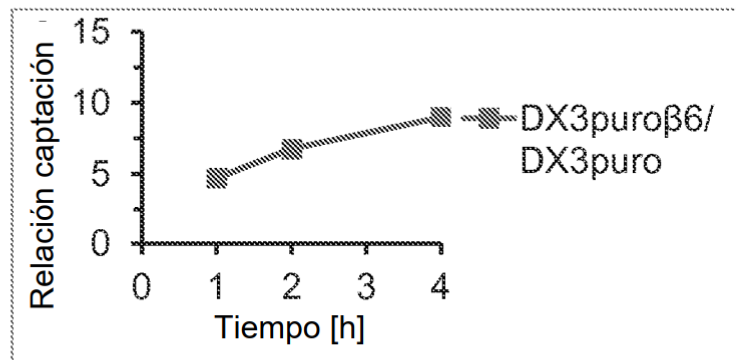


FIG. 13

A



B



C

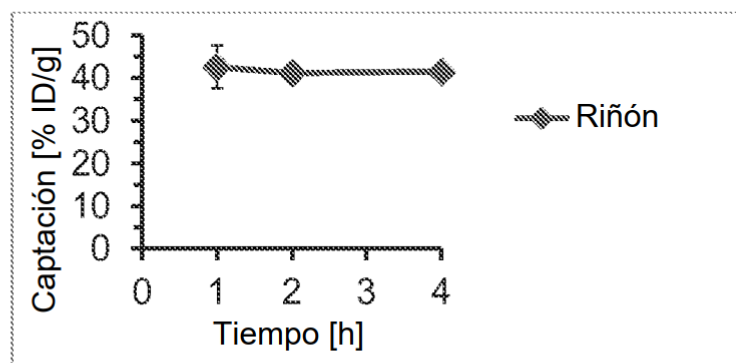
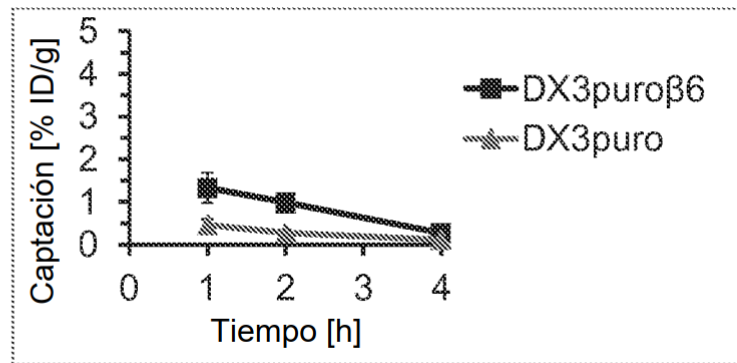
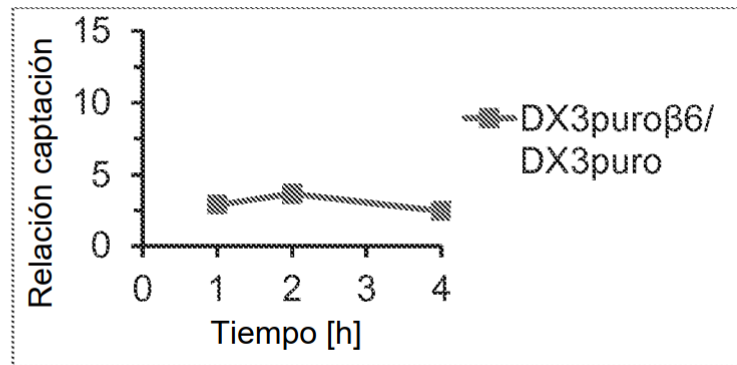


FIG. 14

A



B



C

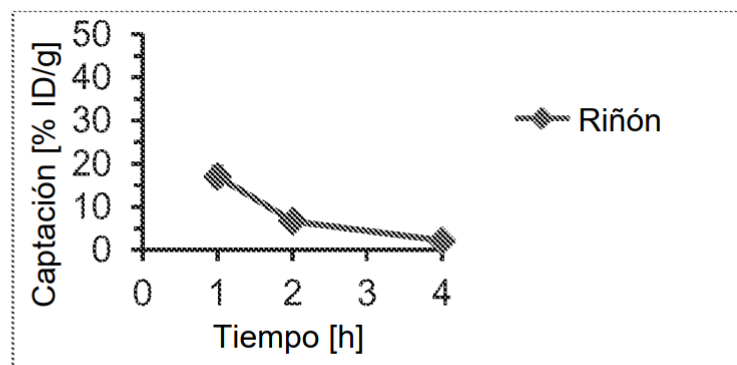
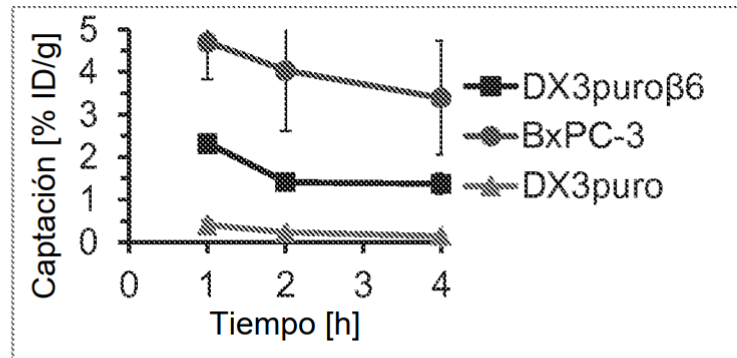
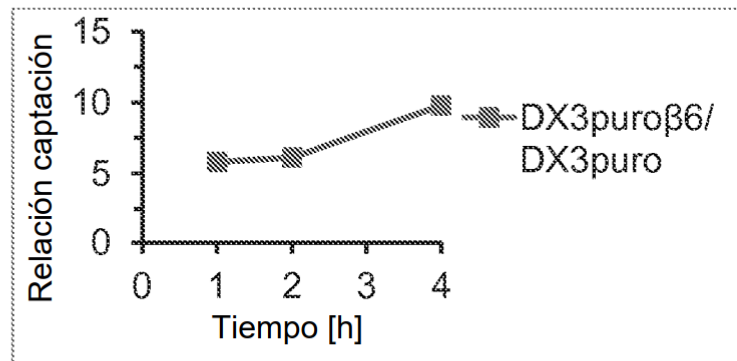


FIG. 15

A



B



C

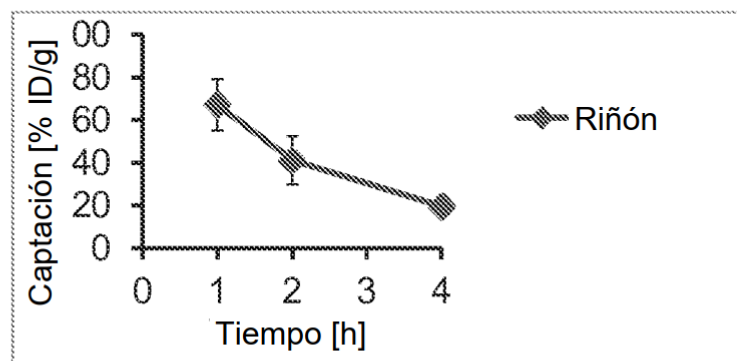


FIG. 16

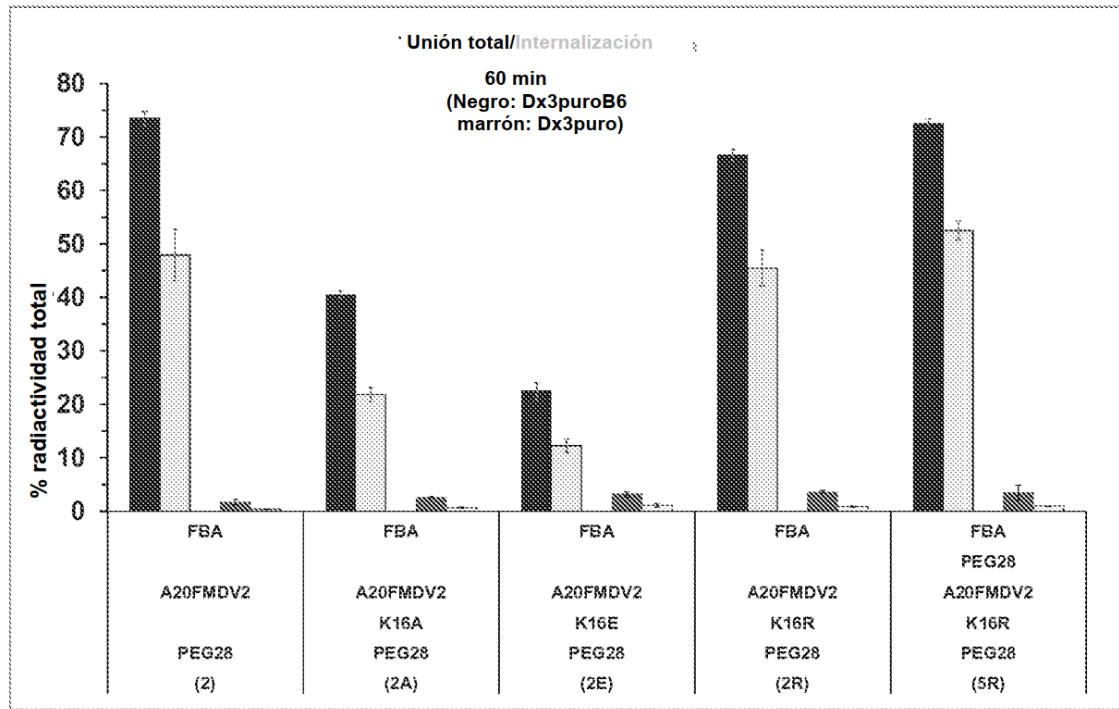
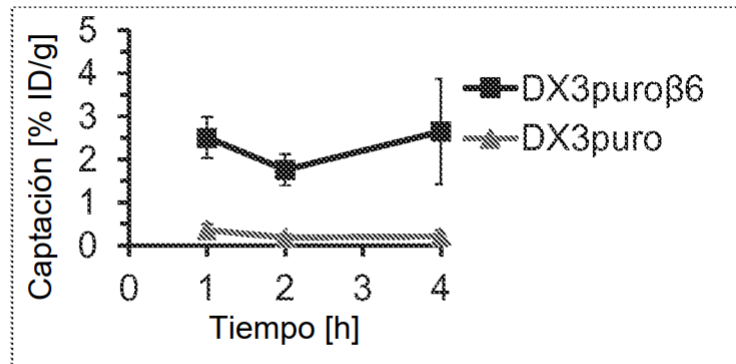
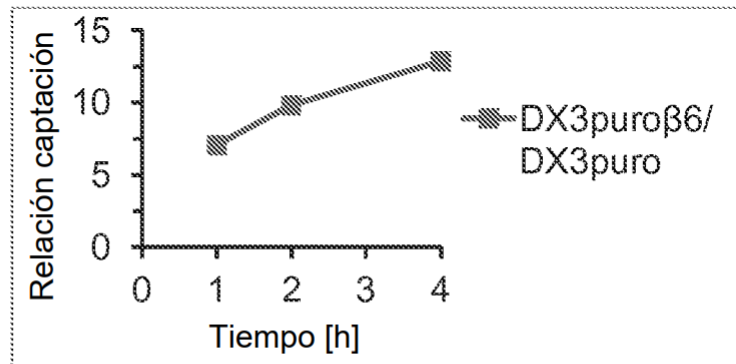


FIG. 17

A



B



C

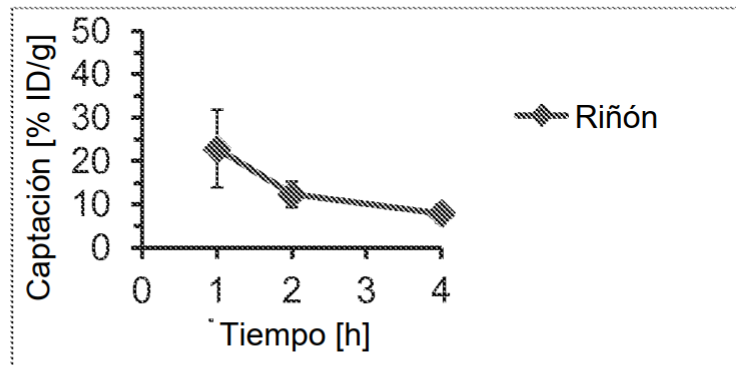


FIG. 18

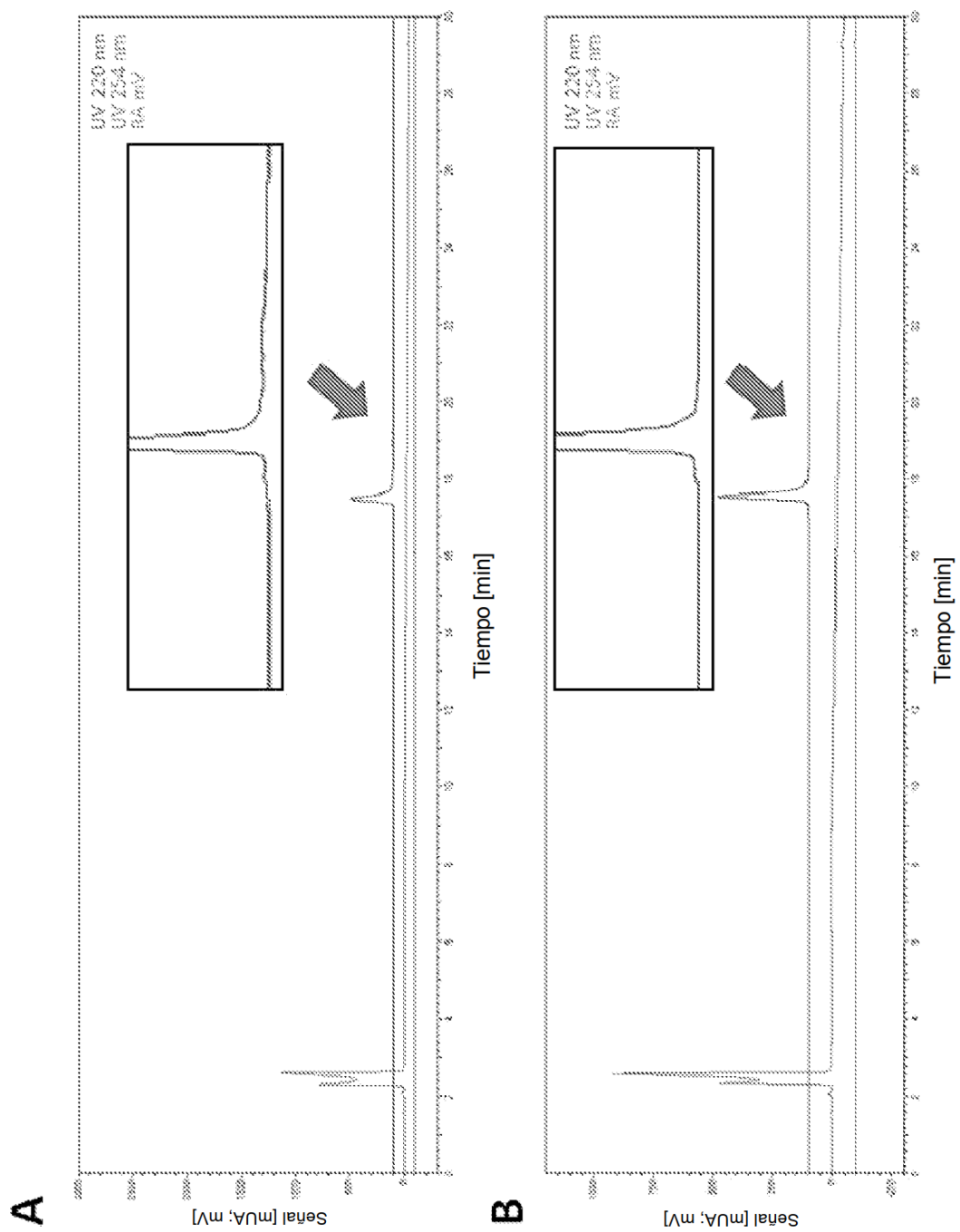


FIG. 19

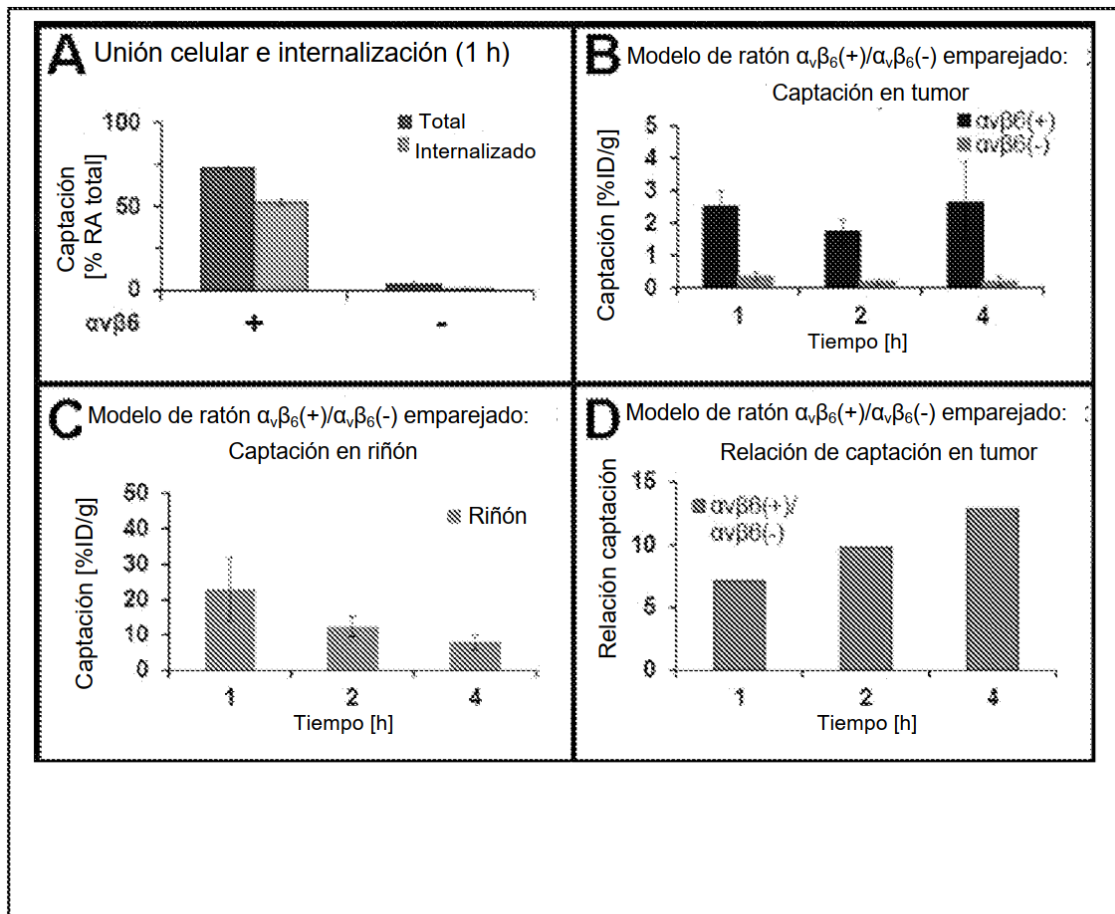


FIG. 20

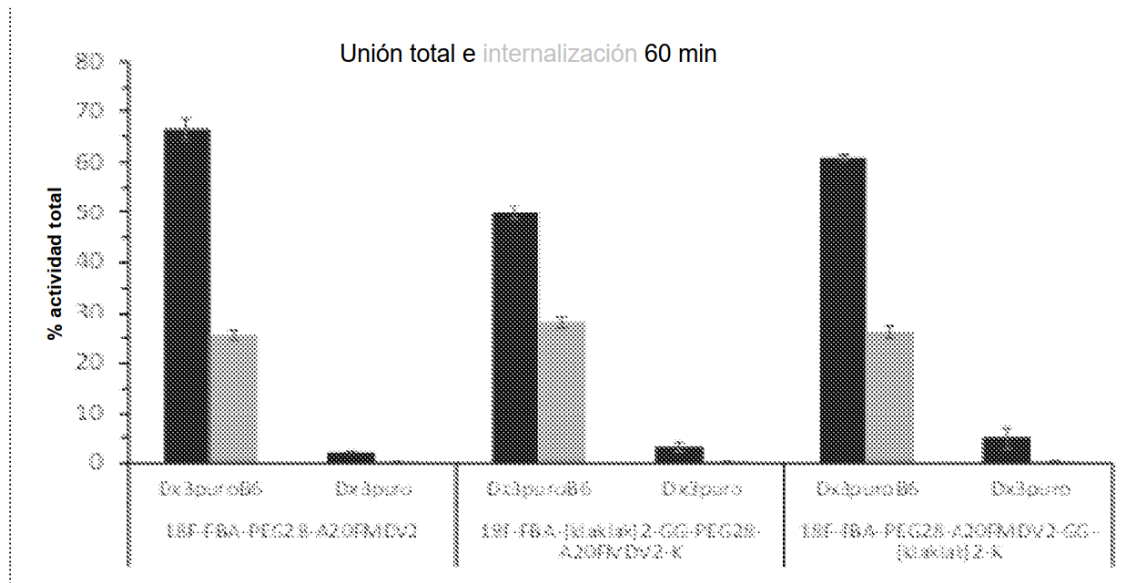


FIG. 21

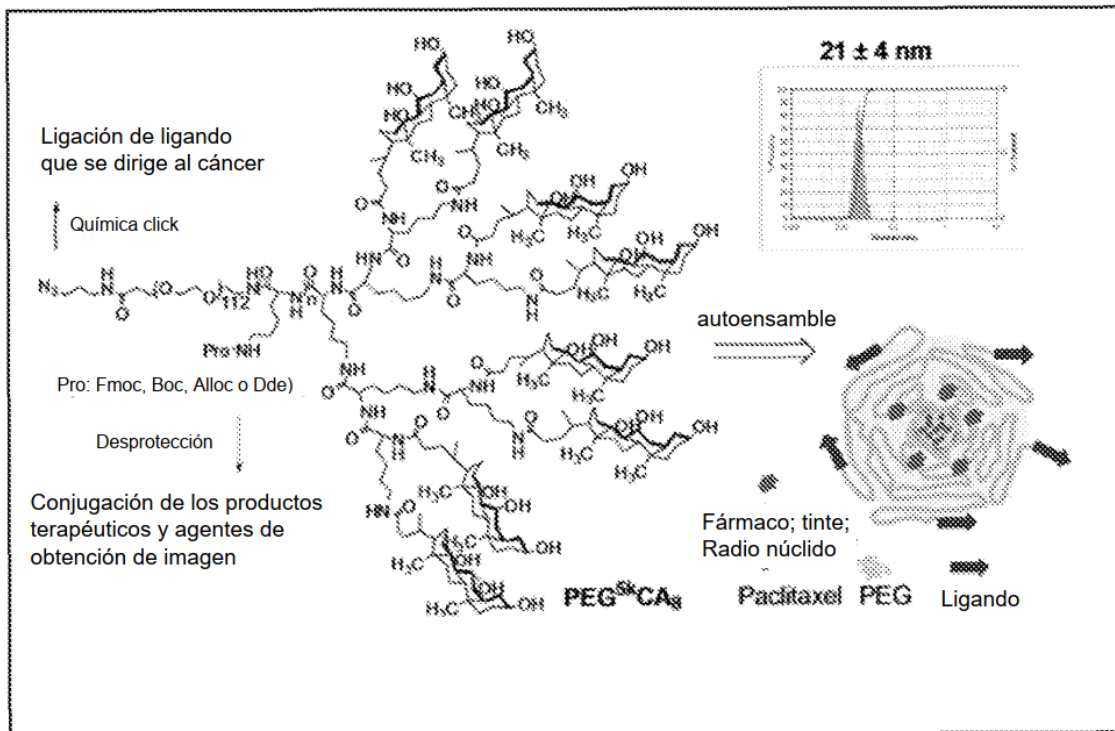


FIG. 22

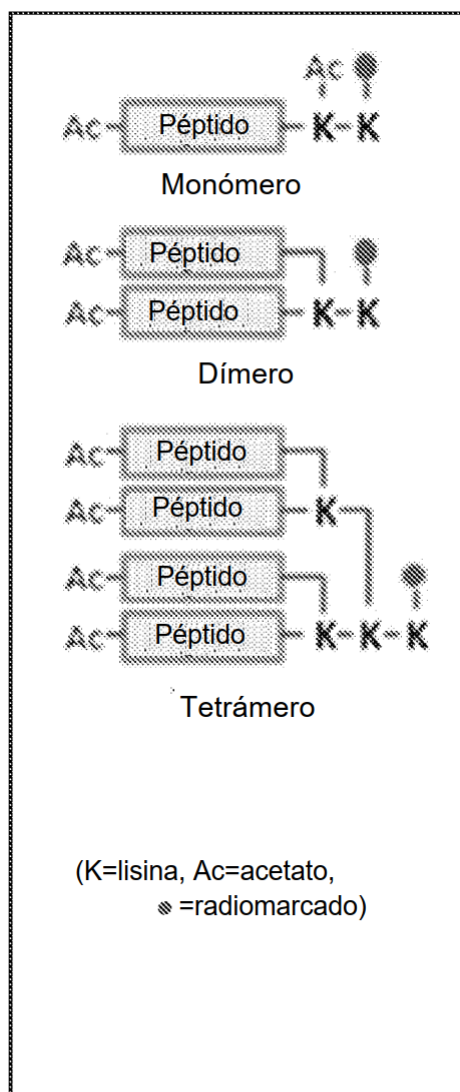


FIG. 23

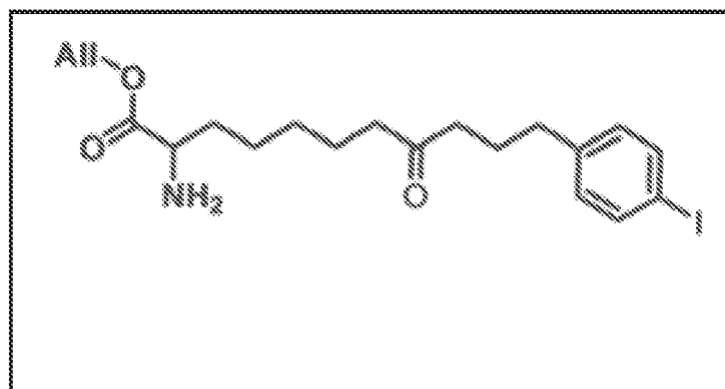


FIG. 24

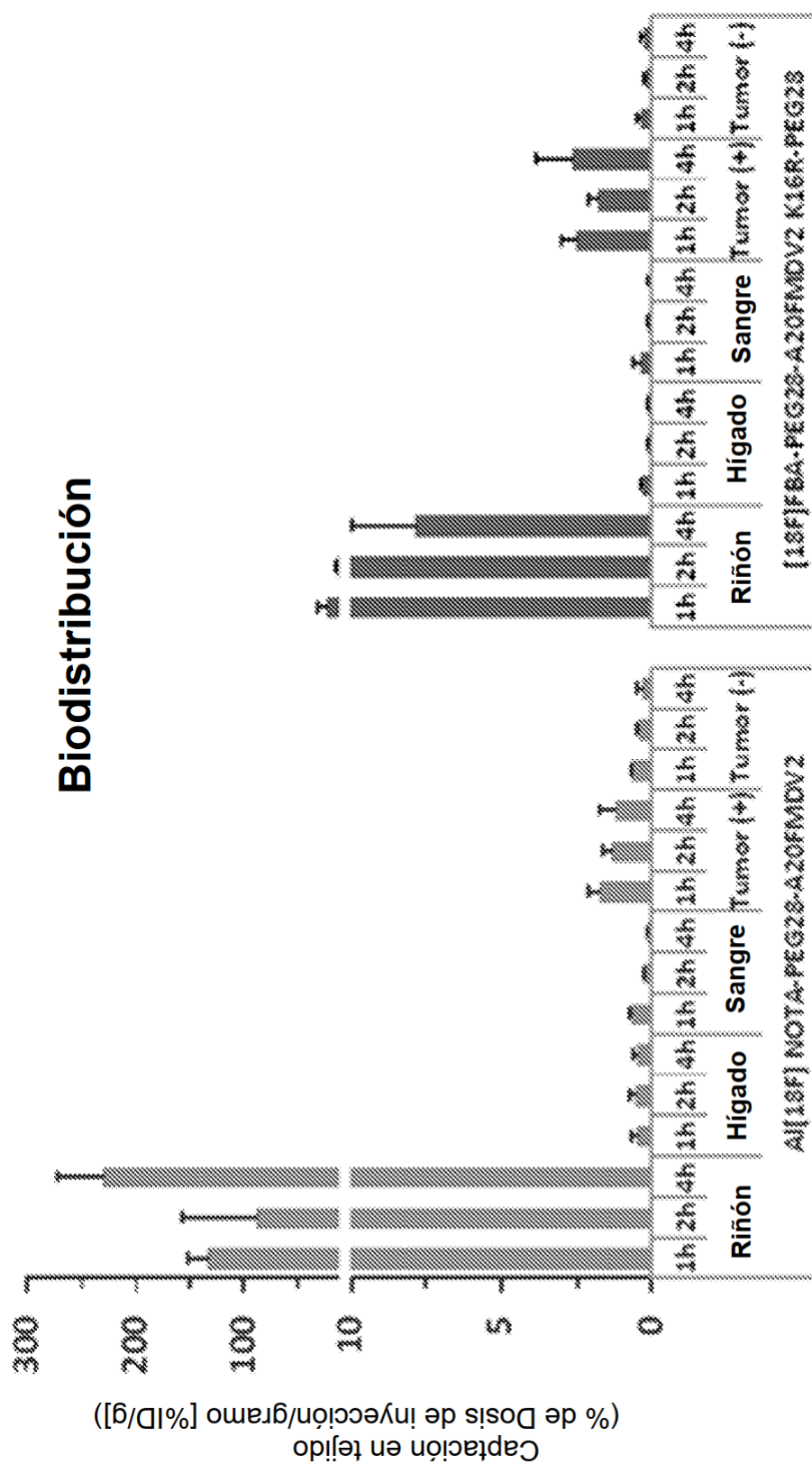


FIG. 25

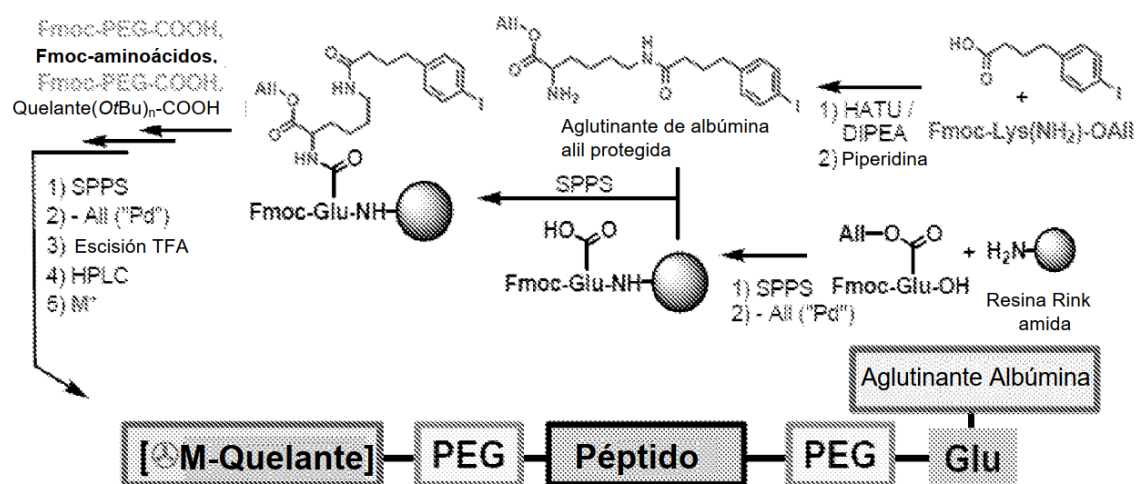


FIG. 26

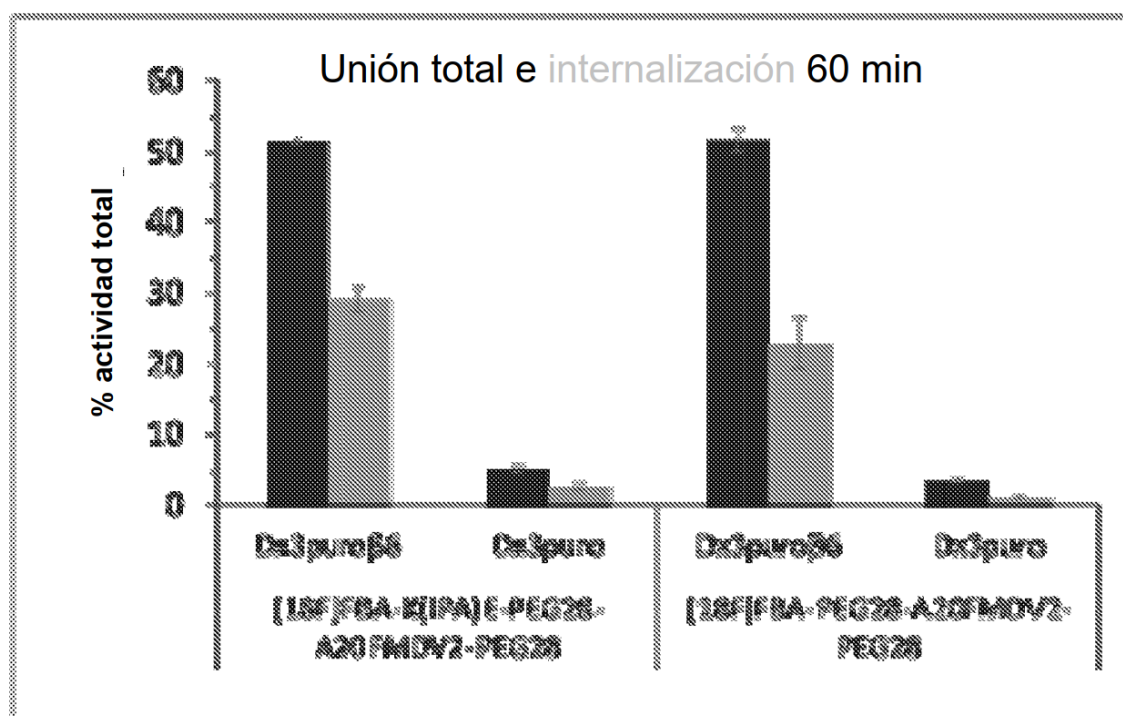


FIG. 27

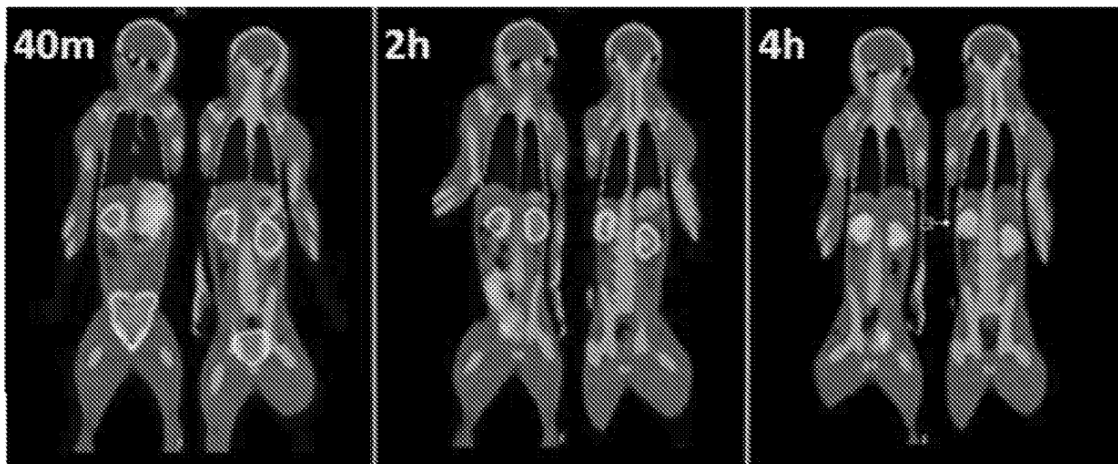


FIG. 28