

PÉPTIDO Y CONJUGADO QUE CONTIENE DICHO PÉPTIDO

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un péptido, un conjugado que contiene dicho péptido y una carga útil (también denominado a veces "conjugado peptídico", "complejo peptídico", o simplemente "conjugado"), y al uso del péptido o conjugado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

CA9 (Anhidrasa carbónica IX, anhidrasa carbónica-9) es una de las 15 anhidrasas carbónicas y es una proteína transmembrana homodimérica localizada en la membrana celular (NPL 1). Aquí, CA9 tiene tres dominios: un dominio catalítico, un dominio similar a proteoglicano, y un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. Como una de sus funciones, el dominio catalítico tiene actividad que requiere zinc para convertir moléculas de agua y dióxido de carbono en iones hidrógeno y bicarbonato, de modo que el pH intracelular y extracelular puede ajustarse a condiciones adecuadas para el crecimiento celular (NPL 2). De hecho, se ha confirmado *in vitro* y en estudios que utilizan ratones portadores de tumores que el crecimiento de células tumorales es más lento en células tumorales en las que CA9 está inactivada (*knocked out*) que en el tipo silvestre, demostrando experimentalmente que CA9 está implicada en el crecimiento de células tumorales (NPL 3). En pacientes con varios tumores, se ha encontrado que los niveles de expresión de CA9 están asociados significativamente con la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, el control local, la supervivencia específica de la enfermedad, la supervivencia libre de metástasis, y la supervivencia libre de progresión. Esto sugiere que los pacientes con tumores que expresan altos niveles de CA9 tienen un alto riesgo de recurrencia local, progresión de la enfermedad, y metástasis, independientemente del tipo o ubicación del tumor (NPL 4). Basándose en estos informes, se espera que CA9 sea un objetivo prometedor para la detección de tumores con mal pronóstico.

Se ha reportado la activación de la vía del factor inducible por hipoxia (HIF) 1 α como el mecanismo por el cual se induce la expresión de CA9 (NPL 5), y se ha reportado que el número de pacientes con altos niveles de expresión de CA9 es particularmente alto en carcinoma de células renales de células claras y cáncer de colon (NPL 6) (NPL 7). En el cáncer de colon, CA9 se expresa altamente en tejidos tumorales de aproximadamente el 70% de los pacientes debido a la activación de la vía HIF1 α asociada con hipoxia (NPL 7). Por otro lado, en pacientes con carcinoma de células renales de células claras, más de la mitad de ellos tienen mutaciones somáticas en el gen VHL (Von Hippel-Lindau), un gen supresor de tumores, o metilación excesiva de la región promotora (NPL 8), y

la vía HIF1 α está activada crónicamente incluso bajo condiciones normales de oxígeno (NPL 5), y se reporta que CA9 se expresa altamente en tejidos tumorales de aproximadamente el 90% de los pacientes (NPL 6). El cáncer de colon metastásico y el carcinoma de células renales metastásico tienen un pronóstico muy malo con una tasa de supervivencia a 5 años de 20% o menos, por lo que

5 existe una necesidad urgente de establecer métodos diagnósticos y terapéuticos para estas enfermedades.

Hasta ahora, se han desarrollado agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos a CA9 utilizando anticuerpos tales como Girentuximab, pero no han logrado mostrar eficacia (NPL 9). Por esta razón, se han desarrollado complejos anticuerpo-RI en los que Girentuximab se conjuga con un

10 quelante y se une a un radionúclido para PET y terapia. La imagen PET con un complejo anticuerpo-RI puede detectar tumores con alta sensibilidad. Sin embargo, dependiendo de la duración de la vida media del anticuerpo en sangre, es necesario utilizar un radionúclido de alta energía, de modo que toma tiempo detectar tumores, ya que los tumores se vuelven detectables 5 días después de la administración (NPL 10). Además, en el uso terapéutico, la vida media en sangre se prolonga de

15 manera similar; por lo tanto, la trombocitopenia inducida por el RI persiste por un período extendido. Como resultado, la administración repetida es difícil, y de hecho, en el ensayo clínico de Fase II, la trombocitopenia no se recuperó, haciendo imposible administrar tres dosis repetidas (NPL 11).

En consecuencia, sigue existiendo una necesidad del desarrollo de nuevos agentes terapéuticos anticancerígenos y agentes diagnósticos que tengan como objetivo CA9 y contengan,

20 como ingrediente activo, un compuesto distinto de un anticuerpo, por ejemplo, un agente de imagen para PET.

LISTA DE CITAS

LITERATURA NO PATENTE

- 25 NPL 1: Mayank Aggarwal, et al. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2013 Apr; 28(2): 267-77.
 NPL 2: Pawel Swietach, et al. J. Biol Chem. 2009 Jul 24; 284(30): 20299-310.
 NPL 3: Scott K Parks, et al. Oncotarget 2017 Feb 7; 8(6): 10225-10237
 NPL 4: Simon J A van Kuijk, et al. Front Oncol. 2016 Mar 29; 6: 69.
 NPL 5: C C Wykoff, N J Beasley et al. Cancer Res. 2000 Dec 15; 60(24): 7075-83.
- 30 NPL 6: Matthew H T Bui, et al. Clin. Cancer Res. 2003 Feb; 9(2): 802-11.
 NPL 7: Emese Sarolta Bádon, et al. Int. J. Mol. Sci. 2023 Jan 30; 24(3): 2581.
 NPL 8: Yusuke Sato, et al. Nat. Genet. 2013 Aug; 45(8): 860-7.
 NPL 9: Karim Chamie, et al. JAMA Oncol. 2017 Jul 1; 3(7): 913-920.
 NPL 10: Brian M. Shuch, et al. Results from phase 3 study of 89Zr-DFO-girentuximab for
- 35 PET/CT imaging of clear cell renal cell carcinoma (ZIRCON). 2023 ASCO Genitourinary Cancers

Symposium Meeting Abstract

NPL 11: Constantijn H J Muselaers, et al. Eur. Urol. 2016 May; 69(5): 767-70.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Problema técnico

Los presentes inventores han llevado a cabo investigación intensiva para crear un compuesto con actividad de unión a CA9, y como resultado, han concebido la presente invención. Los presentes inventores también han encontrado un conjugado de un compuesto que tiene actividad de unión a CA9 y una carga útil tal como una sustancia radiactiva o fluorescente. La presente invención se refiere a un nuevo péptido que tiene actividad de unión a CA9, un conjugado del péptido con una carga útil, una composición que contiene el péptido o conjugado (por ejemplo, una composición farmacéutica, composición diagnóstica, composición de investigación), y al uso del péptido o conjugado.

Solución al problema

15 La presente solicitud incluye, pero sin limitarse a ello, los siguientes aspectos de la invención.

[1]

Un péptido que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-PeG-S-3Py6NH₂-HseMe-dk-Y (SEQ ID No. 1) o

20 una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, adición, delección, o inserción en 1 a 10 residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, y 11 en la secuencia de aminoácidos anterior.

[2]

El péptido de acuerdo con [1], en donde (1) MeC, C, o MeCt está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1 o

25 (2) MeA, MeS, MeN, Hpr, G, o P está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y MeG, G, da, o Meda está unido además como un residuo de aminoácido en la posición 14.

[3]

30 El péptido de acuerdo con [1] o [2], que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, adición, delección, o inserción en 1 a 7 residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones 1, 4, 7, 8, 9, 10, y 11 en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1.

[4]

35 El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [3], en donde se satisfacen uno o dos o más de los siguientes requisitos:

el residuo de aminoácido en la posición 1 es da, dq, de, dhgl, o dk;

el residuo de aminoácido en la posición 2 es I o Tbg;

el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH₂ o 3Py6CON;

5 el residuo de aminoácido en la posición 4 es S, Hgl, Hgl(PEG8Me), alT, Hgn, SMe, KCOpipzaa, o DabAc;

el residuo de aminoácido en la posición 5 es PeG, MeG, Meda, o MedkCOpipzaa;

el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG, pMeOPeG, MsMeapG, 3OMePeG, pHPeG, PpG, pFPeG, mCPeG, pCPeG, 4HPpG, 4OMePpG, 4PypG, 4COOPeG, 3COOPeG, o 3FPeG;

10 el residuo de aminoácido en la posición 8 es H, S, P, D, KCOpipzaa, Q(PEG8Me), P4Sh, Hse, SMe, Qmm, o Qdm;

el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂, 5Inda, Y o F4OMe;

el residuo de aminoácido en la posición 10 es Ahp, HseMe, o E; y

el residuo de aminoácido en la posición 11 es dk, G, da, dq, dkCOpipzaa, dk(t4amCh), de, Acb, o dkAc.

15 [5]

El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en donde se satisface uno o dos o más de los siguientes requisitos:

el residuo de aminoácido en la posición 2 es Tbg;

el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH₂;

20 el residuo de aminoácido en la posición 5 es Meda;

el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG o pHPeG;

el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂ o 5Inda; y

el residuo de aminoácido en la posición 10 es HseMe.

[6]

25 El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en donde

el residuo de aminoácido en la posición 2 es Tbg;

el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH₂;

el residuo de aminoácido en la posición 5 es Meda;

el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG o pHPeG;

30 el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂ o 5Inda; y

el residuo de aminoácido en la posición 10 es HseMe.

[7]

El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [6], en donde el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 2-54.

35 [8]

El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [7], que además comprende un residuo de aminoácido adicional.

[9]

El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [8], en donde el péptido es un péptido cíclico.

5 [10]

El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [9], que tiene una estructura cíclica en la que un residuo de aminoácido cloroacetilado en la posición 1 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1 está unido a un residuo de cisteína incluido en el péptido.

[11]

10 El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [9], que tiene una estructura cíclica en la que un grupo amino de un residuo de aminoácido en la posición 1 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1 incluido en el péptido está unido a un grupo carboxi de un residuo de aminoácido en la posición 14.

[12]

15 El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [11], en donde

(a) un enlazador y/o una carga útil puede unirse a un extremo C-terminal del péptido; o

(b) el residuo de aminoácido en la posición 1, 4, 8, 11, o 13 en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1 es un residuo de aminoácido al que se puede unir un enlazador y/o una carga útil.

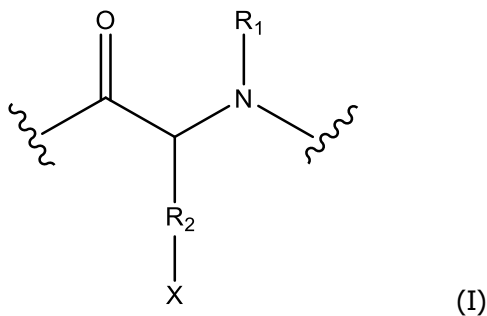
20 [13]

Un conjugado que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [12] y una carga útil, en donde:

(i) el residuo de aminoácido en la posición 13 en la SEQ ID No. 1 está unido, con o sin un enlazador, a cualquier carga útil; o

25 (ii) el residuo de aminoácido en la posición 1, 4, 8, o 11 en la SEQ ID No. 1 está unido a una carga útil como se muestra en la siguiente fórmula (I):

[Fórmula Química 1]



en donde en la fórmula (I),

30 R₁ es H o un grupo alquilo de C₁₋₃;

R₂ es alquilo de C₁₋₆-NH-, alquilo de C₁₋₆-arilo de C₆-O-alquilo de C₁₋₃-NH-, alquilo de C₁₋₆-NH(=O)-CH(alquilfenilo de C₁₋₆)-NH-, alquilo de C₁₋₆-NH(=O)-CH(alquilo de C₁₋₆)-NH-, o alquilo de C₁₋₆-NH(=O)-cicloalquilo de C₃₋₈-alquilo de C₁₋₃-NH-; y

X es cualquier carga útil.

5 [14]

El conjugado de acuerdo con [13], en donde R₂ es alquilo de C₁₋₆-NH-.

[15]

El conjugado de acuerdo con [13] o [14], donde X es un quelante.

[16]

10 El conjugado de acuerdo con [15], donde el quelante está unido a una sustancia radiactiva.

[17]

El conjugado de acuerdo con [15] o [16], donde el quelante es DOTA, DOTAGA o NODAGA.

[18]

Una composición farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de [1]

15 a [12].

[19]

Una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada a la CA9, que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [12].

[20]

20 Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con cualquiera de [13] a [17].

[21]

Una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada a la CA9, que comprende el conjugado de acuerdo con cualquiera de [13] a [17].

25 [22]

Una composición diagnóstica o de investigación que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [12].

[23]

30 Una composición diagnóstica o de investigación para el diagnóstico de una enfermedad asociada a la CA9, que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [12].

[24]

Una composición diagnóstica o de investigación que comprende el conjugado de acuerdo con cualquiera de [13] a [17].

[25]

35 Una composición diagnóstica o de investigación para el diagnóstico de una enfermedad

asociada a la CA9, que comprende el conjugado de acuerdo con cualquiera de [13] a [17].

[26]

Un agente de imagen que comprende el conjugado de acuerdo con cualquiera de [13] a [17].

[27]

5 Un agente de imagen que comprende el conjugado de acuerdo con cualquiera de [13] a [17], en donde el agente de imagen se utiliza para el diagnóstico de un tumor.

[28]

Un agente de imagen por radioligando utilizado para tomografía por emisión de positrones, que comprende el conjugado de acuerdo con cualquiera de [13] a [17].

10 [29]

Un método de ensayo de péptidos que comprende el ensayo de un péptido en función de al menos uno de los siguientes parámetros:

a) solubilidad en un solvente;

b) actividad de unión a CA9;

15 c) toxicidad celular y/o tisular; o

d) toxicidad para un animal de experimentación, en donde

el péptido es el péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [12].

[30]

20 Un método de ensayo de conjugados que comprende el ensayo de un conjugado en función de al menos uno de los siguientes parámetros:

a) solubilidad en un solvente;

b) actividad de unión a CA9;

c) toxicidad celular y/o tisular; o

d) toxicidad para un animal de experimentación, en donde

25 el conjugado es el conjugado de acuerdo con cualquiera de [13] a [17].

[31]

El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [3], en donde se satisface uno o dos o más de los siguientes requisitos:

el residuo de aminoácido en la posición 1 es de(PEG8Me), dk, dyae, o dkCOPipzaa;

30 el residuo de aminoácido en la posición 2 es I o Tbg;

el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH2 o 3Py6CON;

el residuo de aminoácido en la posición 4 es K, KCOPipzaa, Hgn(Qglucamina-NH2), Hgn(KCOPipzaa-NH2), o Qglucamina;

el residuo de aminoácido en la posición 5 es PeG, MeG, Meda, o MedkCOPipzaa;

35 el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG, pMeOPeG, MsMeapG, 3OMePeG, pHPeG,

PpG, pFPeG, mCPeG, pCPeG, 4HPpG, 4OMePpG, 4PypG, 4COOPeG, 3COOPeG, o 3FPeG;

el residuo de aminoácido en la posición 8 es K;

el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂, 5Inda, Y, o F4OMe;

el residuo de aminoácido en la posición 10 es Ahp, HseMe, o E; y

5 el residuo de aminoácido en la posición 11 es dk(F) o dk(PEG8c).

[32]

El péptido de acuerdo con cualquiera de [1] a [6], en donde el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 55-103.

[33]

10 Un conjugado que comprende el péptido de acuerdo con [32] y una carga útil, en donde cualquier carga útil está unida, con o sin un enlazador, al residuo de aminoácido en la posición 1, 4, 8, 11, o 13.

[34]

15 Un conjugado descrito en cualquiera de los Conjugados Nos.1-81 listados en el Cuadro 8 o el Cuadro 18.

Efectos ventajosos de la invención

El péptido o conjugado de la presente invención tiene actividad de unión a CA9, y por lo tanto es aplicable como una composición farmacéutica para prevenir o tratar un síntoma asociado a CA9, una composición diagnóstica, y una composición de investigación, etc.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de distribución *in vivo* de cada conjugado que comprende cada péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁷Ga como carga útil, a las 4 horas después de la administración, en un ratón modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral. Cabe señalar que el eje horizontal indica cada tejido, y el eje vertical indica la concentración de radiactividad (%ID/g) en cada tejido.

La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de distribución *in vivo* de cada conjugado que comprende cada péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁷Ga como carga útil, a las 24 horas después de la administración, en un ratón modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral. Cabe señalar que el eje horizontal indica cada tejido, y el eje vertical indica la concentración de radiactividad (%ID/g) en cada tejido.

La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de distribución *in vivo* de cada conjugado que comprende cada péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁷Ga como carga útil, a las 72 horas después de la administración, en un ratón modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral.

Cabe señalar que el eje horizontal indica cada tejido, y el eje vertical indica la concentración de radiactividad (%ID/g) en cada tejido.

La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de distribución *in vivo* de cada conjugado que comprende cada péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁴Cu como carga útil, a las 4 horas después de la administración, en un ratón modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral. Cabe señalar que el eje horizontal indica cada tejido, y el eje vertical indica la concentración de radiactividad (%ID/g) en cada tejido.

La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de distribución *in vivo* de cada conjugado que comprende cada péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁴Cu como carga útil, a las 24 horas después de la administración, en un ratón modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral. Cabe señalar que el eje horizontal indica cada tejido, y el eje vertical indica la concentración de radiactividad (%ID/g) en cada tejido.

La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de distribución *in vivo* de cada conjugado que comprende cada péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁴Cu, DOTAGA-⁶⁴Cu, o NODAGA-⁶⁴Cu como carga útil, a las 4 horas después de la administración, en un ratón modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral. Cabe señalar que el eje horizontal indica cada tejido, y el eje vertical indica la concentración de radiactividad (%ID/g) en cada tejido.

La figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de distribución *in vivo* de cada conjugado que comprende cada péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁴Cu, DOTAGA-⁶⁴Cu, o NODAGA-⁶⁴Cu como carga útil, a las 24 horas después de la administración, en un ratón modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral. Cabe señalar que el eje horizontal indica cada tejido, y el eje vertical indica la concentración de radiactividad (%ID/g) en cada tejido.

La figura 8 son imágenes PET/CT representativas de un ratón modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral a 1, 4, y 23.5 horas después de la administración del Conjugado No. 64-⁶⁴Cu, es decir un conjugado que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁴Cu como carga útil. Las flechas blancas en la figura indican la localización del tumor implantado.

La figura 9 son imágenes PET/CT representativas de un ratón modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral a 1, 4, y 23.5 horas después de la administración del Conjugado No. 62-⁶⁴Cu, es decir un conjugado que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁴Cu como carga útil. Las flechas blancas en la figura indican la localización del tumor implantado.

La figura 10 son imágenes PET/CT representativas de un ratón modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral a 1, 4, y 23.5 horas después de la administración del Conjugado No. 2-⁶⁴Cu, es decir un conjugado que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁴Cu como carga útil. Las flechas blancas en la figura indican la localización del tumor implantado.

La figura 11 son imágenes PET/CT representativas de un ratón modelo hembra BALB/cSlc-

nu/nu con implantación tumoral a 1, 4, y 23.5 horas después de la administración del Conjugado No. 56-⁶⁴Cu, es decir un conjugado que comprende un péptido de la presente invención con rDOTAGA-⁶⁴Cu como carga útil. Las flechas blancas en la figura indican la localización del tumor implantado.

La figura 12 son imágenes PET/CT representativas de un ratón modelo hembra BALB/cSlc-
 5 nu/nu con implantación tumoral a 1, 4, y 23.5 horas después de la administración del Conjugado No. 58-⁶⁴Cu, es decir un conjugado que comprende un péptido de la presente invención con rNODAGA-⁶⁴Cu como carga útil. Las flechas blancas en la figura indican la localización del tumor implantado.

La figura 13 es un gráfico que muestra el curso temporal del volumen tumoral medio en
 10 ratones modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral tratados con cada conjugado que comprende cada péptido de la presente invención con DOTA-¹⁷⁷Lu como carga útil, solución salina, o Cabozantinib. Cabe señalar que el eje horizontal indica el número de días después de la administración, y el eje vertical indica el volumen tumoral (mm³). Además, el círculo negro con una línea discontinua corta representa solución salina; el triángulo negro con una línea continua representa Cabozantinib; el círculo negro con una línea discontinua larga representa el Conjugado No. 64-¹⁷⁷Lu
 15 (tres dosis); el círculo blanco con una línea continua representa el Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (tres dosis); la "X" con una línea continua representa el Conjugado No. 64-¹⁷⁷Lu (dosis única); el cuadrado negro con una línea continua representa el Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (dosis única); y el círculo negro con una línea continua representa el Conjugado No. 65-¹⁷⁷Lu (60 MBq, dosis única).

La figura 14 es un gráfico que muestra el cambio porcentual medio en peso corporal de
 20 ratones modelo hembra BALB/cSlc-nu/nu con implantación tumoral tratados con cada conjugado que comprende cada péptido de la presente invención con DOTA-¹⁷⁷Lu como carga útil, solución salina, o Cabozantinib. Cabe señalar que el eje horizontal indica el número de días después de la administración, y el eje vertical indica el cambio porcentual en peso corporal (%). Además, el círculo negro con una línea discontinua corta representa solución salina; el triángulo negro con una línea
 25 continua representa Cabozantinib; el círculo negro con una línea discontinua larga representa el Conjugado No. 64-¹⁷⁷Lu (tres dosis); el círculo blanco con una línea continua representa el Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (tres dosis); la "X" con una línea continua representa el Conjugado No. 64-¹⁷⁷Lu (dosis única); el cuadrado negro con una línea continua representa el Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (dosis única); y el círculo negro con una línea continua representa el Conjugado No. 65-¹⁷⁷Lu (60 MBq, dosis única).

La figura 15 es un gráfico que muestra los resultados de distribución *in vivo* del Conjugado
 30 No. 62-⁶⁴Cu que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁴Cu como carga útil, a las 4, 24, y 48 horas después de la administración, en un ratón portador de tumor VMRC-RCW. Cabe señalar que el eje horizontal indica cada tejido, y el eje vertical indica la concentración de radiactividad (%ID/g) en cada tejido.

La figura 16 es un gráfico que muestra los resultados de distribución *in vivo* del Conjugado

No. 62-¹⁷⁷Lu que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-¹⁷⁷Lu como carga útil, a 1, 24, y 48 horas después de la administración, en un ratón portador de tumor VMRC-RCW. Cabe señalar que el eje horizontal indica cada tejido, y el eje vertical indica la concentración de radiactividad (%ID/g) en cada tejido.

5 La figura 17 son imágenes PET/CT representativas de un ratón portador de tumor VMRC-RCW a 1, 4, 23.5, y 47.5 horas después de la administración del Conjugado No. 62-⁶⁴Cu que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-⁶⁴Cu como carga útil.

La figura 18 es un gráfico que muestra el volumen tumoral medio en ratones portadores de tumor VMRC-RCW tratados con el Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-¹⁷⁷Lu como carga útil, solución salina, o Cabozantinib. Cabe señalar que el eje horizontal indica el número de días después de la administración, y el eje vertical indica el volumen tumoral (mm³). Además, el círculo negro representa el Grupo 1: solución salina; "X" representa el Grupo 2: Cabozantinib; el triángulo a cuadros representa el Grupo 3: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (30 MBq, dosis única); el triángulo con rayas verticales representa el Grupo 4: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (30 MBq, dos dosis); el triángulo con rayas horizontales representa el Grupo 5: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (30 MBq, tres dosis); el triángulo negro representa el Grupo 6: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (30 MBq, cuatro dosis); el cuadrado a cuadros representa el Grupo 7: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (60 MBq, dosis única); y el cuadrado con rayas verticales representa el Grupo 8: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (60 MBq, dos dosis).

La figura 19 es un gráfico que muestra el cambio porcentual medio en peso corporal de ratones portadores de tumor VMRC-RCW tratados con el Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-¹⁷⁷Lu como carga útil, solución salina, o Cabozantinib. Cabe señalar que el eje horizontal indica el número de días después de la administración, y el eje vertical indica el cambio porcentual en peso corporal (%). Además, el círculo negro representa el Grupo 1: solución salina; "X" representa el Grupo 2: Cabozantinib; el triángulo a cuadros representa el Grupo 3: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (30 MBq, dosis única); el triángulo con rayas verticales representa el Grupo 4: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (30 MBq, dos dosis); el triángulo con rayas horizontales representa el Grupo 5: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (30 MBq, tres dosis); el triángulo negro representa el Grupo 6: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (30 MBq, cuatro dosis); el cuadrado a cuadros representa el Grupo 7: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (60 MBq, dosis única); y el cuadrado con rayas verticales representa el Grupo 8: Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (60 MBq, dos dosis).

La figura 20 es un gráfico que muestra los resultados de distribución *in vivo* del Conjugado No. 62-²²⁵Ac que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-²²⁵Ac como carga útil, a las 4, 24, y 48 horas después de la administración, en un ratón portador de tumor HT-29. Cabe señalar que el eje horizontal indica cada tejido, y el eje vertical indica la concentración de radiactividad (%ID/g) en cada tejido.

La figura 21 es un gráfico que muestra el volumen tumoral medio en ratones portadores de tumor HT-29 tratados con el Conjugado No. 62-²²⁵Ac que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-²²⁵Ac como carga útil o solución salina. Cabe señalar que el eje horizontal indica el número de días después de la administración, y el eje vertical indica el volumen tumoral (mm³).

5 Además, el cuadrado negro representa el Grupo 1: solución salina; el triángulo negro representa el Grupo 2: Conjugado No. 62-²²⁵Ac (dosis de 30 MBq); el triángulo blanco representa el Grupo 3: Conjugado No. 62-²²⁵Ac (dosis de 60 MBq); "X" representa el Grupo 4: Conjugado No. 62-²²⁵Ac (dosis de 90 MBq); el círculo negro representa el Grupo 5: Conjugado No. 62-²²⁵Ac (dosis de 120 MBq); y el círculo blanco representa el Grupo 6: Conjugado No. 62-²²⁵Ac (dosis de 150 MBq).

10 La figura 22 es un gráfico que muestra el cambio medio en peso corporal de ratones portadores de tumor HT-29 tratados con el Conjugado No. 62-²²⁵Ac que comprende un péptido de la presente invención con DOTA-²²⁵Ac como carga útil o solución salina. Cabe señalar que el eje horizontal indica el número de días después de la implantación, y el eje vertical indica el peso corporal medio (g). Además, el cuadrado negro representa el Grupo 1: solución salina; el triángulo negro
15 representa el Grupo 2: Conjugado No. 62-²²⁵Ac (dosis de 30 MBq); el triángulo blanco representa el Grupo 3: Conjugado No. 62-²²⁵Ac (dosis de 60 MBq); "X" representa el Grupo 4: Conjugado No. 62-²²⁵Ac (dosis de 90 MBq); el círculo negro representa el Grupo 5: Conjugado No. 62-²²⁵Ac (dosis de 120 MBq); y el círculo blanco representa el Grupo 6: Conjugado No. 62-²²⁵Ac (dosis de 150 MBq).

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención incluye, pero sin limitarse a ello, las siguientes modalidades. Salvo que se indique lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que los comúnmente entendidos por los expertos en la materia. Las sustancias,
25 materiales y ejemplos aquí descritos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos. La referencia a "en una modalidad" en este documento significa que no se limita a dicha modalidad, es decir, no está limitada.

1. Abreviaturas

En el presente documento, las siguientes abreviaturas se utilizan con los siguientes
30 significados, salvo que se indique lo contrario.

Abreviaturas (general)

Å: angstrom (unidad);

ClAc: cloroacetilo;

Cy5SAIk: sulfo-Cy5-alquino;

35

DCM: diclorometano;

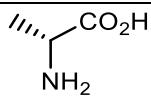
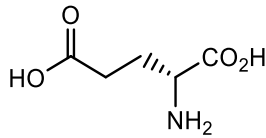
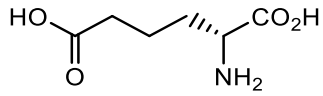
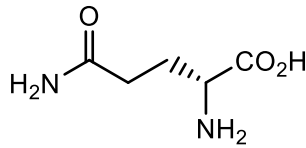
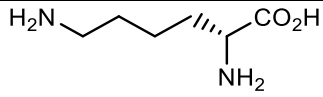
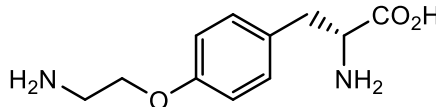
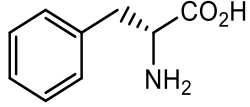
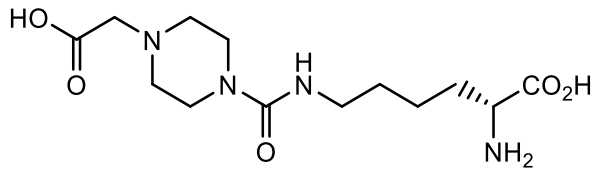
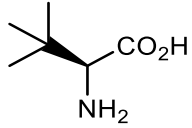
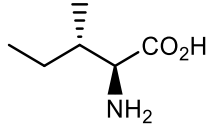
	TIPS: triisopropilsililo;
	terc: terciario;
	DTT: ditioneitol;
	DMSO: dimetilsulfóxido;
5	Trt: tritilo;
	Boc: <i>tert</i> -butoxicarbonilo;
	DMF: N,N-dimetilformamida;
	DIEA o DIPEA: N,N-diisopropiletilamina;
	DIPCI o DIC: N,N'-diisopropilcarbodiimida;
10	Oxima pura: ciano(hidroxiimino)acetato de etilo;
	DODT: 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol;
	Éster DOTA-NHS: Ácido 2,2',2''-(10-(2-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacético;
	DOTA: Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético;
15	Fmoc: 9-fluorenilmetiloxycarbonilo;
	g: gramo (unidad);
	H ₂ O: agua;
	HCl: cloruro de hidrógeno;
	HATU: Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio;
20	HOSu: N-hidroxisuccinimida;
	HPLC: cromatografía líquida de alta resolución;
	LC-MS o LC/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas;
	MeOH: metanol;
	ml: mililitro (unidad);
25	M: molar (unidad);
	μl: microlitro (unidad);
	mM: milimolar (unidad);
	μM: micromolar (unidad);
	mmol: milimol (unidad);
30	mg: miligramo (unidad);
	MeCN o CH ₃ CN: acetonitrilo;
	min: minuto (unidad);
	mm: milímetro (unidad);
	μm: micrómetro (unidad);
35	nm: nanómetro (unidad);

- nM: nanomolar (unidad);
 NMP: N-metil-2-pirrolidona;
 OSu: succinimida;
 PEG: polietilenglicol;
 5 rpm: revoluciones por minuto (unidad);
 tBu: *terc*-butilo;
 TFA: ácido trifluoroacético;
 TIS: triisopropilsilano;
 Trt o Tr: grupo tritilo;
 10 H-PEG4Me: 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-amina;
 H-PEG8Me: 2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-amina;
 AA: aminoácido;
 PyAOP: Hexafluorofosfato de 7-((azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio;
 CSA: Ácido 10-canforsulfónico;
 15 Fmoc-OSu: N-(9-fluorenilmetoxycarbonilo) succinimida;
 THF: tetrahidrofurano;
 ClAcOSu: N-(cloroacetoxi)succinimida;
 Pd₂(dba)₃·CHCl₃: complejo de tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0)-cloroformo;
 SPhos: 2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenilo;
 20 EDCI·HCl: Clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida;
 Pd(PPh₃)₄: tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0);
 ClAcOH: ácido cloroacético ácido;
 conc: concentración;
 HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol;
 25 Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo;
 Alloc: aliloxycarbonilo;
 Alilo: alilo;
 Fmoc-Qglucamina-NH₂: (9H-fluoren-9-il)metil((S)-1-amino-1,5-dioxo-5-(((2S,3R,4R,5R)-
 2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)pentan-2-il)carbamato;
 30 H-Qglucamina-NH₂: (S)-4-amino-N1-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-
 pentahidroxihexil)pentanodiamida;
 H-KCOpipzaa(Mpe)-NH₂: 3-metilpentan-3-il(S)-2-(4-((5,6-diamino-6-
 oxohexil)carbamoil)piperazin-1-il);
 TEA: trietilamina.

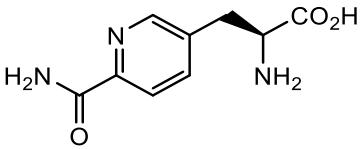
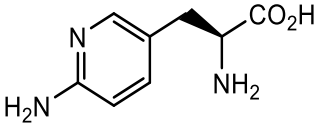
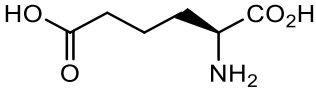
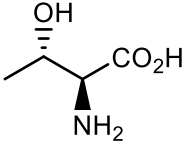
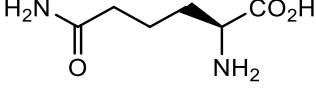
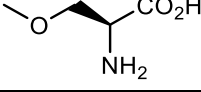
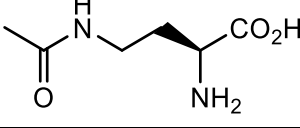
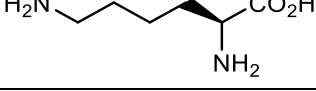
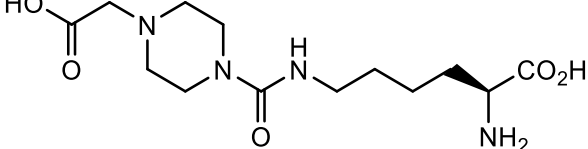
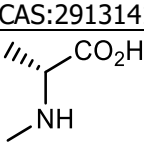
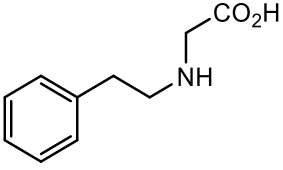
Abreviaturas (aminoácidos no naturales)

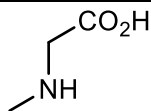
Las siguientes abreviaturas para aminoácidos no naturales incluyen aquellos en los que el grupo amino de la cadena principal está protegido por un grupo protector común, como un grupo Boc o Fmoc.

CUADRO 1-1**Lista de aminoácidos no naturales**

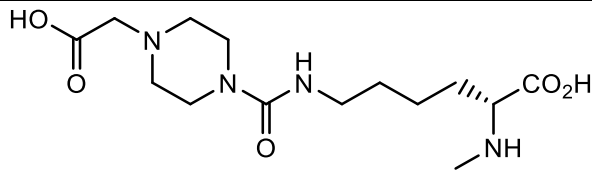
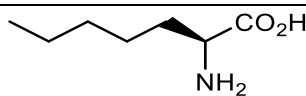
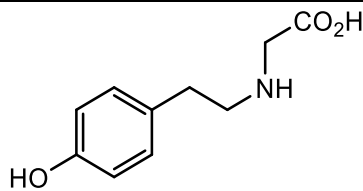
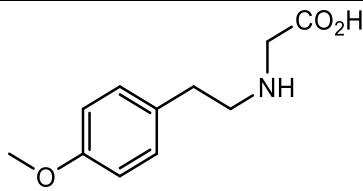
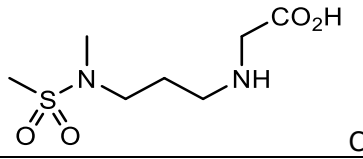
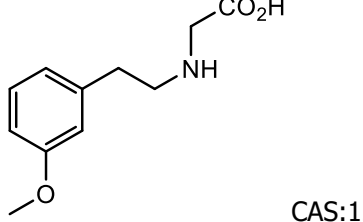
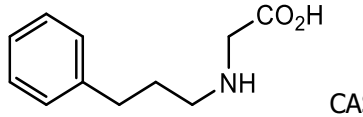
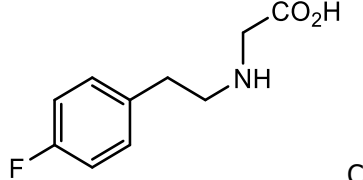
Abreviatura	Estructura
da	 CAS:338-69-2
de	 CAS:6893-26-1
dhgl	 CAS:7620-28-2
dq	 CAS:5959-95-5
dk	 CAS:923-27-3
dya	 Ácido (2R)-2-amino-3-[4-(2-aminoetoxi)fenil]propanoico
df	 CAS:673-06-3
dkCOpipzaa	 CAS:2973757-42-3
Tbg	 CAS:20859-02-3
I	 CAS:73-32-5

CUADRO 1-2

3Py6CON	 CAS:2973752-27-9
3Py6NH2	 CAS:1269968-61-7
Hgl	 CAS:1118-90-7
alT	 CAS:28954-12-3
Hgn	 CAS:7433-32-1
SMe	 CAS:32620-11-4
DabAc	 CAS:1190-46-1
K	 CAS:56-87-1
KCOpipzaa	 CAS:2913141-21-4
Meda	 CAS:29475-64-7
PeG	 CAS:7738-38-7

MeG	 CAS:107-97-1
-----	---

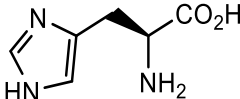
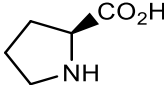
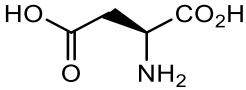
CUADRO 1-3

MedkCOpipzaa	 CAS:2973757-43-4
Ahp	 CAS:44902-02-5
pHPeG	 CAS:169836-45-7
pMeOPeG	 CAS:88720-74-5
MsMeapG	 CAS:2030455-69-5
3OMePeG	 CAS:1267272-96-7
PpG	 CAS:75822-20-7
pFPeG	 CAS:933736-89-1

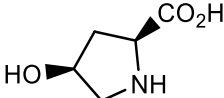
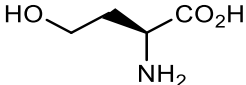
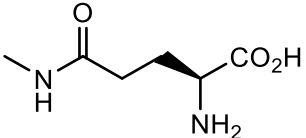
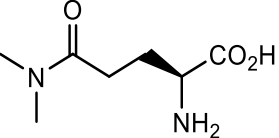
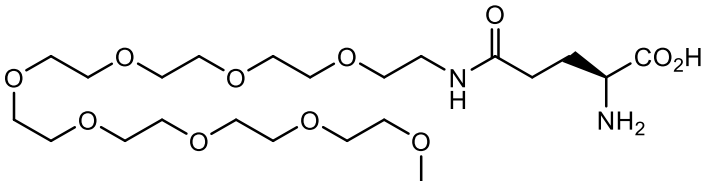
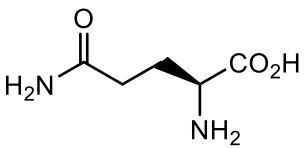
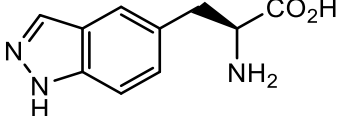
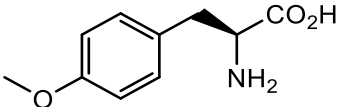
mCPeG	 CAS:1267670-63-2
-------	----------------------

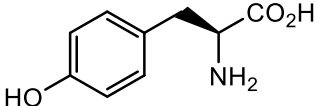
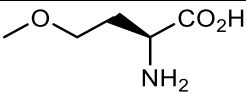
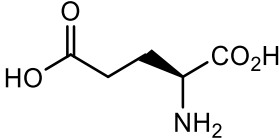
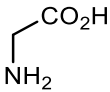
CUADRO 1-4

pCPeG	 CAS:205124-63-6
4HPpG	 CAS:861566-97-4
4OMePpG	 Ácido 2-{[3-(4-metoxifenil)propil]amino}acético
4PypG	 Ácido 2-{[3-(piridin-4-il)propil]amino}acético
4COOPeG	 Ácido 4-{2-[(carboximetil)amino]etil}benzoico
3COOPeG	 Ácido 3-{2-[(carboximetil)amino]etil}benzoico
3FPeG	 CAS:1155577-90-4
S	 CAS:56-45-1

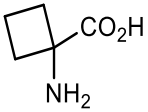
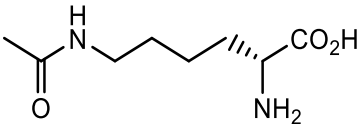
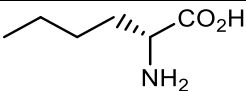
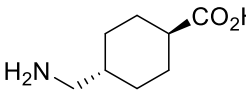
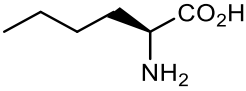
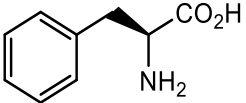
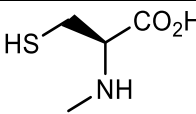
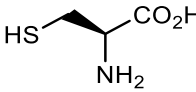
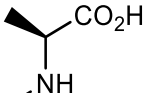
H	 CAS:71-00-1
P	 CAS:147-85-3
D	 CAS:56-84-8

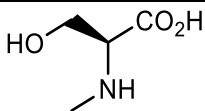
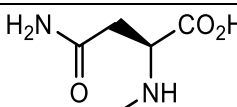
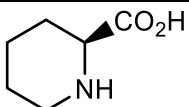
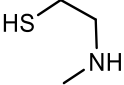
CUADRO 1-5

P4Sh	 CAS:618-27-9
Hse	 CAS:672-15-1
Qmm	 CAS:3081-62-7
Qdm	 CAS:21432-98-4
QPEG8Me	 CAS:2913141-39-4
Q	 CAS:56-85-9
5Inda	 CAS:1335577-14-4
F4OMe	 CAS:6230-11-1

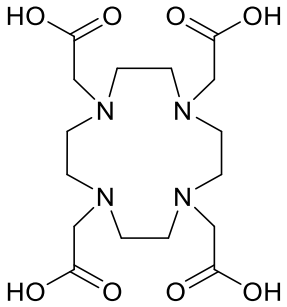
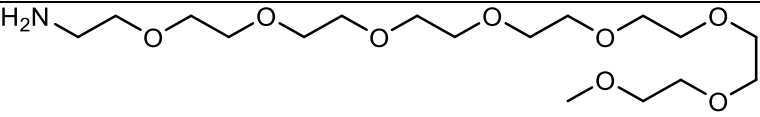
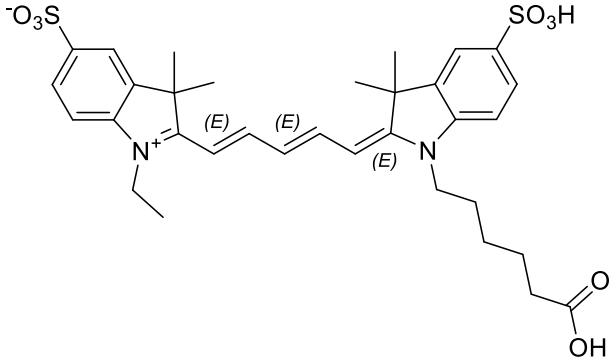
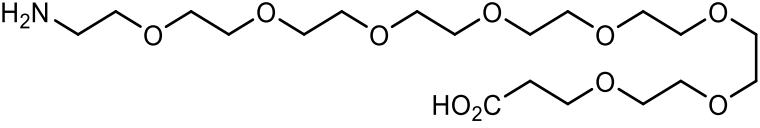
Y	 CAS:60-18-4
HseMe	 CAS:01/01/3311
E	 CAS:56-86-0
G	 CAS:56-40-6

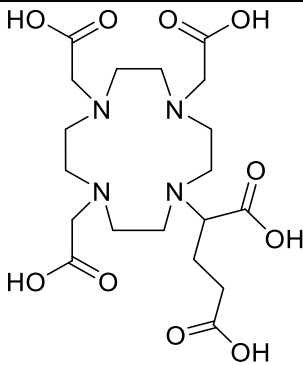
CUADRO 1-6

Acb	 CAS:22264-50-2
dkAc	 CAS:51621-57-9
dnle	 CAS:327-56-0
t4amCh	 CAS:1197-18-8
Nle	 CAS:327-57-1
F	 CAS:63-91-2
MeC	 CAS:4026-48-6
C	 CAS:52-90-4
MeA	 CAS:3913-67-5

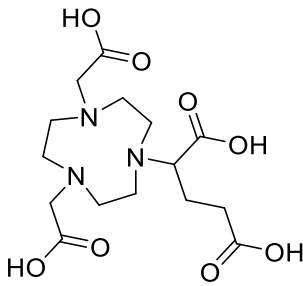
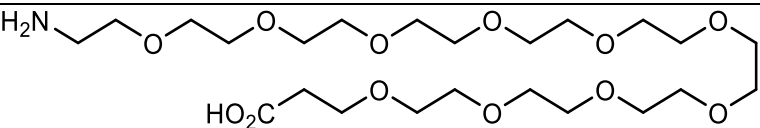
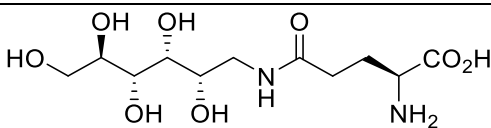
MeS	 CAS:2480-26-4
MeN	 CAS:19026-58-5
Hpr	 CAS:3105-95-1
MeCt	 CAS:10061-40-2

CUADRO 1-7

DOTA	 CAS:60239-18-1
PEG8Me	 CAS:869718-81-0
SulfoCy5	 CAS:146368-11-8
PEG8c	 CAS:756526-04-2

rDOTAGA DOTAGA)	(o	 CAS:656242-49-8
--------------------	----	--

CUADRO 1-8

rNODAGA NODAGA)	(o	 CAS:1092370-12-1
PEG10c		 CAS:2170987-85-4
Qglucamina		 CAS:1956384-48-7

2. Péptido

5 La presente invención se refiere a un péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las referencias en el presente documento a "péptido" también incluyen referencias a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un isómero, o un solvato del mismo, siempre que no exista contradicción particular.

10 Una modalidad de la presente invención proporciona un péptido que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-PeG-S-3Py6NH2-HseMe-dk-Y (SEQ ID No. 1) o

una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, adición, delección, o inserción en 1 a 10 residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, y 11 en la secuencia de aminoácidos anterior.

El péptido de la presente invención puede ser un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, adición, delección, o inserción en 1 a 9 residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, y 11 en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1.

5 Los 1 a 10 residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, y 11 en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1 pueden tener una sustitución, adición, delección, o inserción. El número de sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos debe ser 1 o más y 10 o menos y el límite inferior es 1. El límite superior puede ser 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2, y el mínimo es 1.

10 Se prefiere una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, adición, delección, o inserción en 1 a 7 residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones 1, 4, 7, 8, 9, 10, y 11 en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1. El número de sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos debe ser 1 o más y 7 o menos y el límite inferior es 1. El límite superior puede ser 7, 6, 5, 4, 3, o 2,
15 y el mínimo es 1. Además, puede preferirse una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, adición, delección, o inserción en 1 a 6 residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones 1, 4, 7, 8, 9, y 11 en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1.

20 En una modalidad, se prefiere una "sustitución" de aminoácido. Dicha sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución conservativa de aminoácido, pero no está limitada a esto.

El término "sustitución conservativa de aminoácido" significa una sustitución con un aminoácido funcionalmente equivalente o similar. Una sustitución conservativa de aminoácido en un péptido causa un cambio estático en la secuencia de aminoácidos del péptido. Por ejemplo, uno o
25 dos o más aminoácidos con polaridad similar actúan de manera funcionalmente equivalente para producir un cambio estático en la secuencia de aminoácidos de dicho péptido. En general, una sustitución dentro de un grupo puede considerarse estructural y funcionalmente conservativa. Sin embargo, como es obvio para los expertos en la técnica, el papel desempeñado por un residuo de aminoácido particular puede determinarse por su importancia en la estructura tridimensional de la
30 molécula que contiene ese aminoácido. Por ejemplo, un residuo de cisteína puede tomar una forma oxidada (disulfuro) menos polar cuando se compara con la forma reducida (tiol). La porción alifática larga de una cadena lateral de arginina puede constituir una característica estructural y funcionalmente importante. Además, una cadena lateral que tiene un anillo aromático (de triptófano, tirosina, o fenilalanina) puede contribuir a una interacción ion-aromático o catión-pi. En dichos casos, la
35 sustitución de un aminoácido que tiene dicha cadena lateral con un aminoácido que pertenece a un

grupo ácido o no polar puede ser estructural y funcionalmente conservativa. Un residuo tal como prolina, glicina, o cisteína (forma disulfuro) puede tener un efecto directo sobre la conformación de la cadena principal y a menudo no puede reemplazarse sin distorsión estructural.

La sustitución conservativa de aminoácido incluye una sustitución específica basada en similitud de cadena lateral (por ejemplo, L. Lehninger, Biochemistry, 2ª edición, pp73-75, Worth Publisher, New York (1975)) y una sustitución típica como se muestra a continuación. Además, por ejemplo, la sustitución conservativa de aminoácido es preferiblemente una sustitución por un aminoácido que pertenece al mismo grupo que un grupo de aminoácidos agrupados sobre la base de propiedades de cadena lateral comunes a las de los siguientes aminoácidos naturales.

10 Aminoácidos hidrófobos (también llamados no polares): aminoácidos que son hidrófobos (no polares) e incluyen alanina ("Ala" o simplemente "A"), glicina ("Gly" o simplemente "G"), valina ("Val" o simplemente "V"), leucina ("Leu" o simplemente "L"), isoleucina ("Ile" o simplemente "I"), prolina ("Pro" o simplemente "P"), fenilalanina ("Phe" o simplemente "F"), triptófano ("Trp" o simplemente "W"), tirosina ("Tyr" o simplemente "Y"), y metionina ("Met" o simplemente "M").

15 Cabe señalar que los aminoácidos hidrófobos pueden dividirse además en los siguientes grupos.

Aminoácidos alifáticos: aminoácidos con ácido graso o hidrógeno en la cadena lateral, que incluyen Ala, Gly, Val, Ile, y Leu.

20 Aminoácidos alifáticos/de cadena ramificada: aminoácidos con ácido graso ramificado en la cadena lateral, que incluyen Val, Ile, y Leu.

Aminoácidos aromáticos: aminoácidos que tienen un anillo aromático en la cadena lateral, que incluyen Trp, Tyr, y Phe.

25 Aminoácidos hidrófilos (también llamados polares): aminoácidos que son hidrófilos (polares) e incluyen serina ("Ser" o simplemente "S"), treonina ("Thr" o simplemente "T"), cisteína ("Cys" o simplemente "C"), asparagina ("Asn" o simplemente "N"), glutamina ("Gln" o simplemente "Q"), ácido aspártico ("Asp" o simplemente "D"), ácido glutámico ("Glu" o simplemente "E"), y lisina ("Lysine"; "Lys" o simplemente "K"), arginina ("Arg" o simplemente "R"), e histidina ("His" o simplemente "H").

Cabe señalar que los aminoácidos hidrófilos pueden dividirse además en los siguientes grupos.

30 Aminoácidos ácidos: aminoácidos con una cadena lateral ácida, que incluyen Asp y Glu.

Aminoácidos básicos: aminoácidos con una cadena lateral básica, que incluyen Lys, Arg, e His.

Aminoácidos neutros: aminoácidos con una cadena lateral neutra, que incluyen Ser, Thr, Asn, Gln, y Cys.

35 Gly y Pro también pueden clasificarse como "aminoácidos que afectan la dirección de la

cadena principal", y aminoácidos que contienen una molécula de azufre en la cadena lateral, Cys y Met, pueden clasificarse como "aminoácidos que contienen azufre".

Como se usa en el presente documento, los "aminoácidos" incluyen no solo aminoácidos naturales sino también aminoácidos no naturales. Ejemplos de los aminoácidos no naturales incluyen

5 N-alquilaminoácidos, en los que el aminoácido natural descrito anteriormente está N-alquilado, y aquellos en los que el nitrógeno que forma un enlace peptídico está modificado con un grupo alquilo inferior ramificado o no ramificado (por ejemplo, C1-C5, preferiblemente C1-C3, más preferiblemente C1). Los N-alquilaminoácidos son preferiblemente N-etilaminoácidos, N-butilaminoácidos, o N-metilaminoácidos, y más preferiblemente N-metilaminoácidos. Además, ejemplos de los aminoácidos

10 no naturales incluyen aminoácidos de tipo D (también llamados D-aminoácidos), β -aminoácidos, γ -aminoácidos, mutantes de aminoácidos, aminoácidos químicamente modificados tales como derivados de aminoácidos, y aminoácidos, tales como norleucina y ornitina, que no se usan como bloques de construcción de proteínas *in vivo*. Además, los ejemplos incluyen aminoácidos en los que la cadena lateral de un aminoácido natural contiene además un grupo funcional o está reemplazada por otro

15 grupo funcional (por ejemplo, aminoácidos con, por ejemplo, una porción de grupo arileno o alquileo de cadena lateral con sustitución y/o adición, aminoácidos con un número aumentado de átomos de carbono en un grupo arileno, alquileo o alquilo en la cadena lateral, aminoácidos con un anillo aromático sustituido en una cadena lateral, aminoácidos heterociclizados o ciclocondensados).

Cabe señalar que una cadena lateral de aminoácido natural puede contener o estar

20 reemplazada por una estructura tal como un grupo funcional. Esto puede impartir una propiedad diferente de la de un aminoácido natural. Por ejemplo, Dap es un aminoácido con un grupo amino en la cadena lateral de alanina. Aquí, el grupo amino se añade para exhibir una propiedad de aminoácido básico, polar, que difiere de la alanina que pertenece a un grupo de aminoácidos no polares. En otras palabras, aminoácidos no naturales con propiedades de cadena lateral similares pueden

25 incluirse en los grupos descritos anteriormente obtenidos al clasificar aminoácidos naturales basándose en sus propiedades de cadena lateral comunes. Por ejemplo, N-metilarginina (MeR), un aminoácido en el que el átomo de nitrógeno de la cadena principal de arginina, que pertenece a aminoácidos básicos, está metilado, es un aminoácido no natural, pero es básico. Por lo tanto, puede clasificarse como un aminoácido básico. Como tal, aminoácidos no naturales que exhiben propiedades de cadena

30 lateral similares a las de un cierto aminoácido también pueden incluirse como objetivos para sustitución conservativa de aminoácido. Cabe señalar que D-aminoácidos tales como de(ácido D-glutámico) pueden clasificarse como D-aminoácidos o de acuerdo con la naturaleza de sus cadenas laterales. N-metilaminoácidos pueden clasificarse como N-alquilaminoácidos o clasificarse de acuerdo con la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido original que no está N-metilado.

35 Los aminoácidos no naturales incluyen, pero sin limitarse a ello, N-metilaminoácidos y D-

aminoácidos, y más específicamente, da, de, dhgl, dq, dk, dyae, df, dkCOPipzaa, Tbg, 3Py6CON, 3Py6NH2, Hgl, alT, Hgn, SMe, DabAc, KCOPipzaa, Meda, PeG, MeG, MedkCOPipzaa, Ahp, pHPeG, pMeOPeG, MsMeapG, 3OMePeG, PpG, pFPeG, mCPeG, pCPeG, 4HPpG, 4OMePpG, 4PypG, 4COOPeG, 3COOPeG, 3FPeG, P4Sh, Hse, Qmm, Qdm, QPEG8Me, 5Inda, F4OMe, HseMe, Acb, dkAc, dnle, t4amCh, Nle, MeC, MeA, MeS, MeN, Hpr, Hgn(Qglucamina-NH2), Hgn(KCOPipzaa-NH2), Qglucamina, y MeCt y otros aminoácidos.

La "sal farmacéuticamente aceptable del mismo" significa una sal de cualquiera de los péptidos. Ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales de ácidos minerales (por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico), sales de ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico), sales de aminas (por ejemplo, trimetilamina metilamina), y sales de iones metálicos (por ejemplo, iones sodio, potasio, o calcio). Para compuestos que llegan a contener humedad con el tiempo, dicha humedad también está incluida en la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además, el péptido también puede ser isómeros tales como estereoisómeros del mismo. El péptido puede tener uno o más estereocentros, que pueden existir independientemente en la configuración (R) o (S). Como se usa en el presente documento, el péptido puede ser una forma ópticamente activa o un racemato, y la frase "puede ser un isómero" significa que incluye un racemato, una forma ópticamente activa, un isómero posicional, y un estereoisómero, o cualquier combinación de los mismos. Además, en una modalidad, puede permitirse una mezcla de uno o más isómeros. Cabe señalar que el "estereoisómero de péptido" significa un estereoisómero del péptido. Las referencias en el presente documento a "péptido" incluyen sus isómeros a menos que se mencione lo contrario.

Además, el péptido también puede ser un solvato. Solvatación significa un fenómeno en el que iones generados por ionización de moléculas de soluto (péptidos o conjugados) están rodeados y asociados con moléculas de solvente a través de fuerzas electrostáticas, enlace de hidrógeno, o similares, por lo que el soluto se dispersa en el solvente. El tipo de solvente no está particularmente limitado. Cuando el solvente es agua, se llama especialmente "hidrato".

Los siguientes péptidos son ejemplos de péptidos confirmados que tienen actividad de unión a CA9 en los Ejemplos en el presente documento:

da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-PeG-S-3Py6NH2-HseMe-dk-Y (SEQ ID No. 1);

un péptido en el que MeC, C, o MeCt está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1; y

un péptido en el que MeA, MeS, MeN, Hpr, G, o P está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y MeG, G, da, o Meda está unido

además como un residuo de aminoácido en la posición 14.

En una modalidad, el péptido de la presente invención es un péptido en el que

(1) MeC, C, o MeCt está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1; o

5 (2) MeA, MeS, MeN, Hpr, G, o P está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y MeG, G, da, o Meda está unido además como un residuo de aminoácido en la posición 14.

Los anteriores (1) y (2) difieren en el residuo de aminoácido en la posición 13. En una modalidad, cuando el péptido de la presente invención es un péptido cíclico, el número de residuos de
10 aminoácidos contenidos en la estructura cíclica no está limitado y puede ser 13 o 14. Si un aminoácido adicional está presente en un extremo del mismo, el número puede ser dicho número o más.

En una modalidad, el péptido de la presente invención satisface los siguientes uno o dos o más requisitos:

- 15 el residuo de aminoácido en la posición 1 (en SEQ ID No. 1) es da, dq, de, dhgl, o dk;
- el residuo de aminoácido en la posición 2 es I o Tbg;
- el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH₂ o 3Py6CON;
- el residuo de aminoácido en la posición 4 es S, Hgl, Hgl(PEG8Me), alT, Hgn, SMe, KCOpipzaa, o DabAc;
- el residuo de aminoácido en la posición 5 es PeG, MeG, Meda, o MedkCOpipzaa;
- 20 el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG, pMeOPeG, MsMeapG, 3OMePeG, pHPeG, PpG, pFPeG, mCPeG, pCPeG, 4HPpG, 4OMePpG, 4PypG, 4COOPeG, 3COOPeG, o 3FPeG;
- el residuo de aminoácido en la posición 8 es H, S, P, D, KCOpipzaa, Q(PEG8Me), P4Sh, Hse, SMe, Qmm, o Qdm;
- el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂, 5Inda, Y, o F4OMe;
- 25 el residuo de aminoácido en la posición 10 es Ahp, HseMe, o E; y
- el residuo de aminoácido en la posición 11 es dk, G, da, dq, dkCOpipzaa, dk(t4amCh), de, Acb, o dkAc.

Las opciones anteriores para residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 12 en una de las modalidades anteriores pueden seleccionarse en cualquier combinación. Los requisitos incluyen, pero
30 sin limitarse a ello, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, u 11 o más requisitos descritos anteriormente. Preferiblemente, se satisfacen todos los 12 requisitos anteriores.

En una modalidad, el péptido de la presente invención satisface los siguientes uno o dos o más requisitos:

- 35 el residuo de aminoácido en la posición 1 (en la SEQ ID No. 1) es da, dq, de, dhgl, o dk;

- el residuo de aminoácido en la posición 2 es I o Tbg;
 el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH₂ o 3Py6CON;
 el residuo de aminoácido en la posición 4 es S, Hgl, Hgl(PEG8Me), alT, Hgn, SMe, KCOpipzaa, o DabAc;
- 5 el residuo de aminoácido en la posición 5 es PeG, MeG, Meda, o MedkCOpipzaa;
 el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG, pMeOPeG, MsMeapG, 3OMePeG, pHPeG, PpG, pFPeG, mCPeG, pCPeG, 4HPpG, 4OMePpG, 4PypG, 4COOPeG, 3COOPeG, o 3FPeG;
 el residuo de aminoácido en la posición 8 es H, S, P, D, KCOpipzaa, Q(PEG8Me), P4Sh, Hse, SMe, Qmm, o Qdm;
- 10 el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂, 5Inda, Y, o F4OMe;
 el residuo de aminoácido en la posición 10 es Ahp, HseMe, o E; y
 el residuo de aminoácido en la posición 11 es dk, G, da, dq, dkCOpipzaa, dk(t4amCh), de, Acb, o dkAc,
 y en donde
- 15 (1) MeC, C, o MeCt está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1 o
 (2) MeA, MeS, MeN, Hpr, G, o P está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y MeG, G, da, o Meda está unido además como un residuo de aminoácido en la posición 14.
- 20 Las opciones anteriores para residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 12 en una de las modalidades anteriores pueden seleccionarse en cualquier combinación. Los requisitos incluyen, pero sin limitarse a ello, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, u 11 o más requisitos descritos anteriormente. Preferiblemente, se satisfacen todos los 12 requisitos anteriores.
- 25 En una modalidad, el péptido de la presente invención satisface los siguientes uno o dos o más requisitos:
 el residuo de aminoácido en la posición 2 (en la SEQ ID No. 1) es Tbg;
 el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH₂;
 el residuo de aminoácido en la posición 5 es Meda;
- 30 el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG o pHPeG;
 el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂ o 5Inda; y
 el residuo de aminoácido en la posición 10 es HseMe.
- Las opciones anteriores para residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 10 en una de las modalidades anteriores pueden seleccionarse en cualquier combinación. Los requisitos incluyen, pero
- 35 sin limitarse a ello, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, o 5 o más requisitos descritos anteriormente.

Preferiblemente, se satisfacen todos los 6 requisitos anteriores.

En una modalidad, el péptido de la presente invención satisface los siguientes uno o dos o más requisitos:

- 5 el residuo de aminoácido en la posición 2 (en la SEQ ID No. 1) es Tbg;
- el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH₂;
- el residuo de aminoácido en la posición 5 es Meda;
- el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG o pHPEG;
- el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂ o 5Inda; y
- el residuo de aminoácido en la posición 10 es HseMe,
- 10 y en donde
 - (1) MeC, C, o MeCt está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1 o
 - (2) MeA, MeS, MeN, Hpr, G, o P está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y MeG, G, da, o Meda está unido además como
 - 15 un residuo de aminoácido en la posición 14.

Las opciones anteriores para residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 10 en una de las modalidades anteriores pueden seleccionarse en cualquier combinación. Los requisitos incluyen, pero sin limitarse a ello, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, o 5 o más requisitos descritos anteriormente. Preferiblemente, se satisfacen todos los 6 requisitos anteriores.

- 20 En una modalidad, el péptido de la presente invención satisface los siguientes requisitos:
 - el residuo de aminoácido en la posición 2 (en la SEQ ID No. 1) es Tbg;
 - el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH₂;
 - el residuo de aminoácido en la posición 5 es Meda;
 - el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG o pHPEG;
 - 25 el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂ o 5Inda; y
 - el residuo de aminoácido en la posición 10 es HseMe.

- En una modalidad, el péptido de la presente invención se proporciona de tal manera que
 - el residuo de aminoácido en la posición 2 (en la SEQ ID No. 1) es Tbg;
 - el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH₂;
 - 30 el residuo de aminoácido en la posición 5 es Meda;
 - el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG o pHPEG;
 - el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂ o 5Inda; y
 - el residuo de aminoácido en la posición 10 es HseMe,

y en donde

- 35 (1) MeC, C, o MeCt está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la

secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1 o

(2) MeA, MeS, MeN, Hpr, G, o P está unido, como un residuo de aminoácido en la posición 13, a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y MeG, G, da, o Meda está unido además como un residuo de aminoácido en la posición 14.

5 En una modalidad, el péptido de la presente invención satisface los siguientes uno o dos o más requisitos:

el residuo de aminoácido en la posición 1 (en la SEQ ID No. 1) es de(PEG8Me), dk, dyae, o dkCOPipzaa;

el residuo de aminoácido en la posición 2 es I o Tbg;

10 el residuo de aminoácido en la posición 3 es 3Py6NH₂ o 3Py6CON;

el residuo de aminoácido en la posición 4 es K, KCOPipzaa, Hgn(Qglucamina-NH₂), Hgn(KCOPipzaa-NH₂), o Qglucamina;

el residuo de aminoácido en la posición 5 es PeG, MeG, Meda, o MedkCOPipzaa;

15 el residuo de aminoácido en la posición 7 es PeG, pMeOPeG, MsMeapG, 3OMePeG, pHPeG, PpG, pFPeG, mCPeG, pCPeG, 4HPpG, 4OMePpG, 4PypG, 4COOPeG, 3COOPeG, o 3FPeG;

el residuo de aminoácido en la posición 8 es K;

el residuo de aminoácido en la posición 9 es 3Py6NH₂, 5Inda, Y, o F4OMe;

el residuo de aminoácido en la posición 10 es Ahp, HseMe, o E; y

el residuo de aminoácido en la posición 11 es dk(F) o dk(PEG8c).

20 Las opciones anteriores para residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 12 en una de las modalidades anteriores pueden seleccionarse en cualquier combinación. Los requisitos incluyen, pero sin limitarse a ello, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, u 11 o más requisitos descritos anteriormente. Preferiblemente, se satisfacen todos los 12 requisitos anteriores.

25 Además, en una modalidad, uno o varios aminoácidos contenidos en el péptido de la presente invención pueden modificarse adicionalmente. Una modificación es, por ejemplo, la unión de otro compuesto al extremo de la cadena lateral de un aminoácido. Por ejemplo, un compuesto de bajo o mediano peso molecular, tal como PEG o un glicano, puede unirse al extremo de la cadena lateral de lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, glutamina o tirosina, o puede unirse otro aminoácido.

30 El péptido anterior es, en una modalidad, un péptido cíclico. Por "péptido cíclico" se entiende un péptido en el que dos aminoácidos están unidos y cuya totalidad o parte es cíclica. Ejemplos del péptido mencionado anteriormente incluyen aquellos en los que los aminoácidos en un péptido forman una estructura entrecruzada, aquellos en los que se forma una estructura cíclica mediante la formación de un anillo de lactama o una reacción de macrociclización, y aquellos que
35 tienen una estructura tipo péptido lasso. En otras palabras, el péptido cíclico puede tener una parte

con una estructura cíclica y puede tener una parte de cadena lineal.

Los péptidos generalmente tienen una baja estabilidad metabólica *in vivo*, y su gran tamaño dificulta su permeación a través de la membrana celular. Para abordar tales problemas, se ha adoptado una técnica de ciclización de péptidos. Se ha sugerido que la ciclización del péptido
5 aumenta la resistencia a proteasas y, por lo tanto, aumenta su estabilidad metabólica y restringe los cambios conformacionales, aumentando así su rigidez y mejorando la permeabilidad de membrana y la afinidad por una proteína objetivo.

En una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la que un aminoácido cloroacetilado (preferentemente el aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1))
10 está unido a un residuo de cisteína (incluyendo cisteína sustituida, tal como N-metilcisteína) contenido en el péptido. En una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la que un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1) está unido a un residuo de cisteína (incluyendo un residuo de cisteína opcionalmente sustituido o un compuesto que contiene un grupo -SH dentro de la estructura) contenido en el péptido. En una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la
15 que un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1) está unido a un residuo de cisteína (incluyendo cisteína sustituida, tal como N-metilcisteína) en la posición 13 contenido en el péptido. En una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la que un aminoácido N-terminal cloroacetilado (residuo de aminoácido en la posición 1) está unido al residuo de cisteína en la posición 13 contenido en el péptido o a un grupo -SH contenido en un compuesto (grupo) que tiene un grupo
20 -SH. Ejemplos del compuesto (grupo) que tiene un grupo -SH incluyen MeCt. La "cloroacetilación" también puede ser "haloacetilación" utilizando otro halógeno. Además, la "acetilación" también puede ser "acilación" por un grupo acilo distinto del grupo acetilo. En una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica obtenida al unir un residuo de aminoácido cloroacetilado en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1 a un residuo de cisteína incluido en el péptido.
25 En una modalidad, el péptido puede ser una estructura en la cual una secuencia de aminoácidos listada en cualquiera de las SEQ ID Nos. 1-103 y una cisteína o una cisteína sustituida contenida en el péptido están unidas mediante un grupo acetilo. Es decir, tal como se usa en el presente documento, por ejemplo, el término "péptido cíclico que consiste en la SEQ ID No. XX" incluye no solo la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. XX, sino también una estructura cíclica formada por la unión
30 de un grupo acetilo unido al aminoácido en la posición 1 contenido en la secuencia de aminoácidos con el S (átomo de azufre) contenido en una cisteína o cisteína sustituida o en un compuesto que tenga un grupo -SH.

Algunos aminoácidos descritos en el presente documento pueden estar modificados para la ciclización de un péptido. La presente invención también abarca aminoácidos que han sido
35 parcialmente modificados de esta manera. Por ejemplo, como se describió anteriormente, un grupo

cloroacetilo (grupo ClAc) puede añadirse al aminoácido N-terminal, y puede unirse a un residuo de cisteína o a un residuo de aminoácido que tenga un grupo –SH en el péptido para formar un anillo. Dichos diversos aminoácidos (naturales/no naturales) que contienen un grupo cloroacetilo también se incluyen dentro de los aminoácidos descritos en el presente documento.

5 Además, en una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la cual un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1) y un aminoácido C-terminal (aminoácido en la porción más C-terminal si uno o más residuos de aminoácidos, como un residuo en la posición 13 o 14, se añaden al lado C-terminal de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1) están unidos. En una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la cual un grupo amino de un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1) está unido a un grupo carboxilo de un aminoácido en la posición 13 incluido en el péptido. Además, en una modalidad, se añade un aminoácido adicional a un residuo de aminoácido en la posición 13, y puede formarse una estructura cíclica en la cual un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1) puede unirse, por ejemplo, a un residuo de aminoácido en la posición 14 o 15 obtenido añadiendo uno o más residuos de aminoácidos adicionales al residuo en la posición 13. En una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la cual un grupo amino de un residuo de aminoácido en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 1 incluida en el péptido está unido a un grupo carboxi de un residuo de aminoácido en la posición 14. Además, en una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la cual un grupo amino de un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1) está unido a un grupo funcional presente en el extremo de la cadena lateral de un aminoácido C-terminal incluido en el péptido.

En una modalidad, el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 2-54. En una modalidad, el péptido es un péptido cíclico que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 2-54. El péptido es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 2-54 o un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene de 1 a 13 o 14 (preferiblemente de 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 2 o 1) sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de residuos de aminoácidos en la misma. Cabe señalar que, para una secuencia a la cual se añaden residuos de aminoácidos, puede añadirse una secuencia con muchos más residuos de aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 14 residuos), siempre que la porción añadida sea un enlazador. Además, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de residuos de aminoácidos es, preferiblemente, por ejemplo, aquel que presenta actividad de unión a CA9.

Además, en una modalidad, el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 55-103. En una modalidad, el péptido es un péptido

cíclico que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 55-103. El péptido es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 55-103 o un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene de 1 a 13 o 14 (preferiblemente de 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 2 o 1) sustituciones, 5
deleciones, inserciones o adiciones de residuos de aminoácidos en la misma. Cabe señalar que, para una secuencia a la cual se añaden residuos de aminoácidos, puede añadirse una secuencia con muchos más residuos de aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 14 residuos), siempre que la porción añadida sea un enlazador. Además, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de residuos de aminoácidos es, preferiblemente, por 10
ejemplo, aquel que presenta actividad de unión a CA9. En una modalidad, el péptido de la presente invención no contiene un péptido que comprenda o consista en la SEQ ID No. 103.

Además, en una modalidad, el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 55-102. En una modalidad, el péptido es un péptido cíclico que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ 15
ID Nos. 55-103. El péptido puede ser un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 55-102 o un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene de 1 a 13 o 14 (preferiblemente de 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 2 o 1) sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de residuos de aminoácidos en la misma.

Además, en una modalidad, el péptido puede ser un péptido que consiste en la secuencia de 20
aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 2 o 21, o un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene de 1 a 13 o 14 (preferiblemente de 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 2 o 1) sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de residuos de aminoácidos en la misma.

El péptido puede contener uno o más residuos de aminoácidos adicionales además de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1. El péptido puede contener, sin limitación, uno o más 25
residuos de aminoácidos adicionales además de la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos. 2-54, 55-102 o 55-103.

El o los "residuos de aminoácidos adicionales" pueden estar incluidos en el péptido que forma la estructura cíclica, o el o los residuos de aminoácidos adicionales pueden añadirse como un enlazador desde el péptido cíclico. En una modalidad, pueden añadirse a una cadena lateral de un residuo de 30
aminoácido contenido en el péptido cíclico. El péptido y el número de enlaces amida (número y longitud de aminoácidos) en la porción peptídica no están limitados.

Además, puede añadirse un enlazador adicional al péptido cíclico. Ejemplos del enlazador incluyen el enlazador de aminoácidos descrito anteriormente (enlazador peptídico), un enlazador químico, un enlazador de ácido graso, un enlazador de ácido nucleico y un enlazador de cadena de 35
azúcar. El enlazador también puede ser un complejo de, por ejemplo, un enlazador químico y un

enlazador peptídico. El enlazador químico puede ser, por ejemplo, un enlazador PEG que consiste en 1-24 unidades de etilenglicol. El enlazador puede ser también un enlazador de ácido graso que contiene una porción química divalente derivada de un ácido graso. El enlazador de aminoácidos (peptídico) puede ser un enlazador que contenga al menos un aminoácido. Es posible utilizar, por ejemplo, un péptido rico en glicina, tal como un péptido que tenga la secuencia [Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n (donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6), como se describe en la Patente de EE. UU. No. 7,271,149, o un enlazador peptídico rico en serina descrito en la Patente de EE. UU. No. 5,525,491. También es posible utilizar un enlazador peptídico en el cual dos o más aminoácidos tales como K, dk, F, G, df, Nle, dnle o t4amCh y aminoácidos estén conectados. Cabe señalar que, en el enlazador peptídico, el enlace entre aminoácidos o entre un aminoácido y un enlazador químico puede estar unido a través de la cadena lateral del aminoácido. Un enlazador puede añadirse sin limitación para modificar las propiedades físicas (por ejemplo, la solubilidad) del péptido.

El enlazador puede añadirse en cualquier posición. Por ejemplo, puede unirse a un residuo de aminoácido ubicado en el lado C-terminal, o a un residuo de aminoácido contenido en un péptido cíclico. En una modalidad, el péptido anterior contiene un enlazador en el extremo C-terminal. Son preferidos aquellos unidos a una cadena lateral de un residuo de aminoácido contenido en un péptido cíclico o a compuestos que tengan un grupo Cys o -SH ubicado en el lado C-terminal, o unidos a cualquier residuo de aminoácido. Más preferidos son aquellos unidos a una cadena lateral de un residuo de aminoácido en la posición 1, 4, 8 o 11.

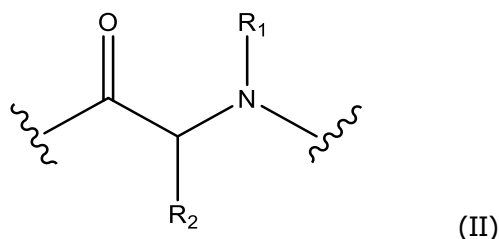
En una modalidad, el péptido es un péptido en el cual un enlazador y/o una carga útil puede unirse al extremo C-terminal del péptido.

En una modalidad, el péptido es un péptido en el cual un residuo de aminoácido en la posición 1, 4, 8 o 11, o un residuo de aminoácido o aminoácido adicional ubicado en el lado C-terminal, es un residuo de aminoácido al cual puede unirse un enlazador y/o una carga útil.

El residuo de aminoácido al cual puede unirse un enlazador y/o una carga útil puede ser un residuo de aminoácido que tenga un grupo funcional al cual un enlazador y/o una carga útil pueda unirse en el extremo de la cadena lateral del residuo de aminoácido, o un residuo de aminoácido que tenga un grupo funcional al cual un enlazador y/o una carga útil pueda unirse en el extremo de la cadena lateral o en el extremo C-terminal en el caso de un residuo de aminoácido ubicado en el lado C-terminal o un residuo de aminoácido adicional. Cabe señalar que la carga útil se describe más adelante.

En una modalidad, el residuo de aminoácido al cual puede unirse un enlazador y/o una carga útil tiene una estructura representada por la siguiente Fórmula (II):

[Fórmula Química 2]



en donde en la fórmula (II),

R₁ es H o un grupo alquilo de C₁₋₃;

R₂ es R₂: alquilo de C₁₋₆-NH-R₃, alquilo de C₁₋₆-arilo C₆-O-alquilo de C₁₋₃-NH-R₃, alquilo de C₁₋₆-NH(=O)-CH(alquilfenilo de C₁₋₆)-NH-R₃, alquilo de C₁₋₆-NH(=O)-CH(alquilo de C₁₋₆)-NH-R₃, o alquilo de C₁₋₆-NH(=O)-cicloalquilo de C₃₋₈-alquilo de C₁₋₃-NH-R₃, y

R₃ es H o cualquier grupo funcional.

R₃ es H o cualquier grupo funcional, incluidos grupos funcionales protegidos por cualquier grupo protector. La estructura debe ser tal que un enlazador y/o una carga útil pueda unirse a R₃.
 10 La estructura a la cual puede unirse un enlazador y/o una carga útil puede ser, por ejemplo, un grupo funcional como un grupo amida, o incluso un grupo funcional o compuesto conocido utilizado para unir un compuesto, tal como un compuesto alquino o un grupo azida utilizado en química click. Ejemplos del "grupo protector" incluyen, pero no están particularmente limitados a, un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), un grupo *tert*-butilo (tertBu), un grupo aliloxycarbonilo (Alloc) y
 15 un grupo *tert*-butoxycarbonilo (Boc).

Además, el péptido puede formar un multímero mediante, por ejemplo, un enlazador. El número de péptidos en el multímero no está limitado. En una modalidad, el multímero es un dímero, trímero, tetrámero, pentámero, hexámero, octámero o más. El multímero puede contener múltiples copias del mismo péptido o múltiples péptidos diferentes.

20 En una modalidad, el péptido anterior presenta preferiblemente actividad de unión a CA9.

CA9 se refiere a CA9 (Anhidrasa carbónica IX, anhidrasa carbónica-9) y es una de las 15 anhidrasas carbónicas, y es una proteína transmembrana homodimérica localizada en la membrana celular, desempeñando así un papel importante en el mantenimiento del pH intracelular, etc. Se sabe que CA9 se expresa bajo condiciones hipóxicas y es particularmente conocida por expresarse en
 25 cánceres específicos del tumor, cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, riñón, esófago, pulmón, mama, cerebro, tracto gastrointestinal, hígado, páncreas, cabeza y cuello, glándula salival, cavidad corporal y piel. Por lo tanto, se ha sugerido que CA9 es un marcador común de hipoxia tumoral en muchos tumores sólidos.

También se sabe que CA9 puede utilizarse no solo como un marcador para evaluar la
 30 presencia o ausencia de tumores y sus grados de malignidad, sino también como un marcador de mal pronóstico en tumores cervicales, rectales, mamarios, pulmonares y cerebrales.

El término "CA9" o "CA-9" tal como se usa en el presente documento se refiere a la anhidrasa carbónica-9 poseída por mamíferos, preferiblemente roedores como ratones y primates como humanos, a menos que se especifique lo contrario. Más preferiblemente, el término se refiere a la CA9 humana. Cabe señalar que el término "CA9 humana" en el presente documento se refiere al tipo natural de CA9 (por ejemplo, ID del gen: 768) poseído por humanos. Incidentalmente, se sabe que las secuencias de aminoácidos de, por ejemplo, la CA9 humana, de ratón y de rata son secuencias similares.

La actividad de unión a CA9 descrita en el presente documento indica la unión específica a CA9, especialmente a la CA9 humana. Tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, la actividad de unión a CA9 significa la actividad de unión a la CA9 humana.

El estado de unión del péptido de la presente invención a CA9 puede expresarse, sin limitación, utilizando como indicadores la constante de afinidad K_A , la constante de disociación K_D , la constante de velocidad de asociación k_{on} y la constante de velocidad de disociación k_{off} .

La constante de afinidad K_A y la constante de disociación K_D son indicadores de la afinidad de unión, es decir, la fuerza de asociación entre dos moléculas en equilibrio, y la constante de disociación K_D se obtiene invirtiendo la constante de afinidad K_A . Cuanto menor es el valor de la constante de disociación K_D , más fuerte es la unión. Mientras tanto, la velocidad de la reacción de asociación/disociación entre dos moléculas en equilibrio se indica mediante la constante de velocidad de asociación k_{on} y la constante de velocidad de disociación k_{off} , que se calculan mediante el análisis cinético de reacción. Aquí, $K_D = k_{off}/k_{on}$. Así, incluso en el caso de constantes de disociación K_D equivalentes, existen dos casos: uno es un caso de asociación lenta pero disociación lenta (ambos valores k_{on} y k_{off} son pequeños), y el otro es un caso de asociación rápida y disociación rápida (ambos valores k_{on} y k_{off} son grandes). Sus respectivos estados de retención de unión son bastante diferentes.

El estado de unión del péptido a CA9 puede expresarse utilizando la constante de afinidad K_A , la constante de disociación K_D , la constante de velocidad de asociación k_{on} y la constante de velocidad de disociación k_{off} . Pueden determinarse utilizando cualquier ensayo de interacción intermolecular bien conocido por los expertos en la materia.

El estado de unión del péptido a CA9 puede medirse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, el estado puede medirse mediante análisis espectral de resonancia de plasmones superficiales (SPR). Ejemplos del análisis espectral de resonancia de plasmones superficiales que pueden utilizarse incluyen, sin limitación, el sistema BIACORE (Cytiva), que es un biosensor (analizador de interacción biointermolecular).

Un índice de la actividad de unión a CA9 del péptido es la constante de disociación K_D . Cuanto menor es la constante de disociación K_D , mayor es la actividad de unión (afinidad). De acuerdo con el análisis espectral de resonancia de plasmones superficiales, la constante de disociación

KD para la unión del péptido a, por ejemplo, la CA9 humana no está limitada, pero es de 50 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos, 15 nM o menos, 10 nM o menos, 8 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos o 1 nM o menos. El límite inferior de la constante de disociación KD para la unión del péptido a la CA9 humana no está particularmente limitado. La constante de disociación KD del péptido no está limitada, pero es de 0.01 nM o más, 0.05 nM o más, 0.1 nM o más, 0.2 nM o más, 0.3 nM o más, 0.4 nM o más o 0.5 nM o más. La constante de disociación KD del péptido no está limitada, pero es de 0.01–50 nM, preferiblemente 0.05–30 nM, más preferiblemente 0.2–15 nM, particularmente preferiblemente 0.3–10 nM y muy preferiblemente 0.4–5 nM.

La unión del péptido a CA9 también puede examinarse mediante otros ensayos conocidos de medición de capacidad de unión, como ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). ELISA puede realizarse, por ejemplo, utilizando perlas de CA9 y el péptido con una secuencia de etiqueta HA añadida al extremo C-terminal para evaluar la actividad de unión. Por ejemplo, también puede utilizarse clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

La unión del péptido a CA9 no está limitada, pero es preferiblemente no covalente.

En una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica representada por una porción peptídica incluida en la fórmula química de cualquiera de los Ejemplos 1-1 a 1-16 y Ejemplos 11-1 a 11-5.

El péptido con actividad de unión a CA9 es eficaz en la evaluación, diagnóstico y/o tratamiento de diversas enfermedades mediadas por CA9.

En una modalidad, la presente invención se refiere al péptido anterior con actividad de unión a CA9.

En una modalidad, la presente invención se refiere al uso del péptido anterior para unirse a CA9.

En una modalidad, la presente invención se refiere al péptido anterior utilizado para unirse a CA9.

En la presente invención, la unión del péptido de la presente invención a CA9 es una unión *in vitro* o *in vivo*.

Los aspectos descritos en otras secciones también se aplican a esta sección, a menos que se indique lo contrario.

3. Producción del péptido

El péptido de la presente invención puede producirse mediante cualquier método conocido para la producción de péptidos. A modo de ejemplo, se incluyen los siguientes.

Los aspectos descritos en otras secciones también se aplican a esta sección, a menos que se indique lo contrario.

Un método de síntesis química, tal como un método en fase líquida, un método en fase sólida y un método híbrido en el cual se combinan los métodos en fase líquida y en fase sólida; y un método de recombinación genética, etc.

5 En el método en fase sólida, por ejemplo, el grupo hidroxilo de una resina hidroxilada se esterifica con el grupo carboxi del primer aminoácido, cuyo grupo α -amino está protegido por un grupo protector (generalmente el aminoácido C-terminal del péptido de interés). El catalizador de esterificación utilizado puede ser un agente de deshidratación-condensación conocido, tal como 1-mesitilenosulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT), diciclohexilcarbodiimida (DCC) o diisopropilcarbodiimida (DIC).

10 A continuación, se elimina el grupo protector del grupo α -amino del primer aminoácido y se añade un segundo aminoácido en el cual todos los grupos funcionales distintos del grupo carboxi de la cadena principal están protegidos, para activar el grupo carboxi, y se acoplan el primer y el segundo aminoácido. Posteriormente, se desprotege el grupo α -amino del segundo aminoácido y se añade un tercer aminoácido en el cual todos los grupos funcionales distintos del grupo carboxi de la cadena principal están protegidos, para activar el grupo carboxi, y se acoplan el segundo y el tercer aminoácido. Este procedimiento se repite hasta que se sintetiza un péptido de la longitud deseada, y luego se desprotegen todos los grupos funcionales.

20 Ejemplos de resinas para síntesis en fase sólida incluyen resina Merrifield, resina MBHA, resina Cl-Trt, resina SASRIN, resina Wang, resina Rink amida, resina HMFS, resina Amino-PEGA (Merck) y resina HMPA-PEGA (Merck). Estas resinas pueden lavarse con un solvente (por ejemplo, dimetilformamida (DMF), 2-propanol, cloruro de metileno) antes de su uso.

25 Ejemplos de grupos protectores para el grupo α -amino incluyen un grupo benciloxicarbonilo (Cbz o Z), un grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc), un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), un grupo bencilo, un grupo alilo y un grupo aliloxicarbonilo (Alloc). El grupo Cbz puede desprotegerse, por ejemplo, con ácido fluorhídrico o mediante hidrogenación; el grupo Boc puede desprotegerse con ácido trifluoroacético (TFA); y el grupo Fmoc puede desprotegerse mediante tratamiento con piperidina o pirrolidina.

El grupo α -carboxi puede protegerse utilizando, por ejemplo, éster metílico, éster etílico, éster alílico, éster bencílico, éster *tert*-butílico o éster ciclohexílico.

30 El grupo carboxi puede activarse utilizando un agente de condensación. Ejemplos del agente de condensación incluyen diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC o WSC), hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) y hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metil]-1H-benzotriazol-3-óxido (HBTU).

35 La cadena peptídica puede escindirse de la resina mediante tratamiento con un ácido tal

como TFA o ácido fluorhídrico (HF).

El péptido puede producirse mediante un método de recombinación genética (sistema de traducción-síntesis) utilizando un ácido nucleico que codifique el péptido descrito anteriormente. El ácido nucleico que codifica el péptido puede ser ADN o ARN.

- 5 El ácido nucleico que codifica el péptido puede prepararse mediante un método conocido o un método equivalente. Por ejemplo, el ácido nucleico puede sintetizarse con un sintetizador automático. El ADN resultante puede contener uno o más sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para la inserción en un vector. Alternativamente, puede incorporarse una secuencia de nucleótidos que codifique una secuencia de aminoácidos, de modo que la cadena peptídica resultante
10 pueda escindirse mediante una enzima u otros medios.

Para inhibir la degradación por proteasas derivadas del hospedero, también puede utilizarse un método de expresión de proteína quimérica, en el cual un péptido objetivo se expresa como un péptido quimérico con otro péptido. En este caso, puede utilizarse, como el ácido nucleico anterior, un ácido nucleico que codifique el péptido objetivo y un péptido fusionado al péptido objetivo.

- 15 Posteriormente, se prepara un vector de expresión utilizando el ácido nucleico que codifica los péptidos. El ácido nucleico puede incorporarse aguas abajo del promotor del vector de expresión tal cual, o mediante digestión con una o más enzimas de restricción, o mediante la adición de un enlazador, etc. Ejemplos del vector incluyen: un plásmido derivado de *E. coli* (por ejemplo, pBR322, pBR325, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19, pUC118, pBluescript II); un plásmido derivado de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB110, pTP5, pC1912, pTP4, pE194, pC194); un plásmido derivado de levadura (por ejemplo, pSH19, pSH15, YEp, YRp, YIp, YAC); un bacteriófago (por ejemplo, el e-fago, fago M13); un virus (por ejemplo, retrovirus, virus vaccinia, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, baculovirus); o un cósmido, etc.
20

- El promotor puede seleccionarse, según corresponda, de acuerdo con el tipo de hospedero. Si el hospedero es una célula animal, por ejemplo, puede utilizarse un promotor derivado de SV40 (virus simio 40) o un promotor derivado de CMV (citomegalovirus). Si el hospedero es *E. coli*, pueden utilizarse, por ejemplo, el promotor trp, el promotor T7 o el promotor lac.
25

- El vector de expresión puede tener, por ejemplo, un origen de replicación de ADN (ori), un marcador de selección (por ejemplo, resistencia a antibióticos, requerimiento nutricional), un potenciador, una señal de empalme, una señal de adición de poli-A y/o un ácido nucleico que codifique una etiqueta (por ejemplo, FLAG, HA, GST, GFP).
30

- A continuación, se transforma una célula hospedera apropiada con el vector de expresión. El hospedero puede seleccionarse, según corresponda, en vista de su relación con el vector. Ejemplos del hospedero utilizado incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, una bacteria perteneciente al género *Bacillus*, levadura, un insecto o célula de insecto, y una célula animal, etc. Ejemplos de células animales
35

utilizadas incluyen células HEK293T, células CHO, células COS, células de mieloma, células HeLa y células Vero. La transformación puede realizarse, según el tipo de hospedero, mediante un método conocido tal como lipofección, método de fosfato de calcio, electroporación, microinyección, pistola de partículas o cualquier otro método conocido. Los transformantes se cultivan según un procedimiento

5 rutinario para expresar un péptido de interés.

El péptido se purifica del cultivo del transformante recolectando las células cultivadas, suspendiendo las células en una solución tampón apropiada, destruyendo las células mediante, por ejemplo, sonicación o ciclos de congelación-descongelación, y luego centrifugando o filtrando para obtener un extracto crudo. Si el péptido se secreta en la solución de cultivo, se recolecta el

10 sobrenadante.

La purificación a partir del extracto crudo o del sobrenadante del cultivo también puede realizarse mediante un método conocido o un método equivalente (por ejemplo, cloración, diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, SDS-PAGE, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa).

15 Puede utilizarse un método conocido o un método equivalente para convertir el péptido resultante en forma libre a una sal, o el péptido en forma de sal a forma libre.

En una modalidad, el sistema de síntesis por traducción puede ser un sistema de traducción libre de células. El sistema de traducción libre de células generalmente permite obtener un producto expresado en una forma altamente pura sin purificación. El sistema de traducción libre de células

20 contiene, por ejemplo, proteínas ribosomales, aminoacil-ARNt sintetasa (ARS), ARN ribosómico, aminoácidos, ARNr, GTP, ATP, factor de iniciación de la traducción (IF), factor de elongación (EF), factor de terminación (RF) y factor de regeneración del ribosoma (RRF), y otros factores necesarios para la traducción. Puede añadirse extracto de *E. coli* o extracto de germen de trigo para aumentar la eficiencia de expresión. Además, también puede añadirse extracto de glóbulos rojos de conejo o

25 extracto de células de insecto.

La energía puede suministrarse continuamente al sistema que los contiene mediante diálisis para producir, sin limitación, varios cientos de µg a varios mg/ml de la proteína. El sistema también puede incluir ARN polimerasa para la transcripción a partir del ADN génico. Como sistema de traducción libre de células comercialmente disponible que puede utilizarse, ejemplos del sistema

30 derivado de *E. coli* incluyen el RTS-100 (marca registrada) de Roche Diagnostics, el PURESYSYSTEM de Gene Frontier o el Kit de Síntesis de Proteínas *In Vitro* PURExpress de NEW ENGLAND Biolabs; y los ejemplos del sistema que utiliza extracto de germen de trigo incluyen los de ZOEGENE Corporation y CellFree Sciences.

En el sistema de traducción celular, en lugar del aminoacil-ARNt sintetizado por la

35 aminoacil-ARNt sintetasa natural, puede utilizarse un aminoacil-ARNt artificial en el cual el aminoácido

o ácido hidroxilado deseado está unido (acilado) al ARNt. Dicho aminoacil-ARNt puede sintetizarse utilizando una ribozima artificial.

Ejemplos de dicha ribozima incluyen flexizyme, un ribozima artificial (H. Murakami, H. Saito y H. Suga, (2003), Chemistry & Biology, Vol. 10, 655-662; y WO 2007/066627, etc.). El flexizyme también se conoce y denomina como Flexizyme original (Fx) o como una forma modificada tal como dinitrobenzylflexizyme (dFx), Flexizyme mejorado (eFx) o aminoflexizyme (aFx).

Mediante el uso del ARNt generado por flexizyme, al cual está unido el aminoácido o hidroxácido deseado, puede asociarse el codón deseado con el aminoácido o hidroxácido deseado para la traducción. Puede utilizarse un aminoácido especial como el aminoácido deseado. Por ejemplo, el aminoácido no natural requerido para la ciclización descrita anteriormente también puede introducirse en el péptido unido mediante este método.

El péptido puede sintetizarse químicamente utilizando diversos métodos rutinariamente utilizados en la técnica. Ejemplos del método incluyen síntesis paso a paso en fase sólida, semisíntesis de fragmentos peptídicos mediante religación asistida conformacionalmente y ligación química. La síntesis del péptido es una síntesis química utilizando diversas técnicas en fase sólida, como se describe, por ejemplo, en K. J. Jensen, P. T. Shelton, S. L. Pedersen, Peptide Synthesis y Applications, 2ª edición, Springer, 2013. La estrategia preferida se basa en una combinación de un grupo Fmoc que protege temporalmente el grupo α -amino y permite su eliminación selectiva mediante una base, y un grupo protector que protege temporalmente el grupo funcional de la cadena lateral y es estable bajo condiciones de-Fmoc. La selección de dicha cadena lateral de péptidos se describe en el mencionado Peptide Synthesis y Applications, 2ª edición, y en G. B. Fields, R. L. Noble, Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 1990, 161-214, etc. Ejemplos del grupo protector preferido para la cadena lateral del péptido incluyen: un grupo bencilo, *tert*-butilo o tritilo (Trt) para el grupo hidroxilo de serina o treonina; un grupo 2-bromobenciloxi-carbonilo o *tert*-butilo para el grupo hidroxilo de tirosina; un grupo Boc, metiltetrazol tior (Mtt), Alloc o ivDde para el grupo amino de la cadena lateral de lisina; un grupo Trt o Boc para el grupo imidazol de histidina; un grupo 2,2,4,6,7-pentametildihidrobencofurano-5-sulfonilo (Pbf) para el grupo guanidilo de arginina; un grupo *tert*-butilo, alilo o 3-metilpentano (Mpe) para el grupo carboxilo de, por ejemplo, ácido glutámico o ácido aspártico; un grupo Trt para el grupo carboxamida de glutamina o asparagina; y un grupo Trt o monometoxitritilo (Mmt) para el grupo tior de cisteína.

El péptido puede sintetizarse de manera paso a paso sobre la resina en fase sólida descrita anteriormente. Los grupos protectores α -amino del aminoácido C-terminal utilizado y de todos los aminoácidos y péptidos utilizados en la síntesis deben eliminarse selectivamente durante el procedimiento sintético. Preferiblemente, se utiliza la resina en fase sólida descrita anteriormente para iniciar el procedimiento. El grupo carboxilo C-terminal del péptido con el extremo N-terminal

protegido adecuadamente con un grupo Fmoc, etc., o el grupo carboxilo C-terminal de un aminoácido protegido con el grupo Fmoc, se convierte en un éster activado con un reactivo apropiado y luego se une al grupo amino de la resina en fase sólida. La elongación subsiguiente de la cadena peptídica puede lograrse repitiendo secuencialmente la eliminación del grupo protector N-terminal (grupo Fmoc),
 5 seguida de la condensación con un derivado de aminoácido protegido, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del péptido de interés. Cabe señalar que el péptido de interés puede liberarse en la etapa final. Por ejemplo, como condiciones de liberación, puede utilizarse una solución de TFA que contenga agua/sililhidruro/tiol como captador (*scavenger*) en TFA, tal como se describe, por ejemplo, en Teixeira, W. E. Benckhuijsen, P. E. de Koning, A. R. P. M. Valentijn, J. W. Drijfhout, Protein Pept.
 10 Lett. 2002, 9, 379-385. Un ejemplo típico es TFA/Agua/TIS/DODT (relación en volumen 92.5:2.5:2.5:2.5).

El péptido descrito en el presente documento puede sintetizarse utilizando un sintetizador de péptidos de un solo canal o multicanal, como el sintetizador Liberty Blue de CEM o el sintetizador Syro I de Biotage, o sus sucesores.

15 El grupo carboxi puede activarse utilizando un agente de condensación. Ejemplos del agente de condensación incluyen diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC o WSC), hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) y hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metil]-1H-benzotriazol-3-óxido (HBTU).

20 El péptido puede ciclizarse mediante un método conocido. Por ejemplo, el péptido puede diseñarse para contener dos o más residuos de cisteína, de modo que pueda formarse una estructura cíclica mediante un enlace disulfuro después de la traducción, pero no se limita a esto. Además, puede utilizarse el método de Goto (Y. Goto, *et al.*, ACS Chem. Biol. 3, 120-129 (2008)) para sintetizar un péptido con un grupo cloroacetilo en el extremo N-terminal mediante una técnica de reprogramación
 25 del código genético. En el péptido, puede colocarse un residuo de cisteína que contenga un átomo de azufre para la ciclización. Esto provoca el ataque nucleofílico espontáneo del grupo mercapto sobre el grupo cloroacetilo después de la traducción, y el péptido es ciclizado mediante un enlace tioéter. Otras combinaciones de aminoácidos que se unen para formar un anillo pueden colocarse, para la ciclización, dentro del péptido mediante la técnica de reprogramación del código genético.
 30 Alternativamente, el péptido puede ciclizarse colocando un residuo de ácido L-2-aminoadípico en el péptido y uniéndolo al grupo amino de la cadena principal del N-terminal. Alternativamente, el péptido puede ciclizarse uniendo, mediante un enlace amida, un grupo amida de un residuo de aminoácido en el lado N-terminal a un grupo carboxi de un residuo de aminoácido en el lado C-terminal. Además, el péptido puede ciclizarse uniendo un grupo amino de un aminoácido N-terminal (residuo de
 35 aminoácido en la posición 1) a un grupo funcional presente en el extremo de la cadena lateral de un

aminoácido C-terminal incluido en el péptido. De este modo, puede utilizarse sin restricción cualquier método de ciclización conocido.

Los aspectos descritos en otras secciones también se aplican a esta sección, a menos que se indique lo contrario.

5 4. Conjugado (Complejo)

La presente invención se refiere a un complejo que contiene un péptido y una carga útil (también denominado a veces "conjugado de péptido", "complejo de péptido" o simplemente "conjugado"), y a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El péptido en el conjugado incluye todas las formas (incluyendo sales, isómeros, solvatos, etc.) tal como se describe en la sección "2. Péptido". Las referencias en el presente documento a "conjugado de péptido", "conjugado" o "complejo de péptido" incluyen también referencias a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un isómero o un solvato del mismo, siempre que no exista contradicción particular.

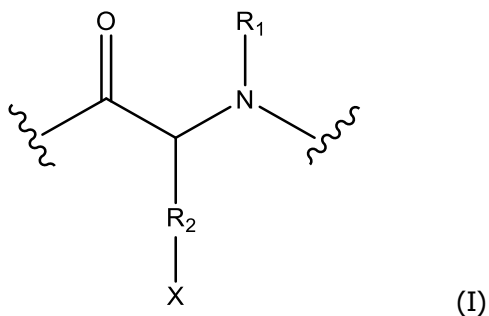
En una modalidad, el conjugado de la presente invención representa un complejo en el cual el péptido de la presente invención y una carga útil están unidos con o sin un enlazador.

15 En una modalidad, en el conjugado de la presente invención, una cadena lateral de un residuo de aminoácido en el péptido de la presente invención está unida, con o sin un enlazador, a una carga útil.

En una modalidad, en el conjugado de la presente invención, el residuo de aminoácido en la posición 13 en la SEQ ID No. 1 está unido, con o sin un enlazador, a cualquier carga útil.

20 En una modalidad, en el conjugado de la presente invención, el residuo de aminoácido en la posición 1, 4, 8 o 11 en la SEQ ID No. 1 está unido a una carga útil como se muestra en la siguiente fórmula (I):

[Fórmula Química 3]



25 en donde en la fórmula (I),

R₁ es H o un grupo alquilo de C₁₋₃;

R₂ es alquilo de C₁₋₆-NH-, alquilo de C₁₋₆-arilo de C₆-O-alquilo de C₁₋₃-NH-, alquilo de C₁₋₆-NH(=O)-CH(alquilfenilo de C₁₋₆)-NH-, alquilo de C₁₋₆-NH(=O)-CH(alquilo de C₁₋₆)-NH-, o alquilo de C₁₋₆-NH(=O)-cicloalquilo de C₃₋₈-alquilo de C₁₋₃-NH-; y

30 X es cualquier carga útil.

Cabe señalar que, con respecto a R_2 , alquilo de C_{1-6} -NH- es un residuo en una forma modificada en la cual la cadena alquilo está extendida en el residuo de K y en la cadena lateral de K; alquilo de C_{1-6} -arilo de C_6 -O-alquilo de C_{1-3} -NH- es un residuo en una forma modificada en la cual la cadena alquilo está extendida en el residuo de dyae y en la cadena lateral de dyae; alquilo de C_{1-6} -NH(=O)-CH(alquilfenilo de C_{1-6})-NH- es un residuo en un compuesto formado uniendo una forma modificada, en la cual la cadena alquilo está extendida en el residuo de dk-df y en la cadena lateral de dk, a una forma modificada en la cual la cadena alquilo está extendida en la cadena lateral de df; alquilo de C_{1-6} -NH(=O)-CH(alquilo de C_{1-6})-NH- es un residuo en un compuesto formado uniendo una forma modificada, en la cual la cadena alquilo está extendida en el residuo de dk-dnle y en la cadena lateral de dk, a una forma modificada en la cual la cadena alquilo está extendida o acortada en la cadena lateral de dnle; y alquilo de C_{1-6} -NH(=O)-cicloalquilo de C_{3-8} -alquilo de C_{1-3} -NH- es un residuo en un compuesto formado uniendo una forma modificada, en la cual el grupo alquilo está extendido en el residuo de dk-t4amCh y en la cadena lateral de dk, a una forma modificada en la cual el número de átomos de carbono contenidos en la estructura cicloalquilo de la cadena lateral de t4amCh está aumentado o disminuido.

Cabe señalar que

[Fórmula Química 4]



en el compuesto (I) indica que el grupo carboxi o el grupo amida está unido a un grupo amida o carboxi de un residuo de aminoácido adyacente en la secuencia de aminoácidos.

El término alquilo de C_{1-3} se refiere a un grupo monovalente derivado de un grupo hidrocarburo alifático saturado de C_{1-3} lineal o ramificado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno opcional. Ejemplos específicos incluyen metilo, etilo, n-propilo e isopropilo.

El término alquilo de C_{1-6} se refiere a un grupo monovalente derivado de un hidrocarburo alifático saturado de C_{1-6} lineal o ramificado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno opcional. Ejemplos específicos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, 1-metilpropilo, n-pentilo, isopentilo, 2-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo y 4-metilpentilo.

El término alquilfenilo de C_{1-6} se refiere a una estructura obtenida uniendo un grupo fenilo a un grupo monovalente derivado de un hidrocarburo alifático saturado de C_{1-6} lineal o ramificado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno opcional.

El término cicloalquilo de C_{3-8} se refiere a un grupo monovalente derivado de un hidrocarburo alifático saturado cíclico de C_{3-8} mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno opcional.

Cabe señalar que el término "conjugado" de la presente invención incluye, pero no sin

limitarse a, los conjugados representados por el Conjugado No. 1-81, tales como los Conjugados Nos. 1-69 y 74-81, y también incluye conjugados en los cuales las cargas útiles en dichos conjugados se sustituyen por cargas útiles diferentes. El conjugado sustituido por una carga útil diferente puede ser, por ejemplo, un conjugado en el cual la carga útil (DOTA, DOTALu, SulfoCy5, DOTAZr, DOTALu-df, DOTALu-dnle, DOTALu-t4amCh, DOTALu-F, DOTALu-Nle, SulfoCy5-PEG8c, DOTACu, DOTAGA, dDOTAGA, rNOTAGA, DOTA-#Ga (Ga (galio) unido a DOTA) y DOTALa (La (lantano) unido a DOTA)) de los Conjugados Nos. 1-81 mostrados en el Cuadro 8 o el Cuadro 18 (en una modalidad, los Conjugados No. 1-69 y 74-81) se sustituye por otra carga útil.

El conjugado descrito como el Conjugado No. 1 puede, por ejemplo, modificarse de modo que la carga útil sulfoCy5 unida al enlazador G-PEG10c-K sea sustituida por un quelante tal como DOTA, o en el conjugado, un elemento radiactivo esté adicionalmente unido al quelante tal como DOTA. Alternativamente, en el conjugado, el sulfoCy5 puede unirse a una carga útil distinta de un radioisótopo, tal como un anticuerpo. Además, por ejemplo, en el conjugado descrito como el Conjugado No. 2, la carga útil, es decir, un quelante DOTA unido mediante el enlazador K, puede estar adicionalmente unida a un radioisótopo. Por ejemplo, en el conjugado descrito como el Conjugado No. 4, la carga útil, es decir, un quelante DOTA unido mediante el enlazador K, puede estar unida a ¹⁷⁷Lu, que es un radioisótopo, en lugar de Lu (lutecio no radiactivo).

Carga útil

En la presente invención, la carga útil se refiere a una molécula funcional conocida. La molécula funcional es una molécula que exhibe una función deseada cuando se une o actúa sobre un objetivo, sin restricción particular. Ejemplos de la función deseada incluyen, en una modalidad, una función farmacológicamente activa, una función de marcaje y una función de entrega a un sitio objetivo. Cabe señalar que ejemplos de la "carga útil" incluyen un compuesto farmacológicamente activo, un compuesto marcado, una sustancia fluorescente, un péptido, una proteína, un ácido nucleico y una molécula utilizada en un sistema de administración de fármacos, y la molécula puede ser un compuesto de bajo peso molecular, un compuesto de peso molecular medio o un compuesto de alto peso molecular.

El compuesto farmacológicamente activo se refiere a un compuesto que tiene actividad farmacológica. El compuesto farmacológicamente activo es preferiblemente, por ejemplo, un compuesto de alto peso molecular (por ejemplo, un anticuerpo, una proteína, un ácido nucleico), un compuesto de peso molecular medio (por ejemplo, un péptido) y un compuesto de bajo peso molecular que tenga actividad farmacológica. Además, el compuesto puede proporcionarse de modo que un compuesto de bajo peso molecular con actividad farmacológica, etc., esté incluido en un liposoma o micela, etc.

Asimismo, la "carga útil" en el presente documento incluye cualquier agente citotóxico que

sea tóxico para las células y, en particular, que las destruya. Ejemplos incluyen, sin limitación, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiانترacenodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dihidrotestosterona, glucocorticoide, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, así como sus análogos u homólogos. Además, el término "carga útil" en el presente documento también incluye agentes terapéuticos con actividad anticancerígena, incluyendo, pero sin limitarse a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina); agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, *cis*-diclorodiaminoplatino(II) (DDP), es decir, cisplatino); antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente denominada "daunomicina"), doxorubicina); antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente denominada "actinomicina"), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC)); y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina, vinblastina). En una modalidad preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico. En otra modalidad, el agente terapéutico es un agente inmunosupresor. En otra modalidad adicional, el agente terapéutico es GM-CSF. En una modalidad preferida, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

El compuesto marcado en el presente documento se refiere a un compuesto marcado con un colorante, una sustancia fluorescente, una etiqueta o un radioisótopo. Entre ellos, el compuesto marcado con radioisótopo se refiere a un compuesto (por ejemplo, un compuesto de bajo peso molecular, de peso molecular medio o un anticuerpo) marcado con un radioisótopo. El compuesto marcado puede ser un colorante, una sustancia fluorescente, una etiqueta o un radioisótopo en sí mismo. El radioisótopo puede estar coordinado con un quelante tal como DOTA.

El radioisótopo en el presente documento puede ser cualquier radioisótopo conocido. En una modalidad, ejemplos del radioisótopo incluyen, pero no se limitan a, actinio-225, actinio-227 (^{225}Ac , ^{227}Ac), astato-211 (^{211}At), bismuto-212 y bismuto-213 (^{212}Bi , ^{213}Bi), cobre-61, cobre-62, cobre-64 y cobre-67 (^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu), galio-64, galio-67 y galio-68 (^{64}Ga , ^{67}Ga y ^{68}Ga), indio-111 (^{111}In), yodo-123, yodo-124, yodo-125 o yodo-131 (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I), plomo-203, plomo-212 (^{203}Pb , ^{212}Pb), rutenio-97 (^{97}Ru), lutecio-177 (^{177}Lu), radio-223 (^{223}Ra), samario-153 (^{153}Sm), escandio-44 y escandio-47 (^{44}Sc , ^{47}Sc), hierro-52 (^{52}Fe), arsénico-72, arsénico-76 (^{72}As , ^{76}As), erbio-169 (^{169}Er), estroncio-89, estroncio-90 (^{89}Sr , ^{90}Sr), tecnecio-99, tecnecio-94 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{94\text{m}}\text{Tc}$), itrio-86 y itrio-90 (^{86}Y , ^{90}Y), cromo-51 (^{51}Cr), renio-186, renio-188 (^{186}Re , ^{188}Re), circonio-89 (^{89}Zr), manganeso-52, manganeso-51 (^{52}Mn , ^{51}Mn), terbio-149, terbio-152, terbio-155, terbio-161 (^{149}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb , ^{161}Tb), iterbio-169, iterbio-175 (^{169}Yb , ^{175}Yb), rodio-105 (^{105}Rh), disprosio-166 (^{166}Dy), holmio-166 (^{166}Ho),

samarium-153 (^{153}Sm), prometio-149 (^{149}Pm), prometio-151 (^{151}Pm), tulio-172 (^{172}Tm), estaño-121 (^{121}Sn), praseodimio-142, praseodimio-143 (^{142}Pr , ^{143}Pr), oro-198, oro-199 (^{198}Au , ^{199}Au), bromo-75, bromo-76, bromo-77, bromo-80, bromo-82 (^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{80}Br , ^{82}Br), flúor-18 (^{18}F), escandio-43, escandio-44, escandio-47 (^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{47}Sc), astato-211 (^{211}At), torio-227, torio-226 (^{227}Th , ^{226}Th),
 5 lantano-140 (^{140}La), rubidio-82 (^{82}Rb), fósforo-32 (^{32}P), plata-111 (^{111}Ag) y erbio-165 (^{165}Er).

Tal como se usa en el presente documento, el término "quelante" se refiere a un compuesto orgánico que se une a un ion metálico para formar una estructura de complejo cíclico con el fin de unirse de manera estable a un radioisótopo, particularmente un radioisótopo metálico. En una modalidad, ejemplos del quelante incluyen EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), DPTA (ácido dietilentriaminopentaacético),
 10 1,4,8,11-tetraazatetradecano, ácido 1,4,8,11-tetraazatetradecano-1,4,8,11-tetraacético, 1-oxa-4,7,12,15-tetraazaheptadecano-4,7,12,15-tetraacético, DOTAGA (ácido α -(2-carboxietil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) (incluyendo la forma racémica rDOTAGA), TMT
 15 (6,6"-bis[N,N",N'''-tetra(carboximetil)aminometil]-4'-(3-amino-4-metoxifenil)-2,2':6',2"-terpiridina), DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N'''-tetraacético), TCMC (derivado tetra-amida primaria de DOTA), DO3A (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris(ácido acético)-10-(2-tioetil)acetamida), CB-DO2A (4,10-bis(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecano), NOTA (ácido
 20 1,4,7-triazaciclononano-triacético), Diamsar (3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6]eicosano-1,8-diamina), DTPA (ácido pentético o ácido dietilentriaminopentaacético), CHX-A"-DTPA (ácido [(R)-2-amino-3-(4-isotiocianatofenil)propil]-trans-(S,S)-ciclohexano-1,2-diamina-pentaacético), TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético), Te2A
 25 (4,11-bis(carboximetil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano), HBED, DFO (deferroxamina), DFOsq (DFO-escuaramida), HOPO (3,4,3-(LI-1,2-HOPO)), y NODAGA (ácido 1,4,7-triazaciclononano-1-glutámico-4,7-acético) (incluyendo la forma racémica rNODAGA), y formas modificadas de los mismos. Es preferido DOTA, DOTAGA o NODAGA. Si existen isómeros ópticos en cada quelante, están incluidos.

30 En una modalidad, la carga útil es preferiblemente un radioisótopo coordinado con un quelante. Por ejemplo, sin limitación, pueden incluirse estructuras en las cuales un isótopo radiactivo de lutecio, circonio, cobre o galio está coordinado con DOTA.

En una modalidad, la carga útil puede ser un radioisótopo no coordinado con un quelante. El compuesto puede ser uno utilizado para métodos de evaluación o imagen utilizando un radioisótopo.
 35 Por ejemplo, sin limitación, puede ser un compuesto conocido que contiene un radioisótopo, el cual se

utiliza como un agente de imagen por radioligando en tomografía por emisión de positrones (por ejemplo, PET, SPECT), como se describe a continuación. Por ejemplo, sin limitación, el compuesto puede ser ^{18}F -fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG), ^{15}O - H_2O , ^{11}C -metionina, ^{11}C -ácido acético, ^{11}C -colina, ^{11}C -racloprida, ^{11}C -flumazenil, ^{13}N -amoníaco, ^{18}F -fluoruro de sodio, $^{82}\text{Rb}+$ ($^{82}\text{RbCl}$), ^{18}F -flurpiridaz, ^{123}I -IMP, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO, ^{123}I -iomazenil, ^{123}I -ioflupano, ^{111}In -DTPA, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, $^{201}\text{Tl}+$ ($^{201}\text{TlCl}$), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmina, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -albúmina sérica humana, ^{131}I -adosterol, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -fitato, ^{90}Y -zevalin, $^{67}\text{Ga}+$ ($^{67}\text{GaC}_6\text{H}_5\text{O}_7$), ^{111}In -ibritumomab tiuxetan, ^{111}In -pentetreotida, o similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína" se refiere a cualquier proteína que exista *in vivo* o que exhiba una función útil *in vivo*. Ejemplos incluyen proteínas que tienen actividad farmacológica y proteínas que tienen actividad de reconocimiento molecular. Específicamente, ejemplos incluyen fibronectina, avidina, anticuerpos, proteínas que tienen una región Fc, proteínas de puntos de control inmunitario y enzimas tales como enzimas proteolíticas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a cualquier polímero de nucleótidos. Ejemplos específicos incluyen ADN y/o ARN. Tal como se usa en el presente documento, el ácido nucleico puede estar modificado. Ejemplos de tales modificaciones incluyen modificación 2'-metoxietilo (MOE), uso de 2'-desoxinucleósidos en ARN, enlaces internucleósido mediante enlaces fosforotioato, enlaces internucleósido mediante enlaces fosfodiéster y conversión de citosina a 5-metilcitosina.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sistema de administración de fármacos" se refiere a un sistema para administrar un ingrediente activo a una célula objetivo. Ejemplos incluyen polímeros solubles en agua, partículas de tamaño nanométrico (nanoesferas) y portadores tales como liposomas y micelas. La molécula del sistema de administración de fármacos (DDS) puede contener un medicamento adicional tal como un compuesto de bajo peso molecular, una proteína, un péptido, un ácido nucleico y/o una vacuna.

En una modalidad, la presente invención se refiere al conjugado anterior con actividad de unión a CA9.

En una modalidad, la presente invención se refiere al uso del conjugado anterior para unirse a CA9.

En una modalidad, la presente invención se refiere al conjugado anterior utilizado para unirse a CA9.

En la presente invención, la unión del conjugado de la presente invención a CA9 es una unión *in vitro* o *in vivo*.

Los aspectos descritos en otras secciones también se aplican a esta sección, a menos que se indique lo contrario.

5. Composición, etc.

La presente invención también se refiere a una composición que contiene un péptido o conjugado de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La composición no está limitada y puede ser una composición farmacéutica (una composición médica),
 5 una composición diagnóstica o una composición de investigación. En una modalidad, la composición farmacéutica es una composición utilizada en radioterapia (una modalidad de composición terapéutica).

La presente invención también se refiere a un agente de imagen que contiene el conjugado de la presente invención. El agente de imagen también puede utilizarse como una composición diagnóstica. En una modalidad, la composición diagnóstica es un agente de imagen.

10 Los aspectos descritos en otras secciones también se aplican a esta sección, a menos que se indique lo contrario.

Composición farmacéutica

En una modalidad, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene el péptido o conjugado anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En una modalidad, la composición farmacéutica anterior tiene actividad de unión a CA9.

En una modalidad, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

El término "enfermedad o síntoma asociado a CA9" incluye enfermedades o síntomas asociados a CA9 conocidos. Ejemplos incluyen tumores, especialmente tumores malignos y tumores
 20 sólidos.

En una modalidad, ejemplos de la enfermedad asociada a CA9 incluyen tumores del cuello uterino y útero, mama, ovario, tracto digestivo (incluyendo esófago, estómago, intestino delgado, colon y recto), riñón, hígado, vesícula biliar y sistema biliar, páncreas (incluyendo conducto pancreático y páncreas exocrino), pulmón, cabeza y cuello, glándulas salivales, vejiga y tracto urinario, cavidad
 25 corporal, origen epitelial, etc. Los ejemplos también incluyen cánceres de cabeza y cuello, ovario, trompa de Falopio, peritoneo, vagina, vulva, pene, cuello uterino, miometrio, endometrio, glándula tiroides, glándula suprarrenal, próstata, piel y sus anexos; malignidades hematológicas; malignidades limítrofes incluyendo trastornos hematológicos premalignos y malignidades hematológicas de linaje linfoide y enfermedades relacionadas; malignidades hematológicas de linaje mieloide y enfermedades
 30 relacionadas; tumores de origen mesenquimal; tumores del sistema nervioso central o periférico; tumores endocrinos; tumores del ojo y sus anexos; tumores de células germinales y trofoblásticos; y tumores pediátricos y embrionarios. Preferiblemente, el cáncer incluye, sin limitación, carcinoma de células renales, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma urotelial, carcinoma ductal pancreático y cáncer de colon, etc.

35 En una modalidad, la composición farmacéutica es una composición utilizada en radioterapia

(una modalidad de composición terapéutica). En este caso, un componente en la composición farmacéutica contiene un radioisótopo. Preferiblemente, es un conjugado que contiene un radioisótopo como carga útil. Cabe señalar que la radioterapia es un método de tratamiento en el cual la irradiación con radiación o la administración de una sustancia emisora de radiación al área afectada daña el ADN y otras sustancias en las células de un tumor, especialmente cáncer, y mata las células.

La composición farmacéutica puede contener el péptido o el conjugado en sí, y puede contener una sal farmacéuticamente aceptable del péptido, o un isómero o un solvato del mismo. Los términos "péptido" y "conjugado" en el presente documento pueden incluir una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un isómero o un solvato del mismo, a menos que se especifique lo contrario. La composición farmacéutica contiene preferiblemente una cantidad eficaz del péptido o conjugado como ingrediente activo.

La forma de dosificación de la composición farmacéutica en el presente documento no está particularmente limitada y puede administrarse por vía oral o parenteral. Ejemplos de la administración parenteral incluyen una inyección (por ejemplo, una inyección intramuscular, intravenosa o subcutánea) y la administración transdérmica o transmucosa (nasal, oral, ocular, transpulmonar, transvaginal, rectal).

La composición farmacéutica puede modificarse de varias maneras en vista de las características de fácil metabolización o fácil excreción del polipéptido. Por ejemplo, puede añadirse polietilenglicol (PEG) o una cadena de azúcar al polipéptido para aumentar el tiempo de permanencia en sangre y disminuir la antigenicidad. Además, por ejemplo, un compuesto de polímero biodegradable (por ejemplo, ácido poliláctico glicólico (PLGA)), hidroxiapatita porosa, liposoma, liposoma modificado en superficie, una emulsión preparada con ácido graso insaturado, nanopartículas o nanoesferas pueden utilizarse como material base de liberación sostenida, y el polipéptido puede encapsularse en ellos. Para la administración transdérmica, puede aplicarse una corriente eléctrica débil a la superficie de la piel para la permeación del estrato córneo (método de iontoforesis).

La composición farmacéutica puede convertirse en una preparación utilizando el ingrediente activo tal cual, o añadiendo un portador, excipiente y/o aditivo farmacéuticamente aceptable, etc. Ejemplos de la forma de dosificación incluyen líquido (por ejemplo, una inyección), dispersión, suspensión, tabletas, píldoras, polvo, supositorios, *pulvis*, partículas finas, gránulos, cápsulas, jarabe, pastillas, inhalante, ungüento, gotas oftálmicas, gotas nasales, gotas óticas y cataplasma. La preparación puede elaborarse mediante un procedimiento rutinario utilizando, por ejemplo, un excipiente, un aglutinante, un desintegrante, un lubricante, un agente disolvente, un auxiliar de disolución, un colorante, un agente corrector del olor, un estabilizador, un emulsionante, un potenciador de absorción, un tensoactivo, un modificador de pH, un conservante y/o un antioxidante,

según corresponda.

Ejemplos de los componentes utilizados para la formulación incluyen, pero no se limitan a, agua purificada, solución salina, tampón fosfato, dextrosa, glicerol, un solvente orgánico farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, etanol), aceite animal o vegetal, lactosa, manitol, glucosa, sorbitol, celulosa cristalina, hidroxipropil celulosa, almidón, almidón de maíz, sílice anhidra, silicato de aluminio y magnesio, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilato de sodio, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, almidón carboximetil sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma arábica, tragacanto, caseína, agar, polietilenglicol, diglicerina, glicerina, propilenglicol, vaselina, parafina, miristato de octildodecilo, miristato de isopropilo, alcoholes superiores, alcohol estearílico, ácido esteárico y albúmina sérica humana.

En vista del hecho de que los péptidos son generalmente difíciles de absorber por vía transmucosa, la composición farmacéutica puede contener un potenciador de absorción para mejorar la absorción de un agente de baja absorbibilidad. Ejemplos de tal potenciador de absorción incluyen: un tensoactivo (por ejemplo, un compuesto de lauril éter de polioxietileno, lauril sulfato de sodio, saponina); una sal de ácido biliar (por ejemplo, ácido glicólico, ácido desoxicólico, ácido taurocólico); un quelante (por ejemplo, EDTA, ácido salicílico); un compuesto de ácido graso (por ejemplo, ácido caproico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, una micela mixta); o un derivado de enamina, un péptido de colágeno N-acilo, un N-acilaminoácido, un compuesto de ciclodextrina, un compuesto de quitosano y un donador de óxido nítrico.

Si la composición farmacéutica es una píldora o una tableta, puede estar recubierta con un recubrimiento de azúcar o una sustancia soluble en el estómago o soluble en el intestino.

Si la composición farmacéutica es una inyección, puede contener agua destilada para inyección, solución salina fisiológica, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y/o un compuesto alcohólico, etc.

Además, es posible añadir un agente humectante, un emulsionante, un dispersante, un estabilizador, un agente disolvente, un auxiliar de disolución y/o un conservante, etc.

La composición farmacéutica puede estar dirigida no solo a humanos sino también a mamíferos no humanos o aves. Ejemplos de los mamíferos no humanos incluyen primates no humanos (por ejemplo, monos, chimpancés, gorilas), animales domésticos (por ejemplo, cerdos, vacas, caballos, ovejas), o perros, gatos, ratas, ratones, cobayos y conejos, etc.

En particular, la dosis cuando se administra a un humano varía dependiendo de los síntomas, la edad, el sexo, el peso corporal y la sensibilidad del paciente, así como del método de administración, el intervalo de administración, el tipo de ingrediente activo y el tipo de preparación. La dosis no está limitada y la dosis de, por ejemplo, de 30 µg a 100 g, de 100 µg a 500 mg, o de 100 µg a 100 mg puede

administrarse en una o varias porciones separadas. Para inyección, pueden administrarse de 1 µg/kg a 3000 µg/kg o de 3 µg/kg a 1000 µg/kg una vez o en varias dosis separadas dependiendo del peso corporal del paciente.

5 En una modalidad, la presente invención se refiere a un método para prevenir o tratar una enfermedad o síntoma asociado a CA9 mediante la administración de un péptido o conjugado de la presente invención (que comprende una sal farmacéuticamente aceptable, isómero o solvato del mismo). El método de tratamiento de la presente invención comprende, sin limitación, un paso de administrar un péptido o conjugado de la presente invención a un sujeto. El sujeto de administración y el método de administración son sustancialmente los mismos que los descritos en la sección 10 "composición farmacéutica". Además, sin limitación, el método de tratamiento de la presente invención está destinado a administrar un ingrediente farmacéuticamente activo a cualquier sitio objetivo (área afectada) utilizando el péptido o conjugado de la presente invención, y comprende un paso de administrar el péptido o conjugado de la presente invención a un sujeto.

15 En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de un péptido o conjugado de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para prevenir o tratar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de un péptido o conjugado de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

20 En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de un péptido o conjugado de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

En una modalidad, la presente invención se refiere a un péptido o conjugado de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para ser utilizado en un método de 25 prevenir o tratar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

En una modalidad, la presente invención se refiere a un péptido o conjugado de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para ser utilizado como una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

Composición diagnóstica y agente de imagen

30 La presente invención también se refiere a una composición diagnóstica que comprende un péptido o conjugado de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para diagnosticar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

El péptido o conjugado de la presente invención también puede utilizarse como una composición para diagnosticar una enfermedad o síntoma asociado a CA9. Como agente diagnóstico, 35 puede ser un agente de detección para determinar si un sujeto padece una enfermedad o síntoma

asociado a CA9, para diagnosticar la gravedad de la enfermedad o para predecir un mal pronóstico de la enfermedad. Cuando se utiliza como agente de detección, el péptido o conjugado puede estar marcado de forma detectable, puede ser un conjugado que contiene una carga útil detectable o puede ser un conjugado que contiene un agente de imagen conocido como carga útil.

5 La presente invención incluye, en una modalidad, un agente de imagen que contiene el conjugado. El agente de imagen también puede utilizarse como una composición diagnóstica. En una modalidad, la composición diagnóstica es un agente de imagen. Tal como se usa en el presente documento, el "agente de imagen" es un compuesto que tiene una o más propiedades que permiten detectar directa o indirectamente su presencia y/o localización, permitiendo realizar una imagen
10 diagnóstica. Ejemplos de tal agente de imagen incluyen una proteína, un péptido, un compuesto de peso molecular medio o pequeño y un radioisótopo en sí mismo, todos los cuales incorporan un motivo de marcaje que permite la detección.

La porción de marcaje que permite la detección puede ser, por ejemplo, una enzima tal como peroxidasa o fosfatasa alcalina; un radioisótopo (que puede estar coordinado con un quelante o unido
15 a un compuesto tal como glucosa); una sustancia fluorescente tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, cloruro de dansilo, ficoeritrina, isotiocianato de tetrametilrodamina, amidita de fluoresceína (FAM), eosina, carboxifluoresceína, eritrosina, carboxitetrametilrodamina (TAMRA), tetrametilrodamina (TMR), sulforodamina o materiales fluorescentes en el infrarrojo cercano; o una sustancia luminiscente tal como luciferasa, luciferina o aequorina. Alternativamente, también puede
20 utilizarse un anticuerpo marcado con tal sustancia luminiscente o similar. Además, puede utilizarse un anticuerpo marcado con nanopartículas tales como coloides de oro y puntos cuánticos para la detección.

Por ejemplo, puede prepararse un complejo del anticuerpo y el péptido, y el anticuerpo o el péptido pueden marcarse para formar un complejo marcado. Mediante la administración y detección
25 del complejo marcado, puede determinarse la gravedad o similar de una enfermedad o síntoma asociado a CA9. Asimismo, en inmunoensayo, el péptido puede marcarse con biotina y detectarse uniendo la biotina a avidina o estreptavidina marcadas con, por ejemplo, una enzima.

Entre los inmunoensayos, un ELISA que utiliza marcaje enzimático es preferido debido a su simplicidad y medición rápida del antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo se inmoviliza en un portador
30 de fase sólida, se añade una muestra y se deja reaccionar, y luego se añade el péptido marcado y se deja reaccionar. Después del lavado, puede someterse a una reacción con un sustrato enzimático para el revelado, y la absorbancia puede medirse para detectar la gravedad o similar de una enfermedad o síntoma asociado a CA9. Después de la reacción de la muestra con el anticuerpo inmovilizado en el portador de fase sólida, puede añadirse un péptido no marcado, y el anticuerpo
35 contra el péptido puede marcarse con una enzima y añadirse adicionalmente. El anticuerpo puede

inmovilizarse sobre o dentro de la superficie del portador de fase sólida.

El sustrato enzimático utilizado puede ser, por ejemplo, 3,3'-diaminobencidina (DAB), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) u o-fenilendiamina (OPD) en el caso en que la enzima sea peroxidasa, y puede ser, por ejemplo, p-nitrofenil fosfato (pNPP) en el caso de fosfatasa alcalina.

5 El "portador de fase sólida" en el presente documento no está limitado siempre que el portador pueda utilizarse para inmovilizar el anticuerpo. Ejemplos incluyen una placa de microtitulación, un sustrato o una perla hecha de vidrio, metal o resina, y una membrana de nitrocelulosa, nailon o PVDF. La sustancia objetivo puede inmovilizarse en el portador de fase sólida de acuerdo con un método conocido.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "imagen diagnóstica" incluye técnicas de imagen tales como inmunohistoquímica y tinción por inmunofluorescencia; técnicas de imagen óptica tales como tomografía por emisión de positrones (PET, incluyendo PET-CT) y tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT); y técnicas de imagen diagnóstica (molecular) no invasiva incluyendo imagen por resonancia magnética (MRI), nanopartículas de óxido de hierro y
15 nanopartículas de hierro-cobalto recubiertas de carbono. El agente de imagen de la presente invención puede utilizarse para cualquier imagen diagnóstica seleccionando apropiadamente una porción de marcaje que permita la detección. Preferiblemente, es un agente de imagen para uso en PET, PET-CT o SPECT, que es imagen óptica. En una modalidad, la presente invención se refiere a un agente de imagen por radioligando que contiene un conjugado de la presente invención y se utiliza
20 para tomografía por emisión de positrones.

La presente invención también se refiere a un kit diagnóstico que comprende un péptido o conjugado de la presente invención. El kit diagnóstico comprende un reactivo y una herramienta (incluyendo, pero sin limitarse a, cualquiera o todos los siguientes: el péptido o conjugado de la presente invención, un anticuerpo, un portador de fase sólida, solución tampón, solución de detención
25 de reacción enzimática y/o un lector de microplacas) necesarios para la detección anterior.

La presente invención se refiere a un método de diagnosticar una enfermedad o síntoma asociado a CA9, el método comprendiendo usar un péptido o conjugado de la presente invención. El "método de diagnóstico" incluye métodos de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*. El método de la presente invención comprende, sin limitación, un paso de administrar un péptido o conjugado de la presente
30 invención a un sujeto o a una muestra obtenida del sujeto. El método de la presente invención comprende, sin limitación, un paso de administrar un péptido o conjugado de la presente invención a un sujeto o a una muestra obtenida del sujeto, y detectar la unión del péptido o conjugado de la presente invención a CA9. El sujeto de administración y el método de administración son sustancialmente los mismos que los descritos en la sección "Composición farmacéutica". Ejemplos
35 de la "muestra obtenida del sujeto" incluyen sangre, orina, heces, fluido lagrimal, secreción nasal y

secciones de tejido.

La presente invención también se refiere a un método de detectar una enfermedad mediante el uso del péptido o conjugado de la presente invención. La enfermedad puede detectarse, por ejemplo, por técnicos de laboratorio o investigadores distintos de médicos, en institutos de
5 investigación (incluyendo instituciones educativas tales como universidades) y empresas, etc. En una modalidad, el método de detectar una enfermedad no incluye tratamiento médico. El método de diagnóstico utiliza preferiblemente PET, PET-CT o SPECT.

La presente invención se refiere al uso de un péptido o conjugado de la presente invención para diagnosticar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

10 La presente invención se refiere al uso de un péptido o conjugado de la presente invención para la fabricación de una composición diagnóstica para diagnosticar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

La presente invención se refiere al uso de un péptido o conjugado de la presente invención como una composición diagnóstica para diagnosticar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

15 La presente invención se refiere a un péptido o conjugado de la presente invención en uso de un método de diagnosticar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

La presente invención se refiere a un péptido o conjugado de la presente invención en uso como una composición diagnóstica para diagnosticar una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

20 La presente invención también se refiere a un probador que comprende un péptido o conjugado de la presente invención. La presente invención también se refiere a un probador diagnóstico o de detección que comprende un péptido o conjugado de la presente invención.

Composición de investigación

La presente invención también se refiere a una composición de investigación que comprende un péptido o conjugado de la presente invención. La "composición de investigación" incluye aquellas
25 utilizadas, por ejemplo, por investigadores, técnicos, estudiantes o médicos en institutos de investigación (incluyendo instituciones educativas tales como universidades), empresas y hospitales, etc.

La composición de investigación puede utilizarse, por ejemplo, para la detección de CA9 o la detección de una enfermedad o síntoma asociado a CA9.

30 El portador para inmovilizar el péptido o conjugado en el presente documento no está particularmente limitado. Ejemplos incluyen una placa de microtitulación, un sustrato o una perla hecha de vidrio, metal o resina, y una membrana de nitrocelulosa, nailon o PVDF.

La presente invención también incluye un método de detectar CA9 mediante el uso de un péptido o conjugado de la presente invención. El "método de detección" incluye métodos de
35 detección *in vivo* o *in vitro*. El método de la presente invención comprende, sin limitación, un paso

de administrar un péptido o conjugado de la presente invención a un sujeto o a una muestra obtenida del sujeto. El método de la presente invención comprende, sin limitación, un paso de administrar un péptido o conjugado de la presente invención a un sujeto o a una muestra obtenida del sujeto, y detectar la unión del péptido o conjugado de la presente invención a CA9. El sujeto de administración y el método de administración son sustancialmente los mismos que los descritos en la sección "Composición farmacéutica". Ejemplos de la "muestra obtenida del sujeto" incluyen sangre, orina, heces, fluido lagrimal, secreción nasal y secciones de tejido.

La presente invención también incluye el uso de un péptido o conjugado de la presente invención para la detección de CA9.

La presente invención también se refiere a un kit diagnóstico o de detección que comprende un péptido o conjugado de la presente invención. El kit diagnóstico o de detección comprende un reactivo y una herramienta (incluyendo, pero sin limitarse a, cualquiera o todos los siguientes: el péptido de la presente invención, un anticuerpo, un portador de fase sólida, solución tampón, solución de detención de reacción enzimática y/o un lector de microplacas) necesarios para la detección anterior.

En una modalidad, la presente invención incluye un método de administrar cualquier carga útil a un sujeto mediante el uso de un péptido o conjugado de la presente invención. El método de la presente invención comprende, sin limitación, un paso de producir un conjugado que contiene un péptido de la presente invención y cualquier carga útil y administrar el péptido a un sujeto. El sujeto de administración y el método de administración son sustancialmente los mismos que los descritos en la sección "Composición farmacéutica".

En una modalidad, la presente invención se refiere a un método de usar un péptido o conjugado de la presente invención para administrar cualquier carga útil a cualquier parte (área afectada) de un sujeto. En el método de la presente invención, un método de administrar a cualquier parte de un sujeto comprende, sin limitación, un paso de producir un conjugado que contiene un péptido de la presente invención y cualquier péptido y administrar el péptido al sujeto. El sujeto de administración y el método de administración son sustancialmente los mismos que los descritos en la sección "Composición farmacéutica".

Los aspectos descritos en otras secciones también se aplican a esta sección, a menos que se indique lo contrario.

7. Método de ensayo

La presente invención también se refiere a un método de ensayo de un péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende ensayar al menos uno de:

- a) solubilidad en un solvente;
- b) actividad de unión a CA9;
- c) toxicidad celular y/o tisular; o

d) toxicidad para un animal de experimentación, en donde el péptido o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo es el péptido o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también se refiere a un método de ensayo de un conjugado que
5 comprende ensayar un conjugado en términos de al menos uno de:

- a) solubilidad en un solvente;
- b) actividad de unión a CA9;
- c) toxicidad celular y/o tisular; o
- d) toxicidad para un animal de experimentación, en donde

10 el conjugado es un conjugado de la presente invención.

La "solubilidad en un solvente" puede medirse utilizando métodos conocidos. Al medir la solubilidad, el solvente no está limitado y puede seleccionarse libremente dependiendo del propósito previsto. En cuanto al método de medición de la solubilidad, cualquiera de los métodos conocidos puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del tipo de solvente. Sin limitación, la solubilidad
15 puede ser la solubilidad obtenida cuando el péptido o conjugado se disuelve en un solvente conocido tal como agua, glicerol, PBS o DMSO.

La "actividad de unión a CA9" puede medirse, por ejemplo, como se describe en "2. Péptido", etc.

La "toxicidad celular y/o tisular" puede medirse utilizando métodos conocidos. Por ejemplo,
20 el ensayo de la toxicidad celular y/o tisular puede ser un ensayo de evaluación de toxicidad conocido utilizando células y/o tejidos, y puede ser un método realizado *in vitro*. Las células y/o tejidos pueden ser, pero sin limitarse a, células y/o tejidos que normalmente se evalúan y ensayan para toxicidad de productos farmacéuticos.

La "toxicidad para un animal de experimentación" puede medirse utilizando métodos
25 conocidos. Por ejemplo, el o los animales de experimentación no están particularmente limitados siempre que sean aquellos comúnmente utilizados, y ejemplos de los mismos incluyen ratones, ratas, cobayos, jerbos, hámsters, hurones, conejos, perros, gatos, cerdos, cabras, caballos, ganado vacuno, aves (por ejemplo, pollos, codornices), monos y primates no humanos (por ejemplo, monos cynomolgus, titíes, monos rhesus).

Además, los ensayos de evaluación de toxicidad anteriores pueden ser, sin limitarse a ello,
30 estudios de seguridad que se llevan a cabo habitualmente en estudios no clínicos de productos farmacéuticos. Ejemplos incluyen estudios de toxicidad general (estudios de toxicidad de dosis única y de dosis repetida), estudios de genotoxicidad (ensayo de Ames, ensayo de aberración cromosómica, ensayo de micronúcleos *in vitro*), estudios de carcinogenicidad, estudios de toxicidad reproductiva y
35 del desarrollo (ICH-I, II, III), estudios de irritación local (estudios de irritación ocular y cutánea), otros

estudios de toxicidad (ensayo de sensibilización cutánea, ensayo de fototoxicidad, ensayo de antigenicidad) y evaluaciones químicas y bioanalíticas (TK/PK).

Los aspectos descritos en otras secciones también se aplican a esta sección, a menos que se indique lo contrario.

5 8. Uso Combinado, Combinación

El péptido o conjugado de la presente invención puede utilizarse en combinación con un medicamento para prevenir o tratar otra enfermedad o síntoma asociado a CA9. En una modalidad, la presente invención se refiere a una combinación del péptido o conjugado y un medicamento para prevenir o tratar otra enfermedad o síntoma asociado a CA9.

10 El péptido o conjugado y un medicamento para prevenir o tratar otra enfermedad o síntoma asociado a CA9 pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente. Preferiblemente, el péptido o conjugado y un medicamento para prevenir o tratar otra enfermedad o síntoma asociado a CA9 se administran de manera que se logre un efecto aditivo de ambos, preferiblemente un efecto sinérgico. Cuando se administran secuencialmente, el orden de administración no importa. Cuando
15 se administran secuencialmente, es preferible, sin limitación, que ambos se administren dentro de 2 horas, dentro de 1 hora, dentro de 30 min, dentro de 20 min, dentro de 15 min, dentro de 10 min o dentro de 5 min.

Los aspectos descritos en otras secciones también se aplican a esta sección, a menos que se indique lo contrario.

20

EJEMPLOS

A continuación, la presente invención se describe con mayor detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a ellos. Los expertos en la materia
25 pueden realizar fácilmente modificaciones y cambios a la presente invención basándose en la descripción del presente documento, y estos están incluidos en el alcance técnico de la presente invención. Cabe señalar que los nombres de compuestos dados en los siguientes Ejemplos de Referencia y Ejemplos no siguen necesariamente la nomenclatura IUPAC. Asimismo, cabe señalar que pueden utilizarse abreviaturas para simplificar la descripción, pero estas abreviaturas son las
30 indicadas anteriormente.

Las materias primas, bloques de construcción, reactivos, ácidos, bases, resinas de fase sólida y solventes utilizados en la síntesis química de los compuestos eran productos comercialmente disponibles tal cual o, cuando se especifica de otro modo, se sintetizaron utilizando química orgánica. Cabe señalar que los aminoácidos que contienen grupos protectores eran productos comercialmente
35 disponibles tal cual.

En cuanto a la numeración de los residuos del péptido, el residuo de aminoácido que está modificado con ClAc se cuenta como residuo 1, y los residuos posteriores se cuentan como residuo 2, residuo 3, y así sucesivamente, hacia la resina. Los aminoácidos comunes utilizados se enumeran a continuación, y cada grupo protector de cadena lateral se indica entre paréntesis.

- 5 Fmoc-Ile-OH;
- Fmoc-Ser(Trt)-OH;
- Fmoc-Ser(tBu)-OH;
- Fmoc-His(Boc)-OH;
- Fmoc-Pro-OH;
- 10 Fmoc-Asp(OMpe)-OH;
- Fmoc-Glu(tBu)-OH;
- Fmoc-Y(tBu)-OH;
- Fmoc-Gly-OH;
- Fmoc-Cys(Trt)-OH;
- 15 Boc-Phe-OH;
- Fmoc-Lys(Boc)-OH.

Además, para los aminoácidos no naturales, se utilizaron los siguientes que aparecen en las abreviaturas.

- Fmoc-da-OH;
- 20 Fmoc-de(tBu)-OH;
- Fmoc-dgln(Trt)-OH;
- Fmoc-dhgl(tBu)-OH;
- Fmoc-dkCOPipzaa(tBu)-OH;
- Fmoc-Tbg-OH;
- 25 Fmoc-3Py6CON-OH;
- Fmoc-3Py6NH₂(Boc)-OH;
- Fmoc-Hgl(tBu)-OH;
- Fmoc-aIT(tBu)-OH;
- Fmoc-Hgn(Trt);
- 30 Fmoc-SMe-OH;
- Fmoc-DacAc-OH;
- Fmoc-KCOPipzaa(tBu)-OH;
- Fmoc-N-Me-da-OH;
- Fmoc-PeG-OH;
- 35 Fmoc-MeG-OH;

	Fmoc-MedkCOpipzaa(tBu)-OH;
	Fmoc-Ahp-OH;
	Fmoc-pHPeG(tBu)-OH;
	Fmoc-pMeOPeG-OH;
5	Fmoc-MsMeapG-OH;
	Fmoc-3OMePeG-OH;
	Fmoc-PpG-OH;
	Fmoc-pFPeG-OH;
	Fmoc-mCPeG-OH;
10	Fmoc-pCPeG-OH;
	Fmoc-4HPpG-OH;
	Fmoc-4OMePpG-OH;
	Fmoc-4PypG-OH;
	Fmoc-4COOPeG(tBu)-OH;
15	Fmoc-3COOPeG(tBu)-OH;
	Fmoc-3FPeG-OH;
	Fmoc-Hse(Trt)-OH;
	Fmoc-P4Sh(tBu)-OH;
	Fmoc-Qmm-OH;
20	Fmoc-Qdm-OH;
	Fmoc-QPEG8Me-OH;
	Fmoc-5Inda-OH;
	Fmoc-F4OMe-OH;
	Fmoc-HseMe-OH;
25	Fmoc-Acb-OH;
	Fmoc-dkAc-OH;
	Boc-df-OH;
	Boc-dnle-OH;
	Fmoc-t4amCh-OH;
30	Boc-Nle-OH;
	Fmoc-N-Me-Cys(Trt)-OH;
	Fmoc-N-Me-Ala-OH;
	Fmoc-N-Me-Ser(Trt)-OH;
	Fmoc-N-Me-Asn(Trt)-OH;
35	Fmoc-Hpr-OH;

Boc-PEG8c-OH;
 Fmoc-PEG10c-OH;
 Fmoc-dk(Boc)-OH;
 Fmoc-dp-OH;
 5 Fmoc-dyae(Boc)-OH;
 Alloc-dk(Fmoc)-OH;
 Boc-PEG8c-OH;
 Fmoc-de(Allyl)-OH;
 Fmoc-Hgl(Allyl)-OH;
 10 Fmoc-dk(Alloc)-OH;
 Fmoc-Qglucamina(acetonide)-OH.

La estructura de cada péptido sintetizado químicamente se determinó mediante ESI-MS(+) en espectrometría de masas para confirmar el peso molecular calculado considerando los aminoácidos utilizados de acuerdo con la secuencia objetivo y los bloques de construcción utilizados según fuera necesario. Cabe señalar que el término "ESI-MS(+)" indica espectrometría de masas por ionización por electropulverización realizada en modo de ion positivo. Las masas detectadas se reportan en unidades "m/z". Cabe señalar que cuando el peso molecular era aproximadamente mayor que 1000, el compuesto se detectaba frecuentemente como un ion divalente o trivalente.

20 **EJEMPLO 1**

Síntesis de Péptidos Cíclicos y Síntesis de Conjugados

El péptido sintetizado químicamente se identificó en función del tiempo de retención obtenido mediante cualquiera de los siguientes métodos analíticos (detección: a una longitud de onda UV de 225 nm; Shimadzu "SPD-M20A").

Condición analítica A

Columna: Kinetex (marca registrada) EVO C18 2.6 μm , 2.1 ID $\times$ 150 mm, 100 Å

Fase móvil: A = TFA al 0.025% en agua; B = TFA al 0.025% en CH_3CN

Temperatura: 60°C

30 Caudal: 0.5 ml/min

Gradiente: 20-60/7.15 min, 60-95/0.3 min.

Condición analítica B

Columna: Kinetex (marca registrada) EVO C18 2.6 μm , 2.1 ID $\times$ 150 mm, 100 Å

Fase móvil: A = TFA al 0.025% en agua; B = TFA al 0.025% en CH_3CN

35 Temperatura: 60°C

Caudal: 0.5 ml/min

Gradiente: 5-45/7.15 min, 45-95/0.3 min.

La elongación de la cadena peptídica sobre una resina de fase sólida se realizó por el método Fmoc utilizando una resina comercialmente disponible como material de partida. Específicamente, los péptidos objetivo se sintetizaron cada uno utilizando resina de amida Sieber (WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) comenzando con la eliminación del grupo Fmoc y repitiendo la introducción de cada aminoácido Fmoc y la desprotección del grupo Fmoc. A menos que se indique lo contrario, la elongación de la cadena peptídica se realizó mediante síntesis automatizada, y se utilizó Liberty Blue o Liberty Blue HT de CEM como sintetizador de fase sólida, y el péptido se sintetizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la introducción de cada residuo, se realizó un acoplamiento doble repitiendo la reacción de acoplamiento peptídico dos veces si fuera necesario. Por otro lado, para la introducción de algunos aminoácidos, la resina se retiró del sintetizador automático y la reacción se llevó a cabo utilizando reactivos preparados en el momento, etc. (acoplamiento manual).

Por ejemplo, a una cadena peptídica de la cual se había eliminado el grupo Fmoc y que estaba inmovilizada sobre una resina de fase sólida, se añadieron aproximadamente 4 equivalentes de aminoácidos Fmoc, aproximadamente 8 equivalentes de DIC y aproximadamente 4 equivalentes de Oxyma Pure, seguido de un paso de agitación 1-2 veces bajo una de las condiciones de reacción enumeradas en el cuadro siguiente, y luego la resina se lavó con DMF.

20

CUADRO 2

Método	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1-1	90	3-15
1-2	75	10-30
1-3	25-50	15-60
1-4	105	2-10

La eliminación del grupo Fmoc se realizó, por ejemplo, según el siguiente método. La cadena peptídica que estaba después de la introducción del aminoácido Fmoc y que estaba inmovilizada sobre una resina de fase sólida se agitó 1-2 veces bajo una de las condiciones mostradas en el cuadro siguiente, y luego la resina se lavó con DMF.

25

CUADRO 3

Método	Reactivo	Temperatura	Tiempo
2-1	Solución de piperidina al 20% en DMF	50-90°C	1-5 min
2-2	Solución de piperidina al 20% en DMF	Temperatura ambiente	1-5 min
2-3	Solución de pirrolidina al 4%/Oxyma Pure 83 mM en DMF	110°C	1-5 min
2-4	Solución de piperidina al 10-25% en DMF	50-90°C	1-5 min
2-5	Solución de piperidina al 10-25% en DMF	Temperatura ambiente	1-5 min

5 Siguiendo el método descrito anteriormente, la introducción de cada aminoácido Fmoc y la desprotección del grupo Fmoc se repitieron para elongar la cadena peptídica hasta la cadena peptídica deseada, y luego se introdujeron grupos cloroacetilo. El método de introducción es uno de los métodos enumerados en el cuadro siguiente. Después de eliminar el grupo Fmoc del péptido protegido con Fmoc inmovilizado en la resina de fase sólida tal como se obtuvo en el paso anterior, se añadió a la resina de fase sólida una solución que contenía aproximadamente 5-10 equivalentes de ácido cloroacético, aproximadamente 5-10 equivalentes del agente de condensación y 10 aproximadamente 5-10 equivalentes del aditivo en los siguientes solventes. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 a 60 min.

CUADRO 4

Método	Agente de condensación	Aditivo	Solvente
3-1	DIPCI(DIC)	HOSu	DMF/DCM
3-2	HATU	DIPEA	DMF
3-3	DIPCI	HOSu	DCM/NMP

15 La desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina de fase sólida se realizaron añadiendo uno de los cócteles de agentes de reacción (mezcla de TFA/H₂O/TIS/DODT) enumerados en el cuadro siguiente al péptido unido a la resina después de la introducción del grupo cloroacetilo, y agitando la resina a temperatura ambiente durante 30 a 120 min.

CUADRO 5

Método	TFA/H ₂ O/TIS/DODT(v/v/v/v)
4-1	92.5/2.5/2.5/2.5
4-2	90/2.5/2.5/5

La solución de reacción se filtró luego a través de una frita, se recogió y el filtrado se añadió a un solvente mixto (por ejemplo, 1/1, v/v) de exceso de éter diisopropílico o éter diisopropílico y hexano o éter dietílico y hexano enfriado a 0°C para formar un precipitado turbio. Para obtener este sólido precipitado, se realizó centrifugación y se decantó el sobrenadante. El sólido resultante se lavó

5 nuevamente con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado a 0°C y se secó bajo presión reducida.

El sólido obtenido anteriormente se utilizó en una reacción de ciclización peptídica. Para la reacción de ciclización peptídica, el péptido se disolvió en DMSO o en un solvente mixto de DMSO/H₂O, MeCN/H₂O o DMSO/MeCN/H₂O hasta una concentración final de 4 mM a 5 mM basada en el número de moles de resina de fase sólida, y se añadieron 5 a 35 equivalentes de trietilamina. La mezcla se

10 agitó luego a temperatura ambiente durante 2 horas a toda la noche. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida y luego se purificó.

El residuo obtenido se purificó mediante HPLC preparativa en fase inversa de acuerdo con uno de los métodos en el cuadro siguiente.

15 **CUADRO 6**

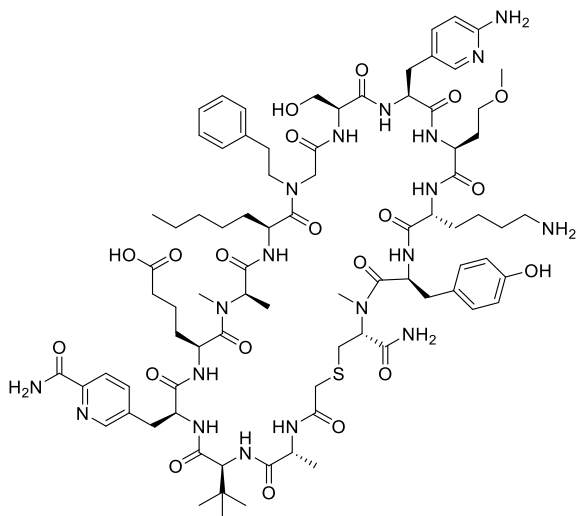
Método	Columna	Fase móvil A	Fase móvil B	Temperatura	Caudal
P-A	Waters XBridge (marca registrada), C18 5 µm, 50x150 mm	TFA al 0.1% en H ₂ O	TFA al 0.1% en CH ₃ CN	40°C	120 ml/min
P-B	Waters XBridge (marca registrada), C18 5 µm, 30x150 mm	TFA al 0.1% en H ₂ O	TFA al 0.1% en CH ₃ CN	40°C	45 ml/min
P-C	Waters XBridge (marca registrada), C18 5 µm, 50x250 mm	TFA al 0.1% en H ₂ O	TFA al 0.1% en CH ₃ CN	50°C	120 ml/min
P-D	Waters XSelect (marca registrada), C18 5 µm, 50x150 mm	TFA al 0.1% en H ₂ O	TFA al 0.1% en CH ₃ CN	40°C	120 ml/min

Las estructuras específicas de los péptidos y conjugados sintetizados, etc. se muestran a continuación.

Los Ejemplos 1-1 a 1-3 están relacionados con la síntesis de cada péptido.

EJEMPLO 1-1 Síntesis del Péptido SEQ ID No. 45

[Fórmula Química 5]



Se utilizó resina de amida Sieber (WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.; 0.60 mmol/g, 5 1.67 g) para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se utilizó Liberty Blue de CEM como sintetizador de fase sólida para la síntesis de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la eliminación del Fmoc en la resina de fase sólida, la reacción se llevó a cabo una vez con pirrolidina al 10% (en DMF) a 75°C durante 3 min.

Para la introducción de cada residuo, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1.0 M (en DMF)/Oxyma pure 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez durante 10 min a 75°C. Para la introducción de cada uno de los residuos 3 y 9, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en NMP)/DIC 1.0 M (en DMF)/Oxyma pure 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes), y para cada uno de los residuos 4 y 6, la reacción se llevó a cabo dos veces durante 20 min a 75°C. La reacción se llevó a cabo dos veces para el residuo 12 a 75°C durante 30 min. La reacción se llevó a cabo una vez para el residuo 13 a 50°C durante 30 min.

Después de la introducción de cada residuo, la reacción se llevó a cabo una vez durante 3 min a 75°C con pirrolidina al 4% + Oxyma pure 83 mM (en DMF) sobre la resina de fase sólida que tenía inmovilizado el péptido protegido con Fmoc para la eliminación del grupo Fmoc. La reacción se llevó a cabo dos veces para el residuo 4 utilizando una solución de DMF que contenía pirrolidina al 10% a temperatura ambiente durante 5 min. Para cada uno de los residuos 6 y 12, la reacción se llevó a cabo, utilizando solución de DMF con pirrolidina al 10%, una vez a temperatura ambiente durante 5 min y una vez durante 10 min.

El grupo Fmoc del grupo α -amino se eliminó mediante la reacción realizada una vez a 75°C durante 3 min utilizando solución de DMF con pirrolidina al 10% para la resina de fase sólida en la que

estaba inmovilizado el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior. Esto se agitó además con ClAcNHS 1.0 M (10 equivalentes en DMF) durante 60 min a temperatura ambiente para introducir el grupo cloroacetilo.

5 Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina de fase sólida, la resina obtenida después del paso de introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero una vez con DMF, cloruro de metileno y éter dietílico, y luego se secó bajo presión reducida. Posteriormente, la resina de fase sólida se dividió en aproximadamente la mitad. El cóctel de agentes de reacción (10 ml; una mezcla de TFA/H₂O/TIS/DODT en una proporción en volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5) se añadió a un recipiente de reacción, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. La solución de reacción se recogió por filtración a través de una frita. La resina de fase sólida restante en el
10 recipiente de reacción se agitó nuevamente con el cóctel para la escisión, y el componente de solución se recogió de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se dividió en 4 porciones y cada una se añadió a 40 ml de un solvente mixto de éter dietílico/hexano (1/1), se produjo un precipitado.

15 La mezcla resultante se centrifugó y luego se decantó la solución. El sólido resultante se lavó nuevamente con éter dietílico y luego se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se utilizó colectivamente en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se realizó disolviendo el péptido en agua/acetonitrilo (1/1) hasta una concentración final de 5 mM basada en el número de moles de la resina de fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; y agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 60 min.

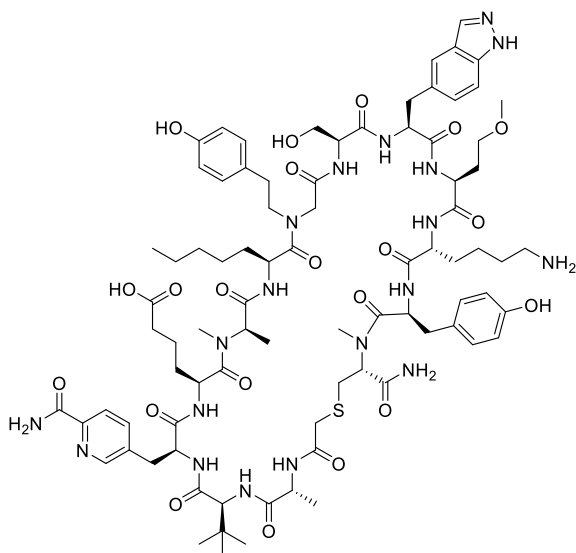
La reacción se detuvo añadiendo ácido acético a la solución de reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida utilizando el Genevac EZ-II Elite.

El producto crudo obtenido se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 µm 50 × 250 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua),
25 B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 4.2-0.0% durante 0.1 min, 0.0-0.0% durante 4.9 min, 0.0-4.2% durante 2 min, 4.2-28.6% durante 3 min, 28.6-33.7% durante 15 min, 33.7-60% durante 3 min; caudal: 118-18 ml/min durante 0.1 min, 18-18 ml/min durante 4.9 min, 18-118 ml/min durante 2 min, luego 118 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

30 La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 96.7%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 2.86 min

ESI-MS(+): observado m/z = 862.37 (M+2H)²⁺



Para la eliminación del Fmoc en la resina de fase sólida, la reacción se llevó a cabo una vez con pirrolidina al 10% (en DMF) a 75°C durante 3 min.

Para la introducción de cada residuo, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIPEA 1.0 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez durante 10 min a 75°C. Para la introducción de cada uno de los residuos 3 y 9, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en NMP)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIPEA 1.0 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes), y para cada uno de los residuos 4, 6 y 12, la reacción se llevó a cabo dos veces durante 10 min a 75°C. La reacción se llevó a cabo una vez para el residuo 13 a 40°C durante 30 min.

Después de la introducción de cada residuo, la reacción se llevó a cabo una vez durante 3 min a 75°C con pirrolidina al 4% + Oxyma pure 83 mM (en DMF) sobre la resina de fase sólida que tenía inmovilizado el péptido protegido con Fmoc para la eliminación del grupo Fmoc. Para cada uno de los residuos 4, 6 y 12, la reacción se llevó a cabo, utilizando solución de DMF con pirrolidina al 10%, dos veces a temperatura ambiente durante 5 min.

El grupo Fmoc del grupo α-amino se eliminó mediante la reacción realizada una vez a 75°C durante 3 min utilizando solución de DMF con pirrolidina al 10% para la resina de fase sólida en la que estaba inmovilizado el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior. Esto se agitó además con ClAcNHS 0.25 M (5 equivalentes en DMF) durante 60 min a temperatura ambiente para introducir el grupo cloroacetilo.

Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina de fase sólida, la resina obtenida después del paso de introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero una vez con DMF, cloruro de metileno y éter dietílico, y luego se secó bajo presión reducida. Posteriormente, la resina de fase sólida se dividió en aproximadamente la mitad. El cóctel de agentes de reacción (20 ml; 5 una mezcla de TFA/H₂O/TIS/DODT en una relación en volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5) se añadió entonces a un recipiente de reacción, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La solución de reacción se recogió por filtración a través de una frita. La resina de fase sólida restante en el recipiente de reacción se agitó nuevamente con el cóctel para la escisión, y el componente de solución se recogió de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se dividió en 8 10 porciones y cada una se añadió a 40 ml de un solvente mixto de éter diisopropílico/hexano (1/1), se produjo un precipitado.

La mezcla resultante se centrifugó y luego se decantó el sobrenadante. El sólido resultante se lavó nuevamente con éter dietílico y luego se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se utilizó colectivamente en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización 15 del péptido se realizó disolviendo el péptido en agua/acetonitrilo (1/1) hasta una concentración final de 2.5 mM basada en el número de moles de la resina de fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; y agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético a la solución de reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida utilizando el Genevac HT-12.

20 El producto crudo resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 µm 50 × 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (%B): 5.0-5.0% durante 2 min, 5.0-25.0% durante 1 min, 25.0-30.0% durante 8 min, 30.0-60.0% durante 1 min; caudal: 20-20 ml/min durante 1 min, 20-120 ml/min durante 1 min, luego 120 ml/min). Las fracciones que contenían el producto 25 objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 96.3%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 3.30 min
30 ESI-MS(+): observado m/z = 882.36 (M+2H)²⁺

equivalentes/5 equivalentes/10 equivalentes) se agitaron juntos durante 30 min a 25°C para introducir un grupo cloroacetilo.

Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina de fase sólida, la resina obtenida después del paso de introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero una vez con
 5 DMF, cloruro de metileno y éter dietílico, y luego se secó bajo presión reducida. El cóctel de agentes de reacción (14 ml; mezcla de TFA/H₂O/TIS/DODT en una relación en volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5) se añadió entonces al recipiente que contenía la resina de fase sólida, el cual se agitó a temperatura ambiente durante 60 min. La solución de reacción se recogió por filtración a través de una frita. La resina de fase sólida restante en el recipiente de reacción se agitó nuevamente con el cóctel para la
 10 escisión, y el componente de solución se recogió de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se dividió en 3 porciones y cada una se añadió a 40 ml de un solvente mixto de éter diisopropílico/hexano (1/1), se produjo un precipitado.

La mezcla resultante se centrifugó y luego se decantó la solución. El sólido resultante se lavó nuevamente con éter dietílico y luego se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido
 15 se utilizó colectivamente en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se realizó disolviendo el péptido en agua/DMSO (1/9) hasta una concentración final de 5 mM basada en el número de moles de la resina de fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; y agitando la mezcla a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético a la solución de reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión
 20 reducida utilizando el Genevac HT-12.

El producto crudo resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 µm 50 × 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (%B): 5.0-5.0% durante 2 min, 5.0-27% durante 1 min, 27-32% durante 8 min, 32-60% durante 1 min; caudal: 20-20 ml/min durante 1 min, 20-120 ml/min durante 1 min, luego 120 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron, y el producto objetivo se purificó nuevamente usando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 µm 30 × 150 mm; fase móvil: A = AcOH al 1.0% (en agua), B = AcOH al 1.0% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (%B): 2.0-19% durante 3 min, 19-24% durante 8 min, 24-60% durante 1 min; caudal: 45 ml/min). Las fracciones
 25 30 que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 99.6%.

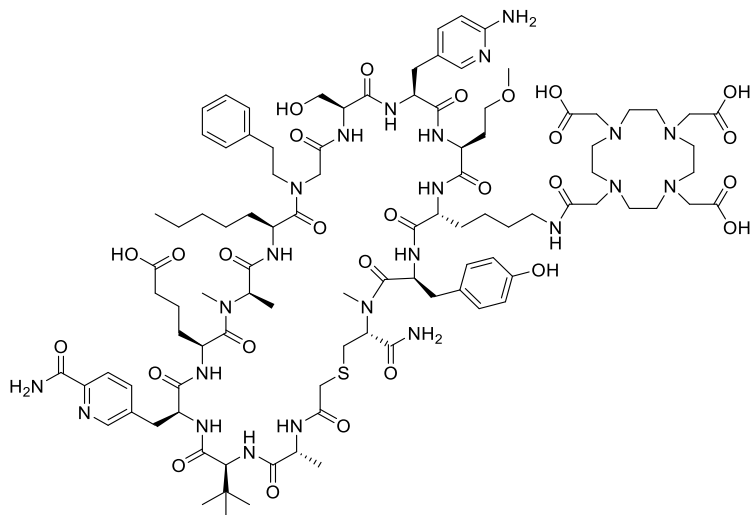
Condición analítica B: tiempo de retención = 5.71 min

35 ESI-MS(+): observado m/z = 855.30 (M+2H)²⁺

Los Ejemplos 1-4 a 1-16 están relacionados con la síntesis de cada conjugado.

EJEMPLO 1-4 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 64

[Fórmula Química 8]



En DMF (4.84 ml), se disolvieron el péptido SEQ ID No. 45 (secuencia: CIAC-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-PeG-S-3Py6NH₂-HseMe-dk-Y-MeC) (200 mg) sintetizado en el Ejemplo 1-1 y DIEA (225 mg), y se añadió DOTA-NHS éster hexafluorofosfato trifluoroacetato (147 mg) bajo enfriamiento con hielo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 min.

El producto crudo obtenido se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters
10 XSelect (marca registrada) C18 5µm 30 × 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA
al 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 4.0-0.0% durante 0.1 min, 0.0-0.0% durante
4.9 min, 0.0-4.0% durante 1 min, 4.0-28.5% durante 3 min, 28.5-33.6% durante 9 min, 33.6-60%
durante 1 min; caudal: 44-9 ml/min durante 0.1 min, 9-9 ml/min durante 4.9 min, 9-44 ml/min durante
1 min, luego 44 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se
15 liofilizaron para obtener el péptido de interés.

La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 97.3%.

Condición analítica B: tiempo de retención = 5.74 min
ESI-MS(+): observado m/z = 704.13 (M+3H)³⁺

EJEMPLO 1-5 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 62

[Fórmula Química 9]

5

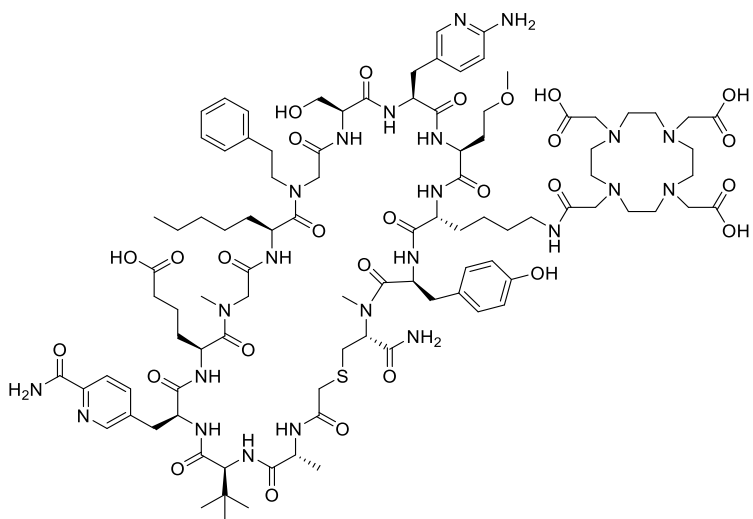
10

15

ESI-MS(+): observado $m/z = 717.38$ $(M+3H)^{3+}$

EJEMPLO 1-6 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 65

[Fórmula Química 10]



DOTA (0.42g, CAS: 60239-18-1), DIEA (0.14g) y N-hidroxisuccinimida (0.08g, CAS: 6066-82-6) se disolvieron en agua (3.3 ml). Posteriormente, bajo enfriamiento con hielo, se añadió clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0.13g, CAS: 25952-53-8), disuelto en agua (1.9 ml). La mezcla de reacción se agitó bajo enfriamiento con hielo durante 30 min.

En DMF (561 µl), se disolvieron el péptido SEQ ID No. 47 (secuencia: ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-MeG-Ahp-PeG-S-3Py6NH₂-HseMe-dk-Y-MeC) (23 mg) sintetizado en el Ejemplo 1-3 y DIEA (13.0 mg), y la solución preparada anteriormente (561 µl) se añadió bajo enfriamiento con hielo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió DIEA (13.0 mg) a la solución de reacción, la mezcla se agitó durante 1 hora, y luego la reacción se detuvo.

La mezcla de reacción resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 µm 19 × 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 5.0-28% durante 3 min, 28-33% durante 8 min, 33-60% durante 1 min; caudal: 17 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

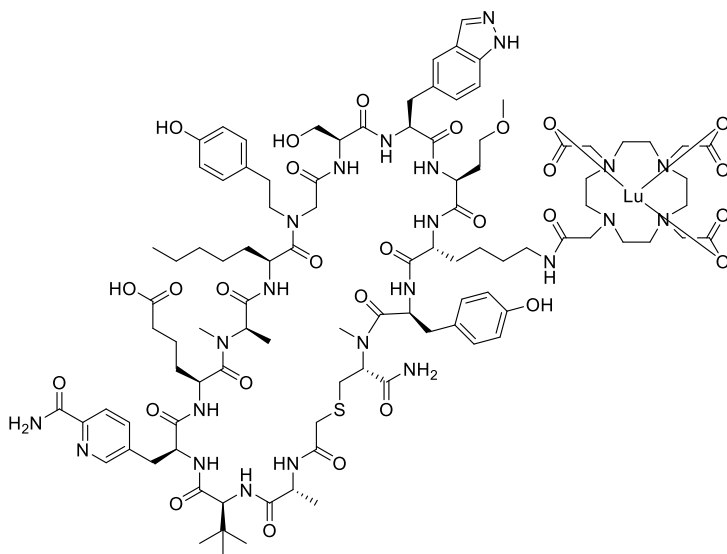
La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 97.6%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 3.14 min

ESI-MS(+): observado m/z = 699.33 (M+3H)³⁺

EJEMPLO 1-7 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 26

[Fórmula Química 11]



DOTA (0.79 g, CAS: 60239-18-1), DIEA (0.34 ml) y N-hidroxisuccinimida (0.15 g, CAS: 6066-82-6) se disolvieron en agua (7.2 ml). Posteriormente, bajo enfriamiento con hielo, se añadió clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0.25 g, CAS: 25952-53-8), disuelto en agua (4.17 ml). La mezcla de reacción se agitó bajo enfriamiento con hielo durante 60 min.

En DMF (1.00 ml), se disolvieron el péptido SEQ ID No. 46 (secuencia: ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk-Y-MeC) (40 mg) sintetizado en el Ejemplo 1-2 y DIEA (31.6 µl), y la solución preparada anteriormente (1004 µl) se añadió bajo enfriamiento con hielo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 60 min. Se añadió DIEA (31.6 µl) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 min. A la mezcla de reacción se añadieron cloruro de lutecio(III) hexahidratado (86.0 mg, CAS: 15230-79-2) y acetato de amonio (17 mg, CAS: 631-61-8) disueltos en agua (4420 µl). La mezcla de reacción se agitó a 90°C durante 1 hora.

La mezcla de reacción resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 µm 30 × 150 mm; fase móvil: A = AcOH al 1.0% (en agua), B = AcOH al 1.0% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (%B): 5.0-27% durante 3 min, 27-32% durante 8 min, 32-60% durante 1 min; caudal: 45 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

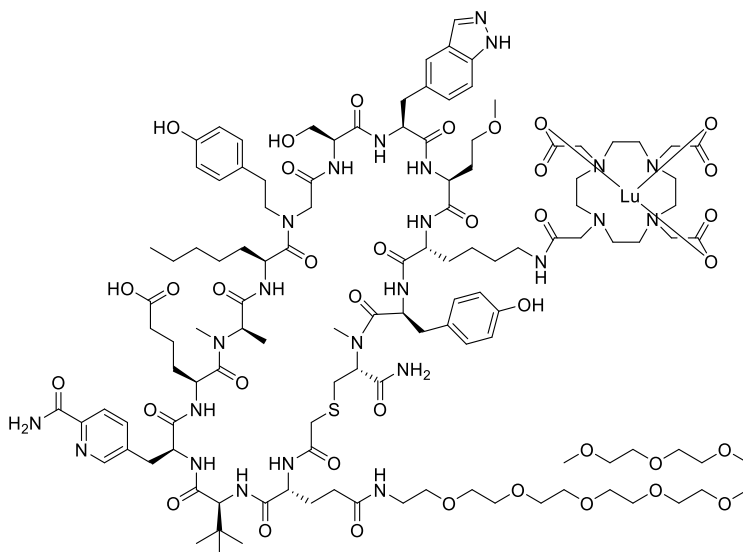
La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 99.4%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 3.48 min

ESI-MS(+): observado m/z = 774.79 (M+3H)³⁺

EJEMPLO 1-8 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 51

[Fórmula Química 12]



Se utilizó resina amida de Sieber (WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. 0.60 mmol/g, 0.584 g) para sintetizar el péptido objetivo (secuencia: ClAc-de(PEG8Me)-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk-Y-MeC) (SEQ ID No. 55). En ese momento, se utilizó Liberty Blue de

5 CEM como sintetizador de fase sólida para la síntesis de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la eliminación del Fmoc en la resina de fase sólida, la reacción se llevó a cabo una vez con pirrolidina al 10% (en DMF) a 90°C durante 1 min.

Para la introducción de cada residuo, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1.0 M (en DMF)/Oxyma pure 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente

10 de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez durante 3 min a 90°C. Para la introducción del residuo 3, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en NMP)/DIC 1.0 M (en DMF)/Oxyma pure 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes), y para cada uno de los residuos 4, 6 y 12, la reacción se llevó a cabo dos veces durante 10 min a 90°C. La reacción se llevó a cabo una vez para el residuo 13 a 40°C durante 30 min. Para el residuo 1, se utilizó Fmoc-de(Allyl)-OH. La resina de fase sólida

15 resultante se agitó con Fmoc-OSu 0.19 M (en DMF, 5 equivalentes) a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se lavó con DMF. La cadena lateral del residuo 1 se desprotegió en DCM (15 ml) utilizando tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (CAS: 14221-01-3)/fenilsilano (CAS: 694-53-1) (0.2 equivalentes/10 equivalentes) por equivalente de resina. La reacción se llevó a cabo una vez durante 60 min a temperatura ambiente. Después de la desprotección del grupo Allyl y del lavado con DCM y

20 DMF, la reacción de elongación desde la cadena lateral se llevó a cabo una vez utilizando H-PEG8Me/DIC/Oxyma pure (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina obtenida, en DMF (13 ml) a 75°C durante 30 min.

Después de la introducción de cada residuo, la reacción se llevó a cabo una vez durante 1 min a 90°C con pirrolidina al 4% + Oxyma pure 83 mM (en DMF) sobre la resina de fase sólida que

25 tenía inmovilizado el péptido protegido con Fmoc para la eliminación del grupo Fmoc. Para cada uno

de los residuos 4, 6 y 12, la reacción se llevó a cabo, utilizando solución de DMF con pirrolidina al 10%, dos veces a temperatura ambiente durante 1 min.

El grupo Fmoc del grupo α -amino se eliminó mediante la reacción realizada dos veces a temperatura ambiente durante 1 min utilizando una solución de DMF que contenía pirrolidina al 10% para la resina de fase sólida en la que estaba inmovilizado el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior. Esto se agitó además con ClAcNHS 0.19 M (5 equivalentes en DMF) durante 60 min a temperatura ambiente para introducir el grupo cloroacetilo.

Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina de fase sólida, la resina obtenida después del paso de introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero una vez con DMF, cloruro de metileno y éter dietílico, y luego se secó bajo presión reducida. El cóctel de agentes de reacción (16 ml; mezcla de TFA/H₂O/TIS/DODT en una relación en volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5) se añadió entonces a un recipiente de reacción, el cual se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La solución de reacción se recogió por filtración a través de una fritta. La resina de fase sólida restante en el recipiente de reacción se agitó nuevamente con el cóctel para la escisión, y el componente de solución se recogió de la fritta y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se dividió en 3 porciones y cada una se añadió a 40 ml de un solvente mixto de éter dietílico/hexano (1/1), se produjo un precipitado.

La mezcla resultante se centrifugó y luego se decantó la solución. El sólido resultante se lavó nuevamente con éter dietílico y luego se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se utilizó colectivamente en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se realizó disolviendo el péptido en agua/acetonitrilo (1/1) hasta una concentración final de 3.0 mM basada en el número de moles de la resina de fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; y agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético a la solución de reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida utilizando el Genevac EZ-II Elite.

El producto crudo obtenido anteriormente se purificó bajo las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 μ m, 50 $\times$ 250 mm; fase móvil: A = AcOH al 1.0% (en agua) y B = AcOH al 1.0% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 0-0% durante 5.1 min, 0-4.2% durante 1.9 min, 4.2-25.6% durante 3 min, 25.6-30.7% durante 15.5 min, 30.7-60% durante 1.5 min y 60-90% durante 4 min; caudal: 18-18 ml/min durante 8 min, 18-118 ml/min durante 2 min, luego 118 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener un péptido cíclico.

El péptido cíclico obtenido se utilizó como materia prima y se sometió a las mismas condiciones de reacción y purificación que en el Ejemplo 1-7 para preparar el péptido objetivo.

La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma

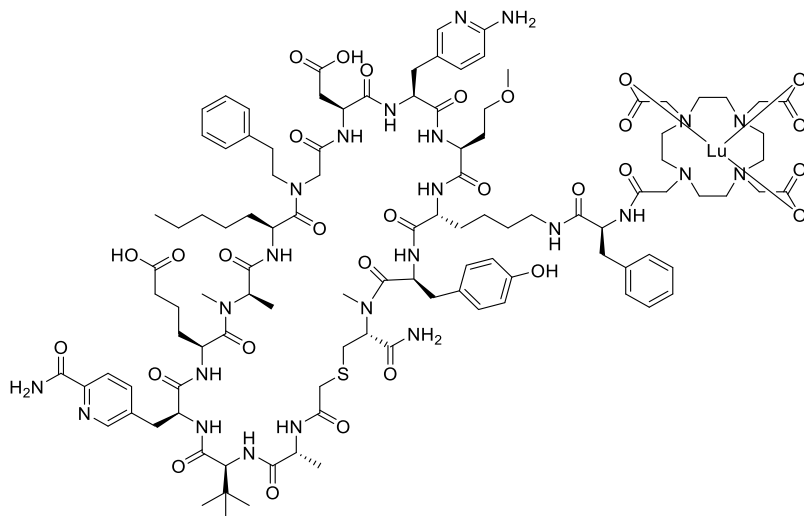
LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 98,5%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 4.12 min

ESI-MS(+): observado $m/z = 915.83$ $(M+3H)^{3+}$

EJEMPLO 1-9 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 35

[Fórmula Química 13]



Se utilizó resina amida de Sieber (WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. 0.54 mmol/g, 1.39 g) para sintetizar el péptido objetivo (secuencia: ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-PeG-D-3Py6NH2-HseMe-dk(F)-Y-MeC) (SEQ ID No. 56). En ese momento, se utilizó Liberty Blue de CEM como sintetizador de fase sólida para la síntesis de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la eliminación del Fmoc en la resina de fase sólida, la reacción se llevó a cabo una vez con pirrolidina al 10% (en DMF) a 75°C durante 3 min.

Para la introducción de cada residuo, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1.0 M (en DMF)/Oxyma pure 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez durante 10 min a 75°C. Para la introducción del residuo 3, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en NMP)/DIC 1.0 M (en DMF)/Oxyma pure 0.5 M (en DMF), y para la introducción del residuo 9, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en NMP)/HATU 0.5 M (en DMF)/1.0 M DIEA (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes). La reacción se llevó a cabo una vez para el residuo 3 a 75°C durante 30 min. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4, 6 y 12 a 75°C durante 10 min. La reacción se llevó a cabo una vez para el residuo 13 a 50°C durante 15 min. Para el residuo 11, se utilizó Fmoc-dk(Alloc)-OH. La resina de fase sólida resultante se agitó con Fmoc-OSu 0.38 M (en DMF, 5 equivalentes) a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se lavó con DMF. La cadena lateral del residuo 11 se desprotegió en DCM/HFIP (30 ml/0.3 ml) utilizando tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (CAS: 14221-01-3)/fenilsilano (CAS:

694-53-1) (0.2 equivalentes/10 equivalentes) por equivalente de resina. La reacción se llevó a cabo una vez durante 60 min a temperatura ambiente. Después de la desprotección del grupo Alloc y del lavado con DCM y DMF, la reacción de elongación desde la cadena lateral se llevó a cabo una vez utilizando Boc-F-OH/HATU/DIEA (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes) por equivalente de resina obtenida, en DMF (10 ml) a 75°C durante 30 min.

Después de la introducción de cada residuo, la reacción se llevó a cabo dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con pirrolidina al 10% (en DMF) sobre la resina de fase sólida que tenía inmovilizado el péptido protegido con Fmoc para la eliminación del grupo Fmoc. Para cada uno de los residuos 9, 10, 11, 12 y 13, la reacción se llevó a cabo una vez durante 3 min a 75°C con pirrolidina al 4% + Oxyma pure 83 mM (en DMF).

El grupo Fmoc del grupo α -amino se eliminó mediante la reacción realizada una vez a temperatura ambiente durante 1 min utilizando una solución de DMF que contenía piperidina al 10% para la resina de fase sólida en la que estaba inmovilizado el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior. Esto se agitó además con ClAcNHS 0.25 M (10 equivalentes en DMF) durante 60 min a temperatura ambiente para introducir el grupo cloroacetilo.

Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina de fase sólida, la resina obtenida después del paso de introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero una vez con DMF, cloruro de metileno y éter dietílico, y luego se secó bajo presión reducida. Posteriormente, las resinas de fase sólida se dividieron en 3 porciones, y cada una se colocó en un recipiente de reacción. El cóctel de agentes de reacción (12 ml; mezcla de TFA/H₂O/TIS/DODT en una relación en volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5) se añadió a cada recipiente, y los recipientes de reacción se agitaron a temperatura ambiente durante 40 min. La solución de reacción se recogió por filtración a través de una frita. La resina de fase sólida restante en el recipiente de reacción se agitó nuevamente con el cóctel para la escisión, y el componente de solución se recogió de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se dividió en 2 porciones y cada una se añadió a 30 ml de un solvente mixto de éter diisopropílico/hexano (1/1), se produjo un precipitado.

La mezcla resultante se centrifugó y luego se decantó el sobrenadante. El sólido resultante se lavó nuevamente con éter dietílico y luego se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se utilizó colectivamente en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se realizó disolviendo el péptido en DMSO/agua/acetonitrilo (1/2/2) hasta una concentración final de 5.0 mM basada en el número de moles de la resina de fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; y agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético a la solución de reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida utilizando el Genevac EZ-II Elite.

El producto crudo obtenido se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters

XBridge (marca registrada) C18 5 μ m 50 $\times$ 250 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 5.3-1.1% durante 0.1 min, 1.1-1.1% durante 4.9 min, 1.1-5.3% durante 2 min, 5.3-30.7% durante 3 min, 30.7-35.8% durante 15 min, 35.8-60% durante 3 min; caudal: 118-18 ml/min durante 0.1 min, 18-18 ml/min durante 4.9 min, 18-118 ml/min durante 2 min, luego 118 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener un péptido cíclico.

El péptido cíclico obtenido se utilizó como materia prima y se sometió a las mismas condiciones de reacción y purificación que en el Ejemplo 1-7 para preparar el péptido objetivo.

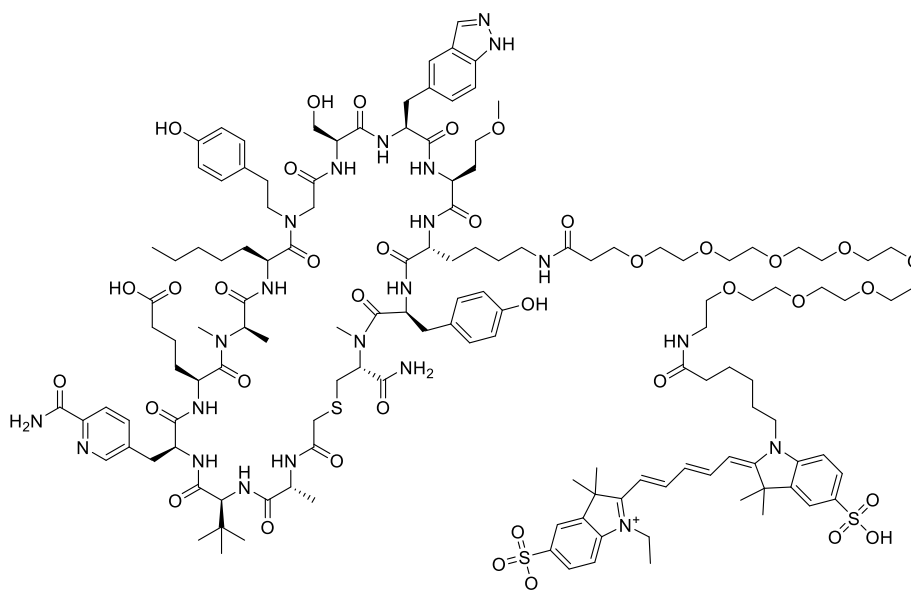
La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 98.7%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 3.79 min

ESI-MS(+): observado m/z = 819.85 ($M+3H$)³⁺

EJEMPLO 1-10 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 38

[Fórmula Química 14]



Se utilizó resina amida de Sieber (WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. 0.60 mmol/g, 0.21 g) para sintetizar el péptido objetivo (secuencia: CIAC-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk(PEG8c)-Y-MeC) (SEQ ID No. 57). En ese momento, se utilizó Liberty Blue de CEM como sintetizador de fase sólida para la síntesis de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la eliminación del Fmoc en la resina de fase sólida, la reacción se llevó a cabo una vez con pirrolidina al 10% (en DMF) a 90°C durante 1 min.

Para la introducción de cada residuo, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1.0 M (en

DMF)/Oxyma pure 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez durante 3 min a 90°C. Para el residuo 11, se utilizó Alloc-dk(Fmoc)-OH. Después de la elongación desde el residuo 13 hasta el residuo 11 y la eliminación del grupo Fmoc de la cadena lateral, se utilizó Boc-PEG8c-OH para la reacción de elongación desde la

5 cadena lateral. La cadena lateral del grupo Alloc de la cadena principal se desprotegió en DCM/HFIP (5 ml/0.1 ml) utilizando tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (CAS: 14221-01-3)/borano-dimetilamina (CAS: 74-94-2) (0.2 equivalentes/10 equivalentes) por equivalente de resina. La reacción se llevó a cabo una vez durante 60 min a temperatura ambiente. Las reacciones de elongación posteriores se realizaron sobre la resina de fase sólida obtenida. Para la introducción del residuo 9, se utilizaron

10 Fmoc-AA 0.21 M (en NMP)/DIC 1.0 M (en DMF)/Oxyma pure 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes), y para cada uno de los residuos 4, 6, 7 y 12, la reacción se llevó a cabo dos veces durante 10 min a 90°C. La reacción se llevó a cabo una vez para el residuo 13 a 40°C durante 20 min.

Después de la introducción de cada residuo, la reacción se llevó a cabo dos veces durante

15 1 min a temperatura ambiente con pirrolidina al 10% (en DMF) sobre la resina de fase sólida que tenía inmovilizado el péptido protegido con Fmoc para la eliminación del grupo Fmoc. Para cada una de las cadenas laterales de los residuos 10 y 11, la reacción se llevó a cabo una vez durante 1 min a 90°C con pirrolidina al 4% + Oxyma pure 83 mM (en DMF).

El grupo Fmoc del grupo α -amino se eliminó mediante la reacción realizada dos veces a

20 temperatura ambiente durante 1 min utilizando una solución de DMF que contenía piperidina al 10% para la resina de fase sólida en la que estaba inmovilizado el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior. Esto se agitó adicionalmente con ClAcNHS 0.16 M (5 equivalentes en DMF/DCM = 1/1) durante 60 min a temperatura ambiente para introducir el grupo cloroacetilo.

Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina de fase sólida, la

25 resina obtenida después del paso de introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero una vez con DMF, cloruro de metileno y éter dietílico, y luego se secó bajo presión reducida. El cóctel de agentes de reacción (3 ml; mezcla de TFA/H₂O/TIS/DODT en una relación en volumen de 90:2.5:2.5:5.0) se añadió entonces a un recipiente de reacción, el cual se agitó a temperatura ambiente durante 120 min. La solución de reacción se recogió por filtración a través de una frita. La resina de fase sólida restante

30 en el recipiente de reacción se agitó nuevamente con el cóctel para la escisión, y el componente de solución se recogió de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a 35 ml de un solvente mixto de éter dietílico/hexano (1/1), se produjo un precipitado.

La mezcla resultante se centrifugó y luego se decantó el sobrenadante. El sólido resultante se lavó nuevamente con éter dietílico y luego se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido)

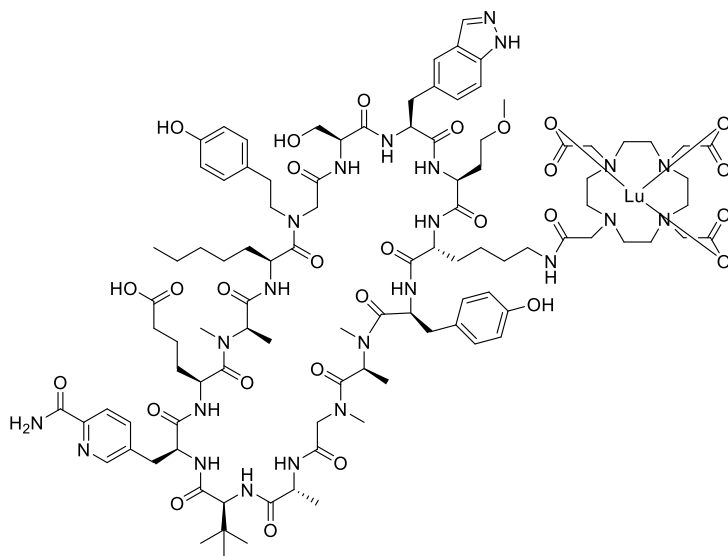
35 obtenido se utilizó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se

10 La mezcla de reacción resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 μ m 19 $\times$ 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (%B): 12-37% durante 3 min, 37-42% durante 8 min, 42-60% durante 1 min; caudal: 17 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

15 La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 96.0%.

ESI-MS(+): observado $m/z = 942.68$ $(M+3H)^{3+}$

[Fórmula Química 15]



Se utilizó resina H-Ser(tBu)-Trt(2-Cl) (WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., 0.78 mmol/g, 1.28 g) para sintetizar el péptido objetivo (secuencia: 25 da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk-Y-MeA-MeG) (SEQ ID No. 58). En ese

momento, se utilizó Liberty Blue de CEM como sintetizador de fase sólida para la síntesis de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la introducción de cada residuo, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIPEA 1.0 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez durante 30 min a temperatura ambiente. Para la introducción del residuo 3, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en NMP)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIPEA 1.0 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes), para la introducción del residuo 9, se utilizaron Fmoc-AA 0.21 M (en NMP)/DIC 1.0 M (en DMF)/Oxyma pure 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes), y para la introducción de cada uno de los residuos 4, 6, 7 y 12, la reacción se llevó a cabo dos veces a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción se llevó a cabo una vez para el residuo 9 a temperatura ambiente durante 60 min. La reacción se llevó a cabo dos veces para el residuo 13 a temperatura ambiente durante 60 min.

Después de la introducción de cada residuo, la reacción se llevó a cabo dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con pirrolidina al 10% (en DMF) sobre la resina de fase sólida que tenía inmovilizado el péptido protegido con Fmoc para la eliminación del grupo Fmoc. La reacción se llevó a cabo dos veces para el residuo 1 utilizando pirrolidina al 10% (en DMF) a temperatura ambiente durante 1 min.

Para la escisión de la resina de fase sólida, se añadió el cóctel de reactivos HFIP/DCM (9 ml, 1/4), y la mezcla se agitó durante 60 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción resultante se concentró bajo presión reducida utilizando Genevac EZ-II Elite. El residuo se solidificó añadiendo éter diisopropílico, y después de la centrifugación, se decantó la solución. El sólido resultante se lavó nuevamente con éter dietílico y luego se secó bajo presión reducida. El residuo resultante se disolvió en DMF hasta una concentración final de 5 mM basada en el número de moles de la resina de fase sólida; se añadieron DIEA/HATU (5 equivalentes/1.2 equivalentes), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético a la solución de reacción. La mezcla de reacción resultante se concentró bajo presión reducida utilizando el Genevac HT-12. Al residuo resultante se añadió el cóctel de agentes de reacción (una mezcla de TFA/H₂O/TIS en una relación en volumen de 95/2.5/2.5) y se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. Cuando se añadieron 40 ml de éter diisopropílico a la mezcla de reacción, se produjo un precipitado.

La mezcla resultante se centrifugó y luego se decantó el sobrenadante. El sólido resultante se lavó nuevamente con éter dietílico y luego se secó bajo presión reducida.

El residuo resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 µm 50 × 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (%B): 5-5% durante 2 min, 5-27% durante 1 min, 27-32% durante 8 min, 32-60% durante 1 min; caudal: 20-20 ml/min durante 1 min, 20-120 ml/min

El péptido cíclico obtenido se utilizó como materia prima y se sometió a las mismas condiciones de reacción y purificación que en el Ejemplo 1-7 para preparar el péptido objetivo.

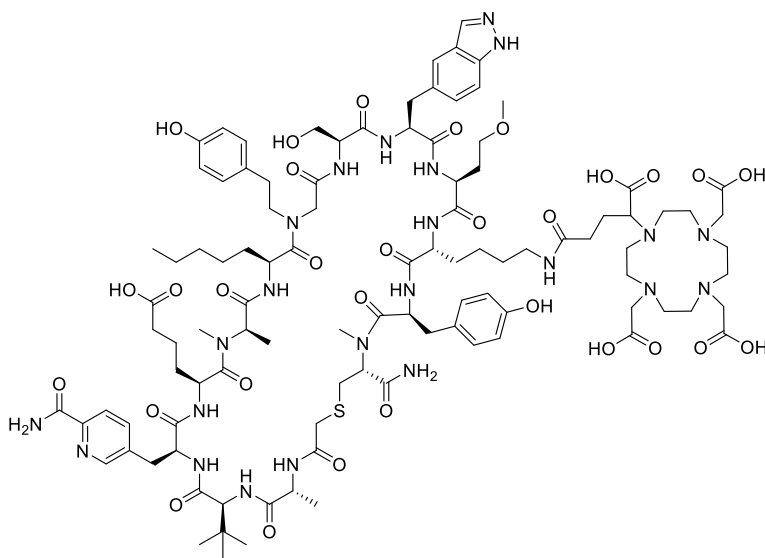
5 La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 99.7%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 4.27 min

ESI-MS(+): observado $m/z = 768.69$ $(M+3H)^{3+}$

10 **EJEMPLO 1-12** Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 56

[Fórmula Química 16]



En DMSO (0.50 ml), se disolvieron el péptido SEQ ID No. 46 (secuencia: ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk-Y-MeC) (20 mg) sintetizado en el Ejemplo 1-2 y DIEA (26.3 µl), y a temperatura ambiente se añadió entonces ácido 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotetrahydro-2H-piran-3-il)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tril)triacético (8.1 mg, CAS: 1375475-53-8). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas.

La mezcla de reacción resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μ m 19 $\times$ 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 5.0-27% durante 3 min, 27-32% durante 8 min, 32-60% durante 1 min; caudal: 17 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo

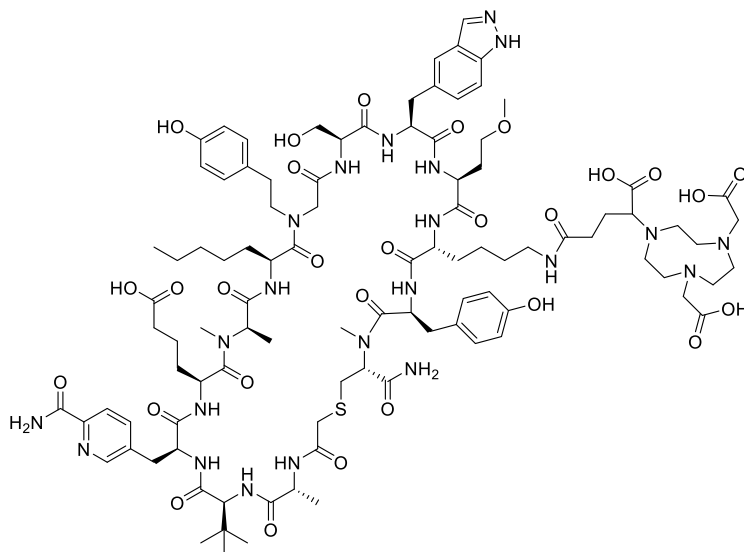
fue del 97.8%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 3.40 min

ESI-MS(+): observado $m/z = 741.40 (M+3H)^{3+}$

EJEMPLO 1-13 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 58

5 [Fórmula Química 17]



En DMSO (0.50 ml), se disolvieron el péptido SEQ ID No. 46 (secuencia: ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk-Y-MeC) (20 mg) sintetizado en el Ejemplo 1-2 y DIEA (26.3 μ l), y a temperatura ambiente se añadió entonces ácido 2,2'-(7-(1-carboxi-4-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-4-oxobutil)-1,4,7-triazonan-1,4-diil)diacético (14 mg, CAS: 1407166-70-4). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas.

La mezcla de reacción resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μ m 19 $\times$ 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 5.0-28% durante 3 min, 28-33% durante 8 min, 33-60% durante 1 min; caudal: 17 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 96.4%.

20 Condición analítica A: tiempo de retención = 3.70 min

ESI-MS(+): observado $m/z = 1060.97 (M+2H)^{2+}$

EJEMPLO 1-14 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 21

[Fórmula Química 18]

5

10

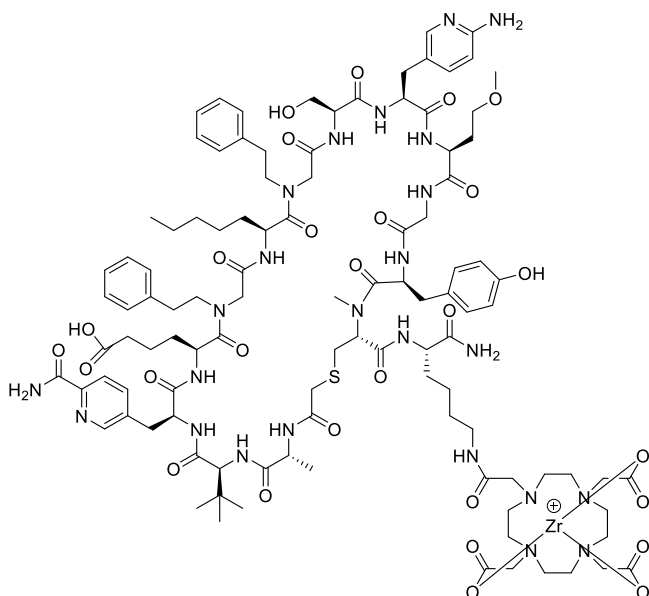
fue del 97,7%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 4.32 min

15

EJEMPLO 1-15 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 22

[Fórmula Química 19]



En DMF (0.40 ml), se disolvió el péptido cíclico (secuencia: ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-PeG-Ahp-PeG-S-3Py6NH₂-HseMe-G-Y-MeC-K) (SEQ ID No. 59) (15 mg) sintetizado por un método de síntesis sustancialmente igual al del Ejemplo 1-1, y se añadieron DOTA-NHS éster hexafluorofosfato trifluoroacetato (7.8 mg) y DIPEA (0.018 ml) bajo enfriamiento con hielo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 120 min. A la mezcla de reacción se añadió acetilacetato de circonio(IV) (5.1 mg, CAS: 17501-44-9), y la mezcla se agitó a 50°C durante 90 min, y luego se añadió DOTA (10 mg).

La mezcla de reacción obtenida anteriormente se purificó bajo las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 µm, 50 × 250 mm; fase móvil: A = AcOH al 1.0% (en agua) y B = AcOH al 1.0% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 0-0% durante 5.1 min, 0-4.2% durante 1.9 min, 4.2-25.6% durante 3 min, 25.6-30.7% durante 15.5 min, 30.7-60% durante 1.5 min y 60-90% durante 4 min; caudal: 18-18 ml/min durante 5.1 min, 18-118 ml/min durante 1.9 min, luego 118 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

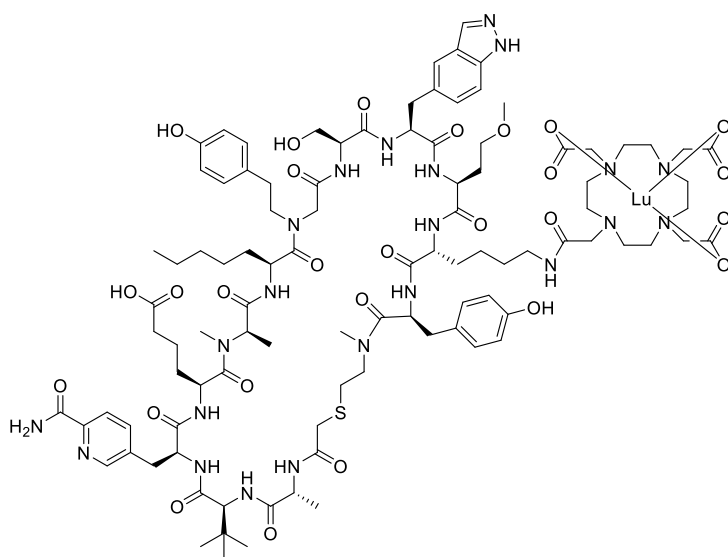
La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 99.7%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 3.66 min

ESI-MS(+): observado m/z = 1165.62 (M+H)²⁺

EJEMPLO 1-16 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 45

[Fórmula Química 20]



Utilizando resina Cl-Trt(2-Cl) (WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) y Fmoc-MeCt (CAS: 2932449-54-0) como materiales de partida, se utilizó una resina de fase sólida inmovilizada (1.007 mmol/g, 0.500 g) preparada del mismo modo que se describe en Tetrahedron Letters, 43 (2002) 3419-3421 para sintetizar el péptido objetivo (secuencia: ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk-Y-MeCt) (SEQ ID No. 60). En ese momento, se utilizó Liberty Blue de CEM como sintetizador de fase sólida para la síntesis de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El péptido cíclico se sintetizó como en el Ejemplo 1-2, y el péptido objetivo se obtuvo sometiendo el péptido a las mismas condiciones de reacción y purificación que en el Ejemplo 1-7 con respecto a la introducción de un quelante y un metal.

La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 99.5%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 3.85 min

ESI-MS(+): observado $m/z = 760.33$ ($M+3H$)³⁺

EJEMPLO 2 Síntesis de Péptidos Cíclicos y Síntesis de Conjugados

De acuerdo con el método general descrito en el Ejemplo 1, se sintetizaron cada péptido objetivo y un conjugado que contiene dicho péptido y una carga útil según se enumeran en los siguientes cuadros.

CUADRO 7

SEQ ID No.	Citilización	1	2	3	4	5	6	7	SEQ	8	9	10	11	12	13	14	Adicional	Término	miz	(m+XHX)*	Tiempo de Retención	Condiciones	KD (M)
2	CiAc	da	I	3P+6NH2	S	PeG	Ahp	PeG	H	3P+6NH2	Ahp	G	Y	C			G	NH2	875.39	2	3.440	A	3.14E-09
3	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	PeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	G	Y	MeC			G	NH2	893.72	2	4.352	A	2.03E-10
4	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	PeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	G	Y	MeC				NH2	865.24	2	4.438	A	1.73E-10
5	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	G	Y	MeC				NH2	849.18	2	3.22	A	1.19E-10
6	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	PeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	G	Y	MeC				NH2	894.26	2	4.264	A	1.85E-10
7	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	827.14	2	3.548	A	9.28E-11
8	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	834.18	2	3.852	A	6.65E-11
9	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	862.76	2	3.604	A	6.60E-11
10	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	890.97	2	3.36	A	1.05E-10
11	CiAc	dhgl	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	898.49	2	3.56	A	1.16E-10
12	CiAc	da	Tog	3P+6CON	alT	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	869.93	2	3.404	A	1.76E-10
13	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	P	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	895.99	2	3.7	A	1.77E-10
14	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	F4OMe	HsMe	da	Y	MeC				NH2	897.98	2	5.588	A	1.00E-10
15	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pAeOPeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	877.37	2	3.796	A	1.19E-10
16	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	MkMaapG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	884.78	2	5.576	B	3.94E-08
17	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	3OMePeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	877.46	2	3.616	A	1.43E-10
18	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	Y	HsMe	da	Y	MeC				NH2	862.43	2	4.752	A	9.68E-11
19	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	MeG	MeG	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	975.89	2	3.104	A	3.62E-10
20	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	D	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	876.45	2	3.628	A	1.16E-10
21	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	E	da	Y	MeC				NH2	869.43	2	3.444	A	6.82E-08
22	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	862.93	2	3.696	A	1.25E-10
23	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pAeOPeG	S	Y	HsMe	da	Y	MeC				NH2	908.48	2	4.508	A	1.13E-10
24	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pPeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	870.33	2	5.786	B	1.18E-10
25	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	869.42	2	4.912	A	7.16E-11
26	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pPeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	871.37	2	3.872	A	9.24E-11
27	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	mCPeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	879.52	2	4.14	A	5.82E-11
28	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pCPeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	879.53	2	4.164	A	5.47E-11
29	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	4HPeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	877.35	2	3.264	A	1.66E-10
30	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	4OMePeG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	864.44	2	3.94	A	1.40E-10
31	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	4PpG	S	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC				NH2	869.77	2	4.576	B	3.27E-10
32	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PaSh	3P+6NH2	HsMe	da	Y	MeC	3.632				NH2	875.43	2	3.632	A	1.15E-10
33	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	874.47	2	4.872	A	7.30E-11
34	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	AcB	Y	MeC				NH2	846.9	2	3.976	A	8.70E-11
35	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hgn	MeG	Ahp	PeG	S	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	873.85	2	4.68	A	8.35E-11
36	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Srda	MeG	Ahp	PeG	S	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	853.38	2	5.228	A	1.65E-10
37	CiAc	da	Tog	3P+6CON	DabAc	MeG	Ahp	PeG	S	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	873.87	2	4.848	A	1.33E-10
38	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	4COOPeG	S	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	896.35	2	4.028	A	1.90E-10
39	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	3COOPeG	S	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	896.35	2	4.184	A	1.07E-10
40	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pPeG	S	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	883.34	2	4.976	A	8.89E-11
41	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	Hse	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	881.37	2	4.864	A	1.12E-10
42	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	Srda	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	891.37	2	5.128	A	1.08E-10
43	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	Qmm	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	901.87	2	4.924	A	1.07E-10
44	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	Qmm	Srda	HsMe	da	Y	MeC				NH2	908.83	2	5.088	A	1.25E-10
45	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	PeG	S	3P+6NH2	HsMe	dk	Y	MeC				NH2	862.37	2	2.856	A	6.56E-11
46	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pPeG	S	Srda	HsMe	dk	Y	MeC				NH2	882.36	2	3.296	A	5.37E-11
47	CiAc	da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pPeG	S	3P+6NH2	HsMe	dk	Y	MeC				NH2	855.3	2	5.708	B	1.49E-10
48	Libre	@da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pPeG	S	Srda	HsMe	dkAc	Y	MeA	MeG@			-	884.38	2	4.38	A	1.10E-10
49	Libre	@da	Tog	3P+6CON	Hgn	MeG	Ahp	pPeG	S	Srda	HsMe	dkAc	Y	MeA	MeG@			-	893.66	2	4.036	A	1.53E-10
50	Libre	@da	Tog	3P+6CON	alT	MeG	Ahp	pPeG	S	Srda	HsMe	dkAc	Y	MeA	MeG@			-	873.36	2	4.512	A	2.17E-10
51	Libre	@da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pPeG	S	Srda	HsMe	dkAc	Y	MeS	MeG@			-	902.43	2	4.14	A	7.75E-11
52	Libre	@da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pPeG	S	Srda	HsMe	dkAc	Y	MeN	MeG@			-	915.87	2	4.208	A	1.15E-10
53	Libre	@da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pPeG	S	Srda	HsMe	dkAc	Y	Hpr	MeG@			-	907.42	2	4.634	A	1.55E-10
54	Libre	@da	Tog	3P+6CON	Hg	MeG	Ahp	pPeG	S	Srda	HsMe	dkAc	Y	MeA	dp@			-	907.38	2	4.398	A	2.49E-10

CUADRO 8

No. de Configuración	Citización	1	2	3	4	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	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486</
-------------------------	------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	--------

El Cuadro 7 enumera los péptidos objetivo, las condiciones analíticas y los tiempos de retención, y los valores observados de ESI-MS(+); y el Cuadro 8 enumera los conjugados objetivo, las condiciones analíticas y los tiempos de retención, y los valores observados de ESI-MS(+).

En el Cuadro 7, el término "extremo" indica el grupo funcional C-terminal (en los cuadros, "-OH" indica COOH y "-NH₂" indica CO(NH₂)), y el caso en blanco indica que no hay grupo funcional presente en el extremo C-terminal. Con respecto a "Ciclización" en los cuadros, las entradas con la descripción "CIAC" representan que la ciclización se logró enlazando el aminoácido en la posición 1 en el cual se introdujo un grupo cloroacetilo con C o MeC presente en el extremo C-terminal, mientras que la descripción "Libre" indica que el grupo amino N-terminal del aminoácido en la posición 1 está enlazado al grupo carboxi C-terminal del aminoácido en la posición 13 o 14. Además, "Adicional/Enlazador" en los cuadros indica un enlazador o uno o más aminoácidos adicionales que no están incluidos en la estructura cíclica. Por ejemplo, en Ca9 No. 1 (SEQ ID No. 3) la secuencia de aminoácidos X1-X13 forma una estructura cíclica, y glicina se añade adicionalmente como enlazador desde el C del X13 C-terminal.

En el Cuadro 8, se aplican las mismas reglas de descripción que en el Cuadro 7 anterior. Además, en el Cuadro 8, el componente descrito entre paréntesis () representa la carga útil. Por ejemplo, el conjugado del Conjugado No. 1 indica que los residuos de aminoácidos C en X1 y X13 forman una estructura cíclica, que una estructura enlazadora G-PEG10c-K se extiende desde el C en X13, y que SulfoCy5 está unida como carga útil a la cadena lateral de la K terminal. Además, en el conjugado del Conjugado No. 6, los residuos de aminoácidos MeC en X1 y X13 forman una estructura cíclica y la cadena lateral de dk en X1 está unida a la carga útil, es decir, DOTA coordinado con Lu. Asimismo, en el Conjugado No. 19 listado en el Cuadro 8, los residuos de aminoácidos MeC en X1 y X13 igualmente forman una estructura cíclica y la cadena lateral de dk en X1 está unida mediante df a la carga útil, es decir, DOTA coordinado con Lu. Mientras tanto, NT en el Cuadro 8 indica "no ensayado".

EJEMPLO 3 Ensayo de Evaluación de la Interacción Intermolecular de Péptido o Conjugado frente a CA9 Humana mediante Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)

Las interacciones intermoleculares de los péptidos frente a la proteína CA9 humana se examinaron mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) para los diversos péptidos o conjugados sintetizados en los Ejemplos 1 y 2, de acuerdo con los métodos descritos a continuación. Los métodos específicos del ensayo se describen a continuación.

Medición SPR

Se insertó un chip sensor Protein A (Cytiva) en Biacore T200 (Cytiva) y se cebó con el tampón de corrida: 1× HBS-P+ (Cytiva), DMSO al 1.0% (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) y acetato de zinc dihidratado 50 µM (Hampton Research), y se equilibró a un caudal de 30 µl/min. CA9-Fc

humana 50 nM (SinoBiological) diluida con el tampón de corrida se hizo reaccionar a un caudal de 5 µl/min durante 60 s y se capturó en una celda de flujo.

Una solución que contenía cada péptido o conjugado sintetizado en el Ejemplo 1 o 2 y preparada a 1 mM en solución de DMSO se diluyó con tampón de corrida a una concentración final de 100 nM. Luego se prepararon soluciones del péptido o conjugado a 25 nM y 5 nM. Dependiendo de la afinidad del péptido o conjugado, la solución se diluyó con tampón de corrida a una concentración final de 40 nM. Luego se prepararon soluciones del péptido o conjugado a 10 nM y 2 nM.

Utilizando las muestras anteriores, se obtuvieron por medición SPR las cinéticas de cada péptido o conjugado frente a CA9 humana. El modelo de evaluación cinética fue Single Cycle Kinetics, y el ajuste de curvas se realizó utilizando el Software de Evaluación Biacore T200 Versión 3.0 (Cytiva). La unión de cada péptido o conjugado a CA9 humana se evaluó realizando un ajuste de curvas por mínimos cuadrados sobre el sensorgrama obtenido para calcular el valor KD.

Los Cuadros 7 y 8 muestran los resultados. Los Cuadros 7 y 8 han demostrado que los péptidos y conjugados de la presente invención tienen la actividad de unirse a CA9 humana.

15 **EJEMPLOS DE REFERENCIA Síntesis de aminoácidos no naturales**

Los Ejemplos de Referencia muestran ejemplos de síntesis de diversos aminoácidos no naturales.

En los Ejemplos de Referencia, se utilizaron los siguientes equipos, abreviaturas, condiciones analíticas, etc., salvo que se especifique lo contrario.

20 Salvo que se especifique lo contrario, los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-NMR) en los siguientes Ejemplos de Síntesis se midieron utilizando un JNM-ECP300 o JNM-ECX300 fabricados por JEOL Ltd., o un Ascend™ 500 fabricado por Bruker, en solvente de cloroformo deuterado o dimetilsulfóxido deuterado. Los desplazamientos químicos se expresaron como valores δ (ppm) con tetrametilsilano como estándar interno (0.0 ppm).

25 En la descripción de los espectros NMR, "s" indica singlete, "d" indica doblete, "t" indica triplete, "q" indica cuarteto, "dd" indica doblete de dobletes, "dt" indica doblete de tripletes, "m" indica multiplete, "br" indica señal ancha, "J" indica constante de acoplamiento, "Hz" indica hercios, "CDCl₃" indica cloroformo deuterado y "DMSO-d₆" indica dimetilsulfóxido deuterado.

30 La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)/espectrometría de masas (MS) se realizó utilizando Waters ACQUITY UPLC H-Class/QDa, Waters ACQUITY UPLC H-Class/SQD2 o Shimadzu LC-20AD/Triple ToF5600.

En la descripción de los datos HPLC/MS, "ESI+" denota el modo positivo de ionización por electropulverización y "(M+H)+" denota un ion molecular protonado. "(M-C₄H₈+H)+" indica un ion formado por protonación y eliminación de un grupo *tert*-butilo.

35 En la descripción de los datos HPLC/MS, "ESI-" denota el modo negativo de ionización por

electropulverización y "(M-H)" denota un ion molecular desprotonado.

Condición analítica C

Columna: ACQUITY (marca registrada) 1.7 μ m BEH C18, 2.1 $\times$ 100 mm, Waters

Fase móvil A: TFA al 0.025% en agua

5 Fase móvil B: TFA al 0.025% en CH₃CN

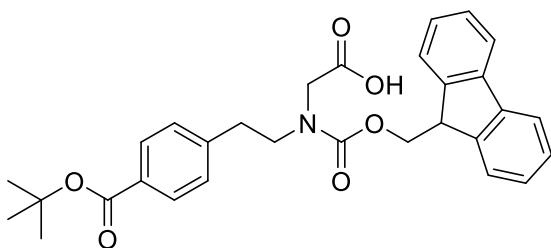
Temperatura de columna: 60°C

Gradiente (%B): 5-95% durante 5.56 min, luego 95% desde 5.56 min hasta 7.22 min;
caudal: 0.6 ml/min

Detección: UV 254 nm

10 **EJEMPLO DE REFERENCIA 1 Síntesis de Fmoc-4COOPeG(tBu)-OH**

[Fórmula Química 21]



El clorhidrato de 2-aminoacetato de metilo (10 g, CAS: 5680-79-5) se disolvió en MeOH (200 ml, CAS: 67-56-1) a temperatura ambiente, y se añadieron trietilamina (16.12 g, CAS: 121-44-8) y acrilato de *tert*-butilo (20.42 g, CAS: 1663-39-4). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante (15 g) se disolvió en DCM (150 ml, CAS: 75-09-2), y se añadieron DIPEA (35.69 g, CAS: 7087-68-5) y N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carboniloxi]succinimida (22.12 g, CAS: 82911-69-1) bajo enfriamiento con hielo. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, se añadió ácido clorhídrico 1 M (300 ml, CAS: 7647-01-0) para detener la reacción. Tras la extracción con DCM, la fase orgánica resultante se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio. La fase orgánica se filtró y luego se concentró bajo presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 1/1). Las fracciones que contenían el producto objetivo se concentraron bajo presión reducida.

25 El producto (31 g) obtenido en la reacción anterior se disolvió en DCM (300 ml), y se añadió una solución de HCl 4 M en 1,4-dioxano (300 ml) bajo enfriamiento con hielo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante (25 g) se disolvió en DCM (150 ml) a temperatura ambiente, y se añadieron clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (18.75 g, CAS: 25952-53-8) y N-hidroxiftalimida (11.70 g, CAS: 524-38-9). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se detuvo añadiendo bicarbonato de sodio acuoso saturado

(200 ml). La mezcla resultante se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio. La mezcla se filtró y luego se concentró bajo presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 1/1). Las fracciones que contenían el producto objetivo se concentraron bajo presión reducida.

- 5 Bajo atmósfera de nitrógeno, se añadieron bromuro de níquel(II) trihidratado (4.64 g, CAS: 7789-49-3) y 4,4'-di-*tert*-butil-2,2'-dipiridilo (4.57 g, CAS: 72914-19-3) a N,N-dimetilacetamida (300 ml, CAS: 127-19-5), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadieron 4-bromobenzoato de *tert*-butilo (29.19 g, CAS: 59247-47-1) y el producto (30 g) obtenido en el paso anterior a la mezcla resultante, y se añadió zinc (18.56 g, CAS: 7440-66-6) durante 10 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción se detuvo añadiendo agua a la mezcla, y el material insoluble se filtró y se lavó con acetato de etilo. El filtrado se extrajo con acetato de etilo, y la fase orgánica resultante se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio. La fase orgánica se filtró y luego se concentró bajo presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 1/1). Las fracciones que contenían el producto objetivo se concentraron bajo presión reducida.

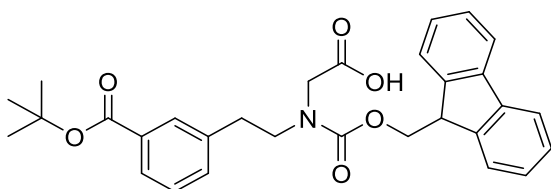
- 10 El producto obtenido (20 g) se disolvió en alcohol isopropílico (600 ml, CAS: 67-63-0), y se añadieron bajo enfriamiento con hielo una solución acuosa que contenía cloruro de calcio (68.88 g, CAS: 10043-52-4) (150 ml) y una solución acuosa que contenía hidróxido de litio (3.72 g, CAS: 1310-65-2) (50 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió a la mezcla una solución acuosa saturada que contenía dihidrogenofosfato de sodio (CAS: 7558-80-7) para ajustar el pH a 5, y luego la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con solución salina saturada y luego se secó sobre sulfato de sodio. Después de la filtración y la concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó por cromatografía instantánea en columna de gel de sílice de fase inversa (columna: gel de sílice C18; gradiente: solución acuosa de bicarbonato de amonio 10 mM/acetronitrilo = 95/5 a 0/100). Las fracciones que contenían el producto objetivo se concentraron bajo presión reducida para obtener el compuesto del título (10.1 g).

- 25 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.68 (br, 1H), 7.92-7.86 (m, 2H), 7.86-7.55 (m, 4H), 7.47-7.00 (m, 6H), 4.52-4.45 (m, 1H), 4.28-4.14 (m, 2H), 4.00-3.69 (m, 2H), 3.56-3.07 (m, 2H), 2.91-2.41 (m, 2H), 1.55-1.51 (m, 9H).

Condición analítica C: tiempo de retención = 5.44 min; ESI-MS(+) observado *m/z* = 446 (M-C₄H₈+H)⁺, teórico *m/z* = 501.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2 Síntesis de Fmoc-3COOPeG(tBu)-OH

- 35 [Fórmula Química 22]



Fmoc-3COOPeG(tBu)-OH se obtuvo por un método de síntesis sustancialmente igual al del Ejemplo de Referencia 1: Fmoc-4COOPeG(tBu)-OH. Sin embargo, en lugar de 4-bromobenzoato de *tert*-butilo, se utilizó 3-bromobenzoato de *tert*-butilo (CAS: 69038-74-0) como materia prima.

5 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.70 (br, 1H), 7.92-7.82 (m, 2H), 7.81-7.55 (m, 4H), 7.52-7.10 (m, 6H), 4.51-4.32 (m, 1H), 4.32-4.09 (m, 2H), 4.09-3.74 (m, 2H), 3.53-3.12 (m, 2H), 2.92-2.46 (m, 2H), 1.55-1.47 (m, 9H).

Condición analítica C: tiempo de retención = 5.19 min; ESI-MS(+) observado m/z = 446 ($(\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8+\text{H})^+$, teórico m/z = 501.

10 **EJEMPLO 4 Distribución *In Vivo* del Conjugado Marcado con ^{67}Ga**

Marcaje del Péptido con ^{67}Ga

Los siguientes conjugados se sintetizaron por el método del Ejemplo 1 o 2 o por un método sustancialmente igual:

Conjugado No. 65

15 Conjugado No. 64

Conjugado No. 70 (la porción de carga útil del Conjugado No. 18 es una porción DOTA sola, no coordinada con lutecio, en el conjugado (secuencia: ClAc-de-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-PeG-D-3Py6NH₂-HseMe-dk(DOTA)-Y-MeC) (DOTA unida a la cadena lateral de dk en la posición 11 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 20 73))

Conjugado No. 71 (la porción de carga útil del Conjugado No. 29 es una porción DOTA sola, no coordinada con lutecio, en el conjugado (secuencia: ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-PeG-D-5Inda-HseMe-dk(DOTA)-Y-MeC) (DOTA unida a la cadena lateral de dk en la posición 11 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 25 77))

Conjugado No. 72 (la porción de carga útil del Conjugado No. 15 es una porción DOTA sola, no coordinada con lutecio, en el conjugado (secuencia: ClAc-dk(DOTA)-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-PeG-D-3Py6NH₂-HseMe-dq-Y-MeC) (DOTA unida a la cadena lateral de dk en la posición 1 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 30 70))

Conjugado No. 62

y

Conjugado No.73 (la porción de carga útil del Conjugado No.31 es una porción DOTA-t4amCh sola, no coordinada con lutecio, en el conjugado (secuencia: ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-PeG-D-5Inda-HseMe-dk(DOTA-t4amCh)-Y-MeC) (DOTA unida mediante t4amCh a la cadena lateral de dk en la posición 11 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 77))

La solución de reacción de marcaje (Cuadro 9) que contenía cada conjugado se calentó a 95°C durante 10 min para el marcaje con ^{67}Ga .

CUADRO 9

Composición de la solución de reacción de marcaje

Conjugado	2.8 nmol/50 μl
DMSO	1.43 - 1.69 μl /50 μl
Cloruro de galio (^{67}Ga)	10.36 MBq (ensayo a las 12:00 del día de marcaje)
Acetato de sodio hidratado	0.40 mol/l
Ácido acético	0.27 mol/l
Ácido ascórbico	5.6 mg/ml
Ácido genticónico	1.28 mg/ml

Radio HPLC

Cada conjugado marcado con ^{67}Ga (en lo sucesivo, también denominado "sustancia de ensayo") sintetizado como se describió anteriormente se mezcló con acetonitrilo, y la pureza radioquímica se midió antes y después de la administración utilizando TSK gel ODS-80Ts QA (marca registrada), 4.6 mm ID $\times$ 250 mm, 5 μm (Tosoh Corporation). Los resultados muestran que la pureza fue del 95.61–91.27%.

Radio TLC

La placa de Gel de Sílice TLC 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck, 115389) sobre la cual se aplicó la sustancia de ensayo se desarrolló con una solución mixta de solución de acetato de amonio 2 mol/l/acetona (1:1). Posteriormente, se midió la radiactividad utilizando un radiocromatógrafo (intervalo de energía: 60–350 keV; colimador: 1.0 cm; cristal BGO en forma de V; tiempo de medición: 10 min). Los resultados muestran que la pureza fue del 96.67-94.27%.

Preparación de Animales Experimentales (ratones portadores de Tumor HT-29)

Ratones hembra BALB/cSlc-nu/nu de cinco semanas de edad se adquirieron de Japan SLC (Shizuoka, Japón) y se utilizaron para la preparación de animales experimentales. Después de la aclimatación, células HT-29 derivadas de cáncer de colon humano positivo para CA9 se suspendieron a 5×10^7 células/ml en una mezcla 1:2 de PBS (pH 7.4, 1 $\times$; Thermo Fisher Scientific, 10010-023) y

VitroGel (The Well Bioscience, VHM01). Una porción de 0.1 ml de la suspensión se inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones nude atímicos (de 6 semanas de edad) utilizando una jeringa desechable con aguja.

El número de animales evaluados fue 3 por grupo, para un total de 12 grupos. Los animales evaluados al momento de uso pesaban 18.2 g a 20.7 g y tenían tamaños tumorales de 216 a 908 mm³.

Distribución *In Vivo*

Cada sustancia de ensayo se administró como una dosis única por vía intravenosa a ratones portadores de tumor HT-29. Se realizaron autopsias a las 4, 24 y 72 horas después de la administración, y se midió la concentración de radiactividad (%ID/g) de cada tejido.

10 Resultados

Los resultados de la distribución *in vivo* de cada compuesto marcado con ⁶⁷Ga se muestran en la Figura 1, Figura 2 y Figura 3. Cabe señalar que "Conjugado No. XX" en la figura indica cada conjugado cuya porción de carga útil en el conjugado descrito en el Conjugado No. correspondiente es DOTA-⁶⁷Ga.

15 Figura 1: Distribución tisular a las 4 horas después de la administración: %ID/g (media ± SD, n = 3)

Figura 2: Distribución tisular a las 24 horas después de la administración: %ID/g (media ± SD, n = 3)

20 Figura 3: Distribución tisular a las 72 horas después de la administración: %ID/g (media ± SD, n = 3)

EJEMPLO 5 Distribución *In Vivo* e Imagen PET del Conjugado Marcado con ⁶⁴Cu

Marcaje del Conjugado Peptídico con ⁶⁴Cu

La solución de reacción de marcaje (Cuadro 10) que contiene cada conjugado peptídico sintetizado en los Ejemplos 1 o 2: Conjugado No. 64, Conjugado No. 62, Conjugado No. 2, Conjugado No. 56 o Conjugado No. 58 se calentó a 95°C durante 10 min para el marcaje con ⁶⁴Cu.

CUADRO 10

Composición de la solución de reacción de marcaje

Conjugado	2.8 nmol/50 µl
DMSO	1.43 - 1.64 µl/50 µl
Cloruro de cobre (⁶⁴ Cu)	31.08 MBq (ensayo a las 12:00 del día de administración)
Acetato de sodio hidratado	0.31 mol/l
Ácido acético	0.21 mol/l
Ácido ascórbico	5.6 mg/ml
Ácido genticónico	1.28 mg/ml

30 Radio HPLC

Cada conjugado marcado con ⁶⁴Cu (en lo sucesivo, también denominado "sustancia de

ensayo”) sintetizado como se describió anteriormente se mezcló con acetonitrilo, y la pureza radioquímica se midió antes y después de la administración utilizando TSK gel ODS-80Ts QA (marca registrada), 4.6 mm ID × 250 mm, 5 µm (Tosoh Corporation). Los resultados muestran que la pureza fue del 94.14-100%.

5 Radio TLC

La placa de gel de sílice TLC 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck, 115389) sobre la cual se aplicó la sustancia de ensayo se desarrolló con una solución mixta de solución de acetato de amonio 2 mol/l/acetona (1:1). Posteriormente, se midió la radiactividad utilizando un radiocromatógrafo (intervalo de energía: 60–350 keV; colimador: 1.0 cm; cristal BGO en forma de V; tiempo de medición: 10 min). Los resultados muestran que la pureza fue del 97.60-98.79%.

Preparación de Animales Experimentales (ratones portadores de Tumor HT-29)

Ratones hembra BALB/cSlc-nu/nu de cinco semanas de edad se adquirieron de Japan SLC (Shizuoka, Japón) y se utilizaron para la preparación de animales experimentales. Después de la aclimatación, células HT-29 derivadas de cáncer de colon humano positivo para CA9 se suspendieron a 5×10^7 células/ml en una mezcla 1:2 de PBS (pH 7.4, 1×; Thermo Fisher Scientific, 10010-023) y VitroGel (The Well Bioscience, VHM01). Una porción de 0.1 ml de la suspensión se inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones nude atímicos (de 6 semanas de edad) utilizando una jeringa desechable con aguja.

El número de animales evaluados fue 3 por grupo, para un total de 12 grupos. Los animales evaluados al momento de uso pesaban 17.7 g a 21.5 g y tenían tamaños tumorales de 165 a 523 mm³.

Distribución *In Vivo* e Imagen PET

Cada sustancia de ensayo se administró como una dosis única por vía intravenosa de 80 µl/animal a ratones portadores de tumor HT-29. Se realizaron autopsias a las 4 y 24 horas después de la administración, y se midió la concentración de radiactividad (%ID/g) de cada tejido para evaluar la distribución *in vivo*. Además, se realizaron imágenes PET a 1, 4 y 23.5 horas después de la administración, y se recolectaron imágenes PET/CT en un Si78 (Bruker BioSpin MRI GmbH) bajo anestesia con gas isoflurano.

Resultados

Los resultados de la distribución *in vivo* de cada compuesto marcado con ⁶⁴Cu se muestran en las Figuras 4 a 7.

Figura 4: Distribución tisular a las 4 horas después de la administración: %ID/g (media ± SD, n = 3)

Figura 5: Distribución tisular a las 24 horas después de la administración: %ID/g (media ± SD, n = 3)

Figura 6: Distribución tisular a las 4 horas después de la administración: %ID/g (media ± SD,

n = 3)

Figura 7: Distribución tisular a las 24 horas después de la administración: %ID/g (media $\pm$ SD, n = 3)

Imagen PET/CT

5 Las imágenes PET/CT se recolectaron bajo anestesia con gas isoflurano a 1, 4 y 23.5 horas después de la administración del compuesto marcado con ^{64}Cu (4.62–4.72 MBq/animal). Los resultados se muestran en las Figuras 8 a 13. Se observó acumulación de cada compuesto en el tumor. Cabe señalar que las columnas muestran a los mismos individuos, por ejemplo, la columna izquierda muestra los resultados de los mismos individuos a 1 hora, 4 horas y 23.5 horas después de la administración. Mientras tanto, cada flecha blanca indica la localización del tumor implantado.

Figura 8: Conjugado marcado con ^{64}Cu : Conjugado No. 64- ^{64}Cu

Figura 9: Conjugado marcado con ^{64}Cu : Conjugado No. 62- ^{64}Cu

Figura 10: Conjugado marcado con ^{64}Cu : Conjugado No. 2- ^{64}Cu

Figura 11: Conjugado marcado con ^{64}Cu : Conjugado No. 56- ^{64}Cu

15 Figura 12: Conjugado marcado con ^{64}Cu : Conjugado No. 58- ^{64}Cu

EJEMPLO 6 Estudio de Eficacia del Conjugado Marcado con ^{177}Lu

Marcaje del Péptido con ^{177}Lu

La solución de reacción de marcaje (Cuadro 11) que contiene cada conjugado sintetizado en los Ejemplos 1 o 2: Conjugado No. 64, Conjugado No. 62 o Conjugado No. 65 se calentó a 95°C durante 20 10 min para el marcaje con ^{177}Lu .

CUADRO 11

CUADRO 11 Composición de la sustancia de ensayo

Nombre	Compuesto a dosis de 30 MBq	Compuesto a dosis de 60 MBq
Conjugado	2.8 nmol/50 μl	2.8 nmol/50 μl
DMSO	1.43 - 1.56 μl	1.56 μl
Cloruro de lutecio	210 MBq/50 μl (ensayo a las 15:00 del día de marcaje)	420 MBq/50 μl (ensayo a las 15:00 del día de marcaje)
Hidrato de acetato de sodio	0.36 - 0.38 mol/l	0.34 mol/l
Ácido acético	0.24 - 0.25 mol/l	0.23 mol/l
Ácido ascórbico	5.6 mg/ml	5.6 mg/ml
Ácido gentísico	1.28 mg/ml	1.28 mg/ml

25

Radio HPLC

Cada sustancia de ensayo marcada con ^{177}Lu (en lo sucesivo, también denominada "sustancia de ensayo") sintetizada como se describió anteriormente se mezcló con acetonitrilo, y la pureza

radioquímica se midió antes y después de la administración utilizando TSK gel ODS-80Ts QA (marca registrada), 4.6 mm ID × 250 mm, 5 µm (Tosoh Corporation). Los resultados muestran que la pureza fue del 90.31-100%.

Radio TLC

5 La placa de gel de sílice TLC 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck, 115389) sobre la cual se aplicó la sustancia de ensayo se desarrolló con una solución mixta de solución de acetato de amonio 2 mol/l/acetona (1:1). Posteriormente, se midió la radiactividad utilizando un radiocromatógrafo (intervalo de energía: 60–350 keV; colimador: 1.0 cm; cristal BGO en forma de V; tiempo de medición: 10 min). Los resultados muestran que la pureza fue del 97.25-98.23%.

10 Preparación de Cabozantinib

Como Ejemplo Comparativo, se utilizó cabozantinib, un medicamento conocido para carcinoma de células renales y carcinoma hepatocelular y también conocido por ser eficaz contra cáncer colorrectal. Cabozantinib (Selleckchem; No. S1119) se disolvió en DMSO a 100 mg/ml, se añadió en alícuotas, se congeló y se almacenó. Esto fue la solución de Cabozantinib en DMSO. El día de la administración, la solución de Cabozantinib en DMSO se descongeló y se añadió agua para inyección para alcanzar una concentración de dosificación de 30 mg/ml. Esto fue la solución de Cabozantinib.

Preparación de Animales Experimentales

20 Ratones hembra BALB/cSlc-nu/nu de cinco semanas de edad se adquirieron de Japan SLC (Shizuoka, Japón) y se utilizaron para la preparación de animales experimentales. Después de la aclimatación, células HT-29 derivadas de cáncer de colon humano se suspendieron a 5×10^7 células/ml en una mezcla 1:2 de PBS (pH 7.4, 1×; Thermo Fisher Scientific, 10010-023) y VitroGel (The Well Bioscience, VHM01). Una porción de 0.1 ml de la suspensión se inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones nude atímicos (de 6 semanas de edad) utilizando una jeringa desechable con aguja. El número de animales evaluados fue 6 por grupo, para un total de 9 grupos.

25 Los animales evaluados al momento de uso pesaban 16.28 g a 20.05 g y tenían tamaños tumorales de 88 a 229 mm³.

Evaluación de eficacia

30 Solución salina (Saline) y cada péptido marcado con ¹⁷⁷Lu se administraron por vía intravenosa a 30 MBq/animal o 60 MBq/animal en ratones portadores de tumor HT-29 en los Días 0, 11 y 18. Además, el grupo de administración de cabozantinib se administró por vía oral diariamente desde el Día 0 hasta el Día 27 a una dosis calculada de 30 mg/kg basada en los datos de peso corporal del día de administración. El peso corporal y el volumen tumoral se midieron dos veces por semana hasta el Día 49, y todos los animales sobrevivientes en el último día de medición fueron eutanizados.

Resultados del Tamaño Tumoral

La evolución temporal del tamaño tumoral para cada grupo se muestra en la Figura 13. Conjugado No. 64-¹⁷⁷Lu (30 MBq/animal, 3 dosis), Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (30 MBq/animal, 3 dosis) y Conjugado No. 65-¹⁷⁷Lu (60 MBq/animal, una sola dosis) exhibieron excelentes efectos antitumorales.

Resultados del Peso Corporal

La evolución temporal del peso corporal para cada grupo se muestra en la Figura 14. En cuanto al Conjugado No. 64-¹⁷⁷Lu (30 MBq/animal, 3 dosis), Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu (30 MBq/animal, 3 dosis) y Conjugado No. 65-¹⁷⁷Lu (60 MBq/animal, una sola dosis), que exhibieron excelentes efectos antitumorales, no se observó pérdida de peso significativa.

EJEMPLO 7 Distribución *In Vivo* del Conjugado Marcado con ⁶⁴Cu o ¹⁷⁷Lu (en modelo Xenoinjertado VMRC-RCW)

Marcaje del Péptido con ⁶⁴Cu o ¹⁷⁷Lu

Cada péptido se marcó calentando la solución de reacción de marcaje con ⁶⁴Cu (Cuadro 12) o la solución de reacción de marcaje con ¹⁷⁷Lu (Cuadro 13) que contenía el Conjugado No. 62 a 95°C durante 10 min.

Composición de la solución de reacción de marcaje (Conjugado No. 62-⁶⁴Cu)

CUADRO 12

Composición de la solución de reacción de marcaje (Conjugado No. 62-⁶⁴Cu)

Componente	Cantidad (en 50 µl)
Conjugado No. 62	1.40 nmol
DMSO	1.52 µl
Cloruro de cobre (⁶⁴ Cu)	30.6-31.6MBq (ensayo a las 12:00 del día de administración)
Acetato de sodio hidratado	18.52 µmol
Ácido acético	12.34 µmol
Ácido ascórbico	0.28 mg
Ácido gentísico	64 µg

Composición de la solución de reacción de marcaje (Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu)

CUADRO 13

Composición de la solución de reacción de marcaje (Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu)

Componente	Cantidad (en 50 µl)
Conjugado No. 62	2.79 nmol
DMSO	1.52 µl
Cloruro de lutecio (^{177}Lu)	39.4 MBq (ensayo a las 12:00 del día de administración)
Acetato de sodio hidratado	20.27 µmol
Ácido acético	13.51 µmol
Ácido ascórbico	0.28 mg
Ácido gentísico	64 µg

Radio HPLC

El Conjugado No. 62- ^{64}Cu o el Conjugado No. 62- ^{177}Lu sintetizado como se describió anteriormente se mezcló con acetonitrilo, y la pureza radioquímica se midió antes y después de la administración utilizando TSK gel ODS-80Ts QA (marca registrada), 4.6 mm ID × 250 mm, 5 µm (Tosoh Corporation). Los resultados muestran que la pureza fue del 100%.

Radio TLC

La placa de Gel de Sílice TLC 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck, 115389) sobre la cual se aplicó cada sustancia de ensayo (Conjugado No. 62- ^{64}Cu o Conjugado No. 62- ^{177}Lu), se desarrolló con una solución mixta de solución de acetato de amonio 2 mol/l/acetona (1:1). Posteriormente, se midió la radiactividad utilizando un radiocromatógrafo (tiempo de medición: 10 min). Los resultados muestran que la pureza fue del 98.26-99.27%.

Preparación de Animales Experimentales (Ratones Portadores de Tumor VMRC-RCW)

Ratones hembra BALB/c-nu de cinco semanas de edad se adquirieron de Jackson Laboratory Japan (Kanagawa, Japón) y se utilizaron para la preparación de animales experimentales. Después de la aclimatación, células VMRC-RCW derivadas de carcinoma de células renales humano se suspendieron a 5×10^7 células/ml en EMEM (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japón). Una porción de 0.1 ml de la suspensión se inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones nude atímicos (de 6 semanas de edad) utilizando una jeringa desechable con aguja.

Los animales evaluados al momento de uso pesaban 18.2g a 21g y tenían tamaños tumorales de 80 a 386 mm³.

Distribución *In Vivo*

Cada sustancia de ensayo se administró como una dosis única por vía intravenosa a ratones portadores de tumor VMRC-RCW. Se realizaron autopsias a las 4, 24 y 48 horas después de la administración, y se midió la concentración de radiactividad (%ID/g) de cada tejido.

Resultados

La Figura 15 muestra los resultados de la distribución *in vivo* del Conjugado No. 62- ^{64}Cu y la

Figura 16 muestra los resultados de la distribución *in vivo* del Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu.

Imagen PET/CT

Las imágenes PET/CT se recolectaron bajo anestesia con gas isoflurano a 1, 4, 23.5 y 47.5 horas después de la administración del Conjugado No. 62-⁶⁴Cu, y se encontró que los tumores se detectaron claramente. La Figura 17 muestra las imágenes en cada punto temporal. Cabe señalar que las columnas muestran a los mismos individuos, por ejemplo, la columna izquierda muestra los resultados del mismo individuo a 1 hora, 4 horas, 23.5 horas y 47.5 horas después de la administración.

EJEMPLO 8 Estudio de Eficacia del péptido marcado con ¹⁷⁷Lu (en Modelo Xenoinjertado VMRC-RCW)

10 Marcaje del Péptido con ¹⁷⁷Lu

Se preparó una solución de reacción de marcaje con ¹⁷⁷Lu que contenía el Conjugado No. 62 para administración a 30 MBq/animal o 60 MBq/animal (Cuadro 14), y la reacción de marcaje se llevó a cabo calentando a 95°C durante 10 min.

La composición de la solución de reacción de marcaje para el Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu

15 **CUADRO 14**

Composición de la solución de reacción de marcaje para el Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu

Nombre	30 MBq/animal Conjugado No. 62- ¹⁷⁷ Lu	60 MBq/animal Conjugado No. 62- ¹⁷⁷ Lu
Conjugado No. 62	1.4 nmol/50 µl	2.8 nmol/50 µl
DMSO	1.52 µl/50 µl	1.52 µl/50 µl
Cloruro de lutecio (en lo sucesivo, ¹⁷⁷ Lu) (Valor objetivo)	210 MBq/50 µl (ensayo a las 15:00 del día de marcaje)	420 MBq/50 µl (ensayo a las 15:00 del día de marcaje)
Acetato de sodio hidratado	0.37 mol/l	0.33 - 0.34 mol/l
Ácido acético	0.25 mol/l	0.22 mol/l
Ácido ascórbico	5.6 mg/ml	5.6 mg/ml
Ácido gentísico	1.28 mg/ml	1.28 mg/ml

Radio HPLC

20 El Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu sintetizado como se describió anteriormente se mezcló con acetonitrilo, y la pureza radioquímica se midió antes y después de la administración utilizando TSK gel ODS-80Ts QA (marca registrada), 4.6 mm ID × 250 mm, 5 µm (Tosoh Corporation). Los resultados muestran que la pureza fue del 99.6-100%.

Radio TLC

25 La placa de Gel de Sílice TLC 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck, 115389) sobre la cual se aplicó el Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu se desarrolló con una solución mixta de solución de acetato de amonio 2 mol/l/acetona (1:1). Posteriormente, se midió la radiactividad utilizando un radiocromatógrafo

(intervalo de energía: 13-250 keV; colimador: 1.0 cm; cristal BGO en forma de V; tiempo de medición: 10 min). Los resultados muestran que la pureza fue del 98.1-98.6%.

Preparación de Cabozantinib

5 Como Ejemplo Comparativo, Cabozantinib (Selleckchem; No. S1119) se disolvió en DMSO a 100 mg/ml, se añadió en alícuotas, se congeló y se almacenó. Esto fue la solución de Cabozantinib en DMSO. El día de la administración, la solución de Cabozantinib en DMSO se descongeló y se añadió agua para inyección para alcanzar una concentración de dosificación de 12.3 mg/ml. Esto fue la solución de Cabozantinib.

Preparación de Animales Experimentales (Ratones Portadores de Tumor VMRC-RCW)

10 Ratones hembra BALB/c-nu de cinco semanas de edad se adquirieron de Jackson Laboratory Japan (Kanagawa, Japón) y se utilizaron para la preparación de animales experimentales. Después de la aclimatación, células VMRC-RCW derivadas de carcinoma de células renales humano se suspendieron a 5×10^7 células/ml en EMEM (Medio Mínimo Esencial de Eagle, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japón). Una porción de 0.1 ml de la suspensión se inoculó por vía
15 subcutánea en el flanco derecho de ratones ratones nude atímicos (de 6 semanas de edad) utilizando una jeringa desechable con aguja.

Los animales evaluados al momento de uso pesaban 19.3 g a 21.9 g y tenían tamaños tumorales de 216 a 445 mm³.

Evaluación de eficacia

20 Una dosis única (80 µl/animal) de solución salina (Saline) y de Conjugado No.62-¹⁷⁷Lu producido como se describió anteriormente se administró por vía intravenosa en la vena de la cola a ratones (de 8 semanas de edad en el Día 0) en cada grupo, como se muestra en el Cuadro 15 a continuación.

Relación entre la Solución Administrada y el Día de Administración para Cada Grupo

25 **CUADRO 15**

Relación entre la solución administrada y el día de administración para cada grupo

Grupo	Solución administrada	Conjugado No. 62- ¹⁷⁷ Lu	Día de administración			
			Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
Grupo 1	Solución salina		○	○	○	-
Grupo 3	30 MBq/animal Conjugado No. 62- ¹⁷⁷ Lu	0.2 nmol/animal	○	-	-	-
Grupo 4	30 MBq/animal Conjugado No. 62- ¹⁷⁷ Lu	0.2 nmol/animal	○	-	○	-
Grupo 5	30 MBq/animal Conjugado No. 62- ¹⁷⁷ Lu	0.2 nmol/animal	○	○	○	-
Grupo 6	30 MBq/animal Conjugado No. 62- ¹⁷⁷ Lu	0.2 nmol/animal	○	○	○	○
Grupo 7	60 MBq/animal Conjugado No. 62- ¹⁷⁷ Lu	0.4 nmol/animal	○	-	-	-
Grupo 8	60 MBq/animal Conjugado No. 62- ¹⁷⁷ Lu	0.4nmol/animal	○	-	○	-

Se administró en el día indicado con ○. No se administró en el día indicado con –.

El grupo de administración de cabozantinib se administró por vía oral diariamente desde el Día 0 hasta el Día 27 a una dosis calculada de 12.3 mg/kg basada en los datos de peso corporal del día de administración.

5 Resultados del Tamaño Tumoral

La evolución temporal del tamaño tumoral para cada grupo se muestra en la Figura 18. El Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu exhibió excelentes efectos antitumorales.

Resultados del Peso Corporal

El cambio porcentual medio del peso corporal para cada grupo se muestra en la Figura 19.

10 No se observó pérdida de peso significativa en cada grupo tratado con el Conjugado No. 62-¹⁷⁷Lu.

EJEMPLO 9 Estudio de Eficacia y Distribución *In Vivo* del péptido marcado con ²²⁵Ac

Marcaje del Péptido con ²²⁵Ac

La solución de reacción de marcaje (Cuadro 16) que contenía el Conjugado No. 62 se calentó a 95°C durante 20 min para el marcaje, para preparar el compuesto marcado con ²²⁵Ac.

15 Composición de la solución de reacción de marcaje (50 µl)

CUADRO 16

Composición de la solución de reacción de marcaje (50 µl)

Péptido	1.5 nmol
DMSO	3.22 μ l
Cloruro de actinio (^{225}Ac)	227-242 MBq (ensayo a las 10:00 del día de administración)
Acetato de sodio hidratado	7.89 μ mol
Ácido acético	0.0867 μ mol
Ácido ascórbico	132 μ g
Tween (R) 20	0.02 mg

Radio HPLC

La sustancia de ensayo se mezcló con acetonitrilo, y la pureza radioquímica se midió antes de la administración utilizando TSK gel ODS-80Ts QA (marca registrada), 4.6 mm ID $\times$ 150 mm, 5 μ m (Tosoh Corporation). Los resultados muestran que la pureza fue del 97.9%.

Radio TLC

La placa de Gel de Sílice TLC 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck, 115389) sobre la cual se aplicó la sustancia de ensayo se desarrolló con una solución mixta de solución de acetato de amonio 2 mol/l/acetona (1:1). Posteriormente, se midió la radiactividad utilizando un radiocromatógrafo (intervalo de energía: 180-500 keV; colimador: 1.0 cm; cristal BGO en forma de V; tiempo de medición: 10 min). Los resultados muestran que la pureza fue del 97.7%.

Preparación de Animales Experimentales (ratones portadores de Tumor HT-29)

Ratones hembra BALB/cSlc-nu/nu de seis semanas de edad se adquirieron de Japan SLC (Shizuoka, Japón) y se utilizaron para la preparación de animales experimentales. Después de la aclimatación, células HT-29 derivadas de cáncer de colon humano se suspendieron a 5×10^7 células/ml en una mezcla 1:2 de PBS (pH 7.4, 1 $\times$; Thermo Fisher Scientific, 10010-023) y VitroGel (The Well Bioscience, VHM01). Una porción de 0.1 ml de la suspensión se inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones nude atímicos (de 7 semanas de edad) utilizando una jeringa desechable con aguja.

El número de animales evaluados fue 3 por grupo, para un total de 3 grupos. Los animales evaluados al momento de uso pesaban 17.8 g a 19.63 g y tenían tamaños tumorales de 151 a 275 mm³.

Distribución *In Vivo*

El compuesto marcado con ^{225}Ac se administró como una dosis única por vía intravenosa a ratones portadores de tumor HT-29 (de 9 semanas de edad). Se realizaron autopsias a las 4, 24 y 48 horas después de la administración, y se midió la concentración de radiactividad (%ID/g) de cada tejido.

Resultados

Los resultados de la distribución *in vivo* del compuesto marcado con ^{225}Ac se muestran en la

Figura 20.

EJEMPLO 10 Estudio de Eficacia del Péptido Marcado con ^{225}Ac

Marcaje del Péptido con ^{225}Ac

- La solución de reacción de marcaje (Cuadro 17) que contenía el Conjugado No. 62 se calentó a 95°C durante 20 min para el marcaje, para preparar la sustancia de ensayo.

Composición de la sustancia de ensayo

CUADRO 17

Composición de la sustancia de ensayo

Componente	Volumen
Solución de péptido (10 mg/ml en DMSO)	19.7 μl
solución de disolución de ^{225}Ac (en HCl 0.04 mol/l)	20 μl (14580kBq)
Tampón Composición Tampón de acetato de sodio 0.2 mol/l (pH 6.5) Ácido ascórbico 3.3 mg/ml Tween (R) 20 0.05%	210.3 μl

10 Radio HPLC

La sustancia de ensayo se midió para pureza radioquímica antes de la administración utilizando Jupiter (marca registrada) C18 5 μm 4.6 $\times$ 150mm (Phenomenex). Los resultados muestran que la pureza fue del 97.25%.

Radio TLC

- 15 La sustancia de ensayo se aplicó en TLC-SG Paper (Agilent, SGI0001), la cual se desarrolló en un solvente que contenía EDTA 25mM y acetato de amonio 0.1 mol/l, y la radiactividad se midió con Bioscan AR-2000 (Eckert & Ziegler). Los resultados muestran que la pureza fue del 99% o superior.

Preparación de Animales Experimentales (Ratones portadores de Tumor HT-29)

- 20 Ratones hembra BALB/cSlc nude atímicos de cinco semanas de edad se adquirieron de Charles River Laboratories (Wilmington, EE.UU.) y se utilizaron para la preparación de animales experimentales. Después de la aclimatación, células HT-29 derivadas de cáncer de colon humano se suspendieron a 5 $\times$ 10⁷ células/ml en una mezcla 1:2 de PBS (pH 7.4, 1 $\times$; Thermo Fisher Scientific, 10010-023) y VitroGel (The Well Bioscience, VHM01). Una porción de 0.1 ml de la suspensión se
- 25 inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones nude atímicos (de 7 semanas de edad) utilizando una jeringa desechable con aguja.

El número de animales evaluados fue 10 por grupo, para un total de 6 grupos. El día antes de la administración del péptido marcado con ^{225}Ac , los animales evaluados pesaban 16.95 g a 17.83 g

PBS y el péptido marcado con ^{225}Ac se administraron por vía intravenosa a ratones portadores de tumor HT-29 10 días después de la implantación de células HT-29, a 30 kBq/animal, 60 MBq/animal, 90 MBq/animal, 120 MBq/animal o 150 MBq/animal. El peso corporal y el volumen tumoral se midieron dos veces por semana hasta el Día 70, y todos los animales sobrevivientes en el último día de medición fueron eutanizados.

La evolución temporal del tamaño tumoral para cada grupo se muestra en la Figura 21. El Conjugado No.62 marcado con ^{225}Ac exhibió excelentes efectos antitumorales dependiendo de la radiactividad.

La evolución temporal del peso corporal para cada grupo se muestra en la Figura 22. No se observó pérdida de peso significativa por la administración del Conjugado No. 62 marcado con ²²⁵Ac.

EJEMPLO 11-1 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 74

[illegible]

El conjugado peptídico Conjugado No. 62 (10 mg) obtenido en el Ejemplo 1-5 se disolvió en
20 solución acuosa de acetato de sodio 100 mM (0.465 ml), y luego se disolvió cloruro de lantano(III)
heptahidratado (25.9 mg, CAS: 10025-84-0). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante 60 min.

La mezcla de reacción obtenida anteriormente se purificó bajo las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5µm, 50 × 250 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1%

(en agua) y B = TFA 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 0–0% durante 5 min, 0–4.2% durante 2 min, 4.2–24.6% durante 3 min, 24.6–29.7% durante 15.5 min, 29.7–60% durante 1.5 min y 60–90% durante 4 min; caudal: 18–18 ml/min durante 5.0 min, 18–118 ml/min durante 2 min, luego 118 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

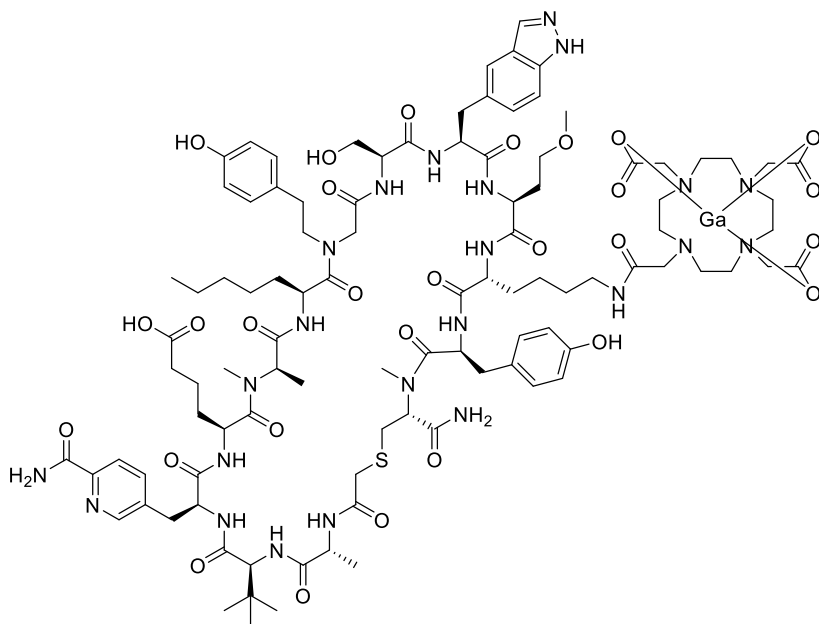
La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 96.5%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 3.54 min

ESI-MS(+): observado $m/z = 1143.45 (M+2H)^{2+}$

EJEMPLO 11-2 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 75

[Fórmula Química 24]



El péptido SEQ ID No. 46 (10 mg) obtenido en el Ejemplo 1-2, DIEA (15.7 μ l) y DOTA-NHS éster hexafluorofosfato trifluoroacetato (5.04 mg) se disolvieron en DMF (0.50 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 60 min, y luego se añadieron cloruro de galio(III) (3.52 mg, CAS: 13450-90-3) y solución acuosa de acetato de sodio 50 mM (0.40 ml) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a 90°C durante 1 hora.

La mezcla de reacción resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μ m 30 $\times$ 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 5.0–27% durante 3 min, 27–32% durante 8 min, 32–60% durante 1 min; caudal: 45 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido de interés.

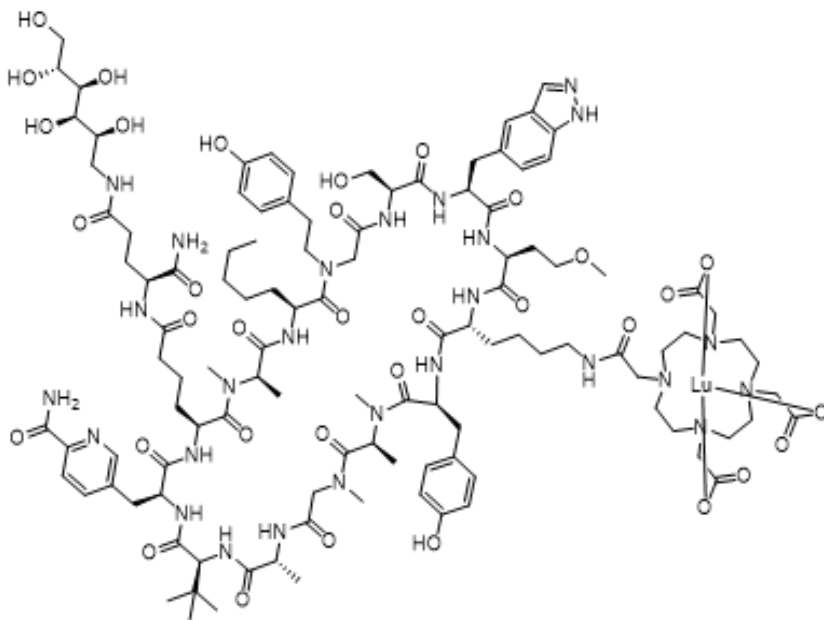
La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 99.5%.

Condición analítica A: tiempo de retención = 3.24 min

5 ESI-MS(+): observado $m/z = 1108.94$ ($M+2H$)²⁺

EJEMPLO 11-3 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 78

[Fórmula Química 25]



Se utilizó sustancialmente el mismo método que para el Conjugado No. 67 para sintetizar un péptido cíclico (secuencia:
 10 da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk(Alloc)-Y-MeA-MeG) (SEQ ID No. 103).
 Se utilizó Fmoc-dk(Alloc)-OH en lugar de Fmoc-dk(Boc)-OH.

La purificación se realizó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μ m 50 $\times$ 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1%
 15 (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (%B): 8-8% durante 2 min, 8-33% durante 1 min, 33-38% durante 8 min, 38-60% durante 1 min; caudal: 20-20 ml/min durante 1 min, 20-120 ml/min durante 1 min, luego 120 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron.

El péptido cíclico (38 mg) obtenido por el método anterior se disolvió en DMF (0.65 ml); se
 20 añadió una solución en DMF (58.7 μ l) que contenía 2,4,6-trimetilpiridina (25.8 μ l, CAS: 108-75-8) y HATU 0.5 M, y la mezcla se agitó a 25°C durante 5 min. Fmoc-Qglucamina-NH₂ (50 mg) se disolvió en DMSO (0.94 ml); se añadió TEA (0.20 ml) y la mezcla se agitó a 60°C durante 1 hora; la mezcla se concentró a presión reducida utilizando V-10 de Biotage; se realizó trituración con éter metil *terc*-

butílico; se añadió una solución de DMSO (0.50 ml) que contenía H-Qglucamina-NH₂ (7.9 mg) sintetizada por el método anterior a la solución de reacción que contenía el péptido cíclico anterior, y la mezcla se agitó durante 2 horas. Se añadió agua (50 µl) y luego la mezcla se concentró a presión reducida utilizando V-10 de Biotage. La mezcla resultante se disolvió en DMF (0.67 ml); se añadieron 5 fenilsilano (25 µl, CAS: 694-53-1) y Pd(PPh₃)₄ (4.6 mg, CAS: 14221-01-3), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 50 min. A la mezcla resultante se añadieron DIPEA (68 µl) y DOTA-NHS sal TFA (36 mg, CAS: 2832911-57-4). La mezcla se agitó a 25°C durante toda la noche. Después de añadir agua (100 µl), la mitad de la mezcla resultante se diluyó con DMSO (1 ml) y agua (1 ml). La mezcla se agitó con solución acuosa de acetato de amonio que contenía cloruro de lutecio(III) 0.5 M 10 (2.4 ml, pH 5.0) a 90°C durante 1 hora. La suspensión resultante se concentró a presión reducida utilizando V-10 de Biotage y se disolvió en DMSO/agua (9/1, 4 ml).

La solución acuosa resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 µm 50 × 250 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 0–0% durante 5 min, 0–4.2% durante 15 2 min, 4.2–19.5% durante 3 min, 19.5–24.6% durante 15.5 min, 24.6–60% durante 1.5 min; caudal: 18–18 ml/min durante 5 min, 18–118 ml/min durante 2 min, luego 118 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron.

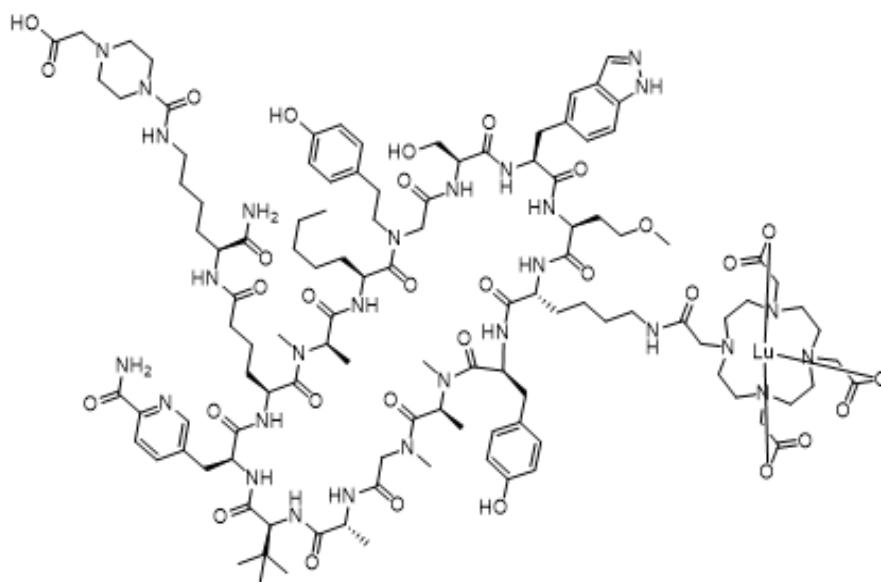
La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo 20 fue del 97.7%.

Condición analítica B: tiempo de retención = 5.72 min

ESI-MS(+): observado m/z = 865.85 (M+3H)³⁺

EJEMPLO 11-4 Síntesis del Conjugado SEQ ID No. 79

[Fórmula Química 26]



Se utilizó sustancialmente el mismo método que para el Conjugado No. 67 para sintetizar un péptido cíclico (secuencia:

da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk(Alloc)-Y-MeA-MeG) (SEQ ID No. 103).

- 5 Se utilizó Fmoc-dk(Alloc)-OH en lugar de Fmoc-dk(Boc)-OH.

La purificación se realizó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μ m 50 $\times$ 150 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (%B): 8-8% durante 2 min, 8-33% durante 1 min, 33-38% durante 8 min, 38-60% durante 1 min; caudal: 20-20 ml/min durante 1 min, 20-120 ml/min durante 10 1 min, luego 120 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron.

El péptido cíclico (38 mg) obtenido por el método anterior se disolvió en DMF (0.65 ml); se añadió una disolución en DMF (58.7 μ l) que contenía 2,4,6-trimetilpiridina (25.8 μ l, CAS: 108-75-8) y HATU 0.5 M a 25°C, y la mezcla se agitó durante 5 min. Se añadió una solución de DMSO (0.50 ml) que contenía H-KCOpipzaa(Mpe)-NH₂ (10.2 mg) a la solución de reacción que contenía el péptido cíclico 15 anterior, y la mezcla se agitó durante 1.5 horas. Se añadió agua (50 μ l) y luego la mezcla se concentró a presión reducida utilizando V-10 de Biotage. La mezcla resultante se disolvió en TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, 0.5 ml) y se agitó durante 30 min. La mezcla resultante se añadió a éter diisopropílico/heptano (1/1, 5 ml), y el sólido resultante se centrifugó. Se eliminó el sobrenadante y 20 el resto se lavó con éter diisopropílico/heptano (1/1, 5 ml). El material resultante se secó a presión reducida y se disolvió en DMF (0.67 ml). Se añadieron fenilsilano (25 μ l, CAS: 694-53-1) y Pd(PPh₃)₄ (4.6 mg, CAS: 14221-01-3), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 50 min. A la mezcla resultante se añadieron DIPEA (68 μ l) y DOTA-NHS sal TFA (36 mg, CAS: 2832911-57-4). La mezcla

se agitó a 25°C durante toda la noche. Después de añadir agua (100 µl), la mitad de la mezcla resultante se diluyó con DMSO (1 ml) y agua (1 ml). La mezcla se agitó con solución acuosa de acetato de amonio que contenía cloruro de lutecio(III) 0.5 M (2.4 ml, pH 5.0) a 90°C durante 1 hora. La suspensión resultante se concentró a presión reducida utilizando V-10 de Biotage y se disolvió en DMSO/agua (9/1, 4 ml).

La solución acuosa resultante se purificó utilizando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 µm 50 × 250 mm; fase móvil: A = TFA al 0.1% (en agua), B = TFA al 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (%B): 0–0% durante 5 min, 0–4.2% durante 2 min, 4.2–19.5% durante 3 min, 19.5–24.6% durante 15.5 min, 24.6–60% durante 1.5 min; caudal: 18–18 ml/min durante 5 min, 18–118 ml/min durante 2 min, luego 118 ml/min). Las fracciones que contenían el producto objetivo se recogieron y se liofilizaron.

La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo las condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 96.6%.

Condición analítica B: tiempo de retención = 5.70 min
ESI-MS(+): observado m/z = 867.91 (M+3H)³⁺

EJEMPLO 11-5 Síntesis del Conjugado

De acuerdo con el método general descrito en el Ejemplo 1 y en los Ejemplos 11-1/2, se sintetizaron cada péptido objetivo y un conjugado que contiene dicho péptido y una carga útil, tal como se enumeran en el cuadro siguiente.

CUADRO 18

No. de Conjugado	Citización	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Término	m/z	[M+H] ⁺	Tiempo de Retención	Condiciones	KD (u)
70	CfAc	da	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	PeG	D	3PyxNH2	HseMe	α(DOTA)	Y	MeC		NH2					
71	CfAc	da	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	PeG	D	Sinda	HseMe	α(DOTA)	Y	MeC		NH2					
72	CfAc	α(DOTA)	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	PeG	D	3PyxNH2	HseMe	da	Y	MeC		NH2					
73	CfAc	da	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	PeG	D	Sinda	HseMe	α(DOTA-4-aminCh)	Y	MeC		NH2					
74	CfAc	da	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	phPeG	S	Sinda	HseMe	α(DOTA)	Y	MeC		NH2	1143.45	2	3.54	A	1.11E-10
75	CfAc	da	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	phPeG	S	Sinda	HseMe	di(DOTA-4-Ga)	Y	MeC		NH2	1108.94	2	3.236	A	6.03E-11
76	Libre	da	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	phPeG	S	Sinda	HseMe	α(DOTA)	Y	MeS		NH2	774.14	3	3.416	A	1.53E-10
77	Libre	da	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	phPeG	S	Sinda	HseMe	α(DOTA)	Y	MeS		NH2	773.85	3	3.188	A	9.88E-11
78	Libre	da	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	phPeG	S	Sinda	HseMe	α(DOTA)	Y	MeA		NH2	855.85	3	5.724	B	1.50E-10
79	Libre	da	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	phPeG	S	Sinda	HseMe	α(DOTA)	Y	MeA		NH2	897.91	3	5.7	B	1.00E-10
80	Libre	da	Tog	3PyxCON	Hg	Meda	Alo	phPeG	S	Sinda	HseMe	α(DOTA)	Y	MeA		NH2	816.3	3	3.072	A	5.13E-11
81	Libre	da	Tog	3PyxCON	αChenina	Meda	Alo	phPeG	S	Sinda	HseMe	α(DOTA)	Y	MeA		NH2	826.3	3	3.094	A	1.00E-10

El Cuadro 18 lista los conjugados objetivo, las condiciones analíticas y los tiempos de retención, y los valores observados de ESI-MS(+).

En el Cuadro 18, el "extremo" indica el grupo funcional C-terminal (en el cuadro, "-OH" indica COOH y "-NH₂" indica CO(NH₂)), y el caso en blanco indica que no hay un grupo funcional presente en el extremo C-terminal. Con respecto a "Ciclización" en los cuadros, las entradas con la descripción "CIAC" representan que la ciclización se logró enlazando el aminoácido en la posición 1 en el cual se introdujo un grupo cloroacetilo con C o MeC presente en el extremo C-terminal, mientras que la descripción "Libre" indica que el grupo amino N-terminal del aminoácido en la posición 1 está enlazado al grupo carboxi C-terminal del aminoácido en la posición 13 o 14. Además, por ejemplo, en el conjugado del Conjugado No. 75, los residuos de aminoácidos de C en X1 y X13 forman una estructura cíclica y la cadena lateral de dk en X11 está unida a la carga útil, es decir, DOTA coordinado con Ga. Asimismo, en el Conjugado No. 76 listado en el Cuadro 8, los residuos de aminoácidos de MeG en X1 y X14 igualmente forman una estructura cíclica y la cadena lateral de dk en X11 está unida a la carga útil, es decir, DOTA coordinado con Lu.

CUADRO 19-1

SEQ ID No.	SEQ														Adicional
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
2	da	I	3Py6NH2	S	PeG	Ahp	PeG	H	3Py6NH2	Ahp	G	Y	C		G
3	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	PeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	G	Y	MeC		G
4	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	PeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	G	Y	MeC		
5	de	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	G	Y	MeC		
6	de	Tbg	3Py6CON	Hgl	PeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	G	Y	MeC		
7	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
8	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
9	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
10	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
11	dhgl	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
12	da	Tbg	3Py6CON	all	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
13	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	P	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
14	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	F4OMe	HseMe	da	Y	MeC		
15	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	plMeOPeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
16	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	MeMeapG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
17	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	3OMePeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
18	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	Y	HseMe	da	Y	MeC		
19	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	MeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
20	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	D	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
21	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
22	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
23	de	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	plMeOPeG	S	Y	HseMe	da	Y	MeC		
24	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	plMeOPeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
25	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
26	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	plMeOPeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
27	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	mPeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
28	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	pPeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
29	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	4HPeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
30	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	4OMePeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
31	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	4PyG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
32	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	P4Sh	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC		
33	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
34	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	AcB	Y	MeC		
35	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
36	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
37	da	Tbg	3Py6CON	DabAc	MeG	Ahp	PeG	S	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
38	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	4COOPeG	S	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
39	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	3COOPeG	S	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
40	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	3PeG	S	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
41	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	Hse	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
42	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	SMa	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
43	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	Qmm	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
44	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	Qdm	Sinda	HseMe	da	Y	MeC		
45	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC		
46	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	plPeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC		
47	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC		
48	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	plPeG	S	Sinda	HseMe	dkAc	Y	MeA	MeG	
49	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	plPeG	S	Sinda	HseMe	dkAc	Y	MeA	MeG	
50	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	plPeG	S	Sinda	HseMe	dkAc	Y	MeA	MeG	
51	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Ahp	plPeG	S	Sinda	HseMe	dkAc	Y	MeS	MeG	

CUADRO 19-2

52	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dkAc	Y	MeN	MeG
53	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dkAc	Y	Hpr	MeG
54	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dkAc	Y	MeA	dp
55	de(PEG8Me)	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
56	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	D	3Py6NH2	HseMe	dk(F)	Y	MeC	
57	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk(PEG8c)	Y	MeC	
58	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeA	MeG
59	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	PeG	Alp	pHeG	S	3Py6NH2	HseMe	G	Y	MeC	K
60	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeCl	
61	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	PEG10c
62	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	PeG	Alp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	G	Y	MeC	dk
63	dk	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Alp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	G	Y	MeC	
64	da	Tbg	3Py6CON	K	MeG	Alp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	G	Y	MeC	
65	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Alp	PeG	K	3Py6NH2	HseMe	G	Y	MeC	
66	dk	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	da	Y	MeC	
67	dya	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC	
68	da	Tbg	3Py6CON	K	Meda	Alp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC	
69	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	K	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC	
70	dk	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	D	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC	
71	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	K	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC	
72	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	S	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC	
73	de	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	D	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC	
74	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC	
75	de	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
76	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	D	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC	
77	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	D	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
78	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	D	Y	HseMe	dk	Y	MeC	
79	da	Tbg	3Py6CON	alt	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
80	da	Tbg	3Py6CON	K	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
81	da	Tbg	3Py6CON	alt	Meda	Alp	pHeG	K	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
82	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
83	dkCOpipzaa	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
84	da	Tbg	3Py6CON	KCOpipzaa	Meda	Alp	PeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
85	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	KCOpipzaa	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
86	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	S	Sinda	HseMe	dkCOpipzaa	Y	MeC	dk
87	dkCOpipzaa	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	mCHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
88	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	PeG	S	Sinda	HseMe	dkCOpipzaa	Y	MeC	
89	da	Tbg	3Py6CON	Hgl(PEG8Me)	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
90	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	QPEG8Me	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
91	da	Tbg	3Py6CON	Hgn	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeC	
92	da	Tbg	3Py6CON	Hgn	Meda	Alp	pHeG	S	3Py6NH2	HseMe	dk	Y	MeC	
93	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	G	G
94	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeA	MeG
95	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	P	da
96	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	P	Meda
97	da	Tbg	3Py6CON	Hgn	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeS	MeG
98	da	Tbg	3Py6CON	Hgn	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeS	MeG
99	da	Tbg	3Py6CON	Hgn(Qglucanina-NH2)	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeA	MeG
100	da	Tbg	3Py6CON	Hgn(KCOpipzaa-NH2)	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeA	MeG
101	da	Tbg	3Py6CON	Qglucanina	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeA	MeG
102	da	Tbg	3Py6CON	KCOpipzaa	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk	Y	MeA	MeG
103	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	Meda	Alp	pHeG	S	Sinda	HseMe	dk(altac)	Y	MeA	MeG

CUADRO 20-1

No. de Conjugado	SEQ ID No.
1	2
2	4(59)
3	4(62)
4	4(59)
5	4(62)
6	63
7	64
8	65
9	47
10	66
11	67
12	68
13	69
14	45
15	70
16	71
17	72
18	73
19	70
20	72
21	4(59)
22	4(59)
23	74
24	74
25	74
26	46
27	75
28	76
29	77
30	78
31	77
32	76
33	76
34	76
35	76(56)
36	76
37	45
38	46(57)
39	79
40	80

CUADRO 20-2

41	81
42	80
43	82
44	82
45	60
46	83
47	84
48	85
49	88(86)
50	87
51	55
52	89
53	90
54	46
55	45
56	46
57	45
58	46
59	91
60	91
61	92
62	46
63	46
64	45
65	47
66	93
67	58
68	95
69	96
70	73
71	77
72	70
73	77
74	46
75	46
76	97
77	98
78	99
79	100
80	101
81	102

El Cuadro 19 muestra únicamente las secuencias de aminoácidos de los péptidos o porciones

peptídicas contenidas en los conjugados tal como se sintetizaron en los Ejemplos 2 y 11-3. Además, el Cuadro 20 muestra un cuadro de correspondencia entre los conjugados sintetizados y evaluados en este Ejemplo y las SEQ ID Nos. de las secuencias de aminoácidos contenidas en las porciones estructurales cíclicas de los conjugados correspondientes. Cabe señalar que los Conjugados No. 2-5, 21, 22, 35, 38 o 49 corresponden a uno de 4(59), 4(62), 76(55), 46(57) o 88(86). Esto indica, por ejemplo, que en el Conjugado No. 2, la secuencia de aminoácidos contenida en la porción estructural cíclica corresponde a la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID No. 4, y que el complejo péptido-enlazador, en el cual K (lisina), que sirve como enlazador para unir la carga útil DOTA, está unido al extremo C-terminal, corresponde a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 59. Esto indica, por ejemplo, que en el Conjugado No. 35, la secuencia de aminoácidos contenida en la porción estructural cíclica corresponde a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 76, y que el complejo péptido-enlazador, en el cual F (fenilalanina), que sirve como enlazador para unir la carga útil DOTALu, está unido a la cadena lateral de dk en la posición 11 de la secuencia de aminoácidos contenida en esta porción estructural cíclica, corresponde a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 56. Asimismo, en el Conjugado No. 38, la secuencia de aminoácidos contenida en la porción estructural cíclica corresponde a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 46, y que el complejo péptido-enlazador, en el cual PEG8c, que sirve como enlazador para unir la carga útil SulfoCy5, está unido a la cadena lateral de dk en la posición 11 de la secuencia de aminoácidos contenida en esta porción estructural cíclica, corresponde a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 57. Es decir, el número mostrado entre paréntesis en el Cuadro 20 indica el número de secuencia de aminoácidos SEQ ID No. cuando el enlazador o aminoácido adicional está unido.

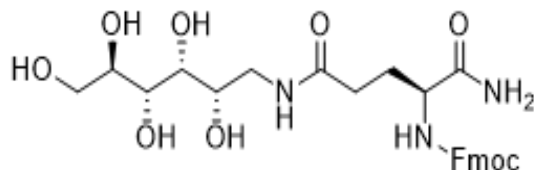
Por ejemplo, el Conjugado No. 1 tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 2 como porción estructural cíclica, y es un complejo en el cual la carga útil, SulfoCy5, está unida a través de un enlazador (es decir, G, PEG10c, K) añadido al extremo C-terminal. Aquí, tanto la secuencia de aminoácidos cíclica sola, como se muestra en el Cuadro 7, como el conjugado con alguna carga útil, como se muestra en el Cuadro 8, tienen capacidad de unión a CA9. Además, existen múltiples conjugados que tienen la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 45 como porción estructural cíclica pero que difieren únicamente en la carga útil (Conjugados No. 14, 37, 55, 57 y 64). Incluso SEQ ID No. 45, sin ninguna carga útil, posee capacidad de unión a CA9, y los conjugados en los cuales diversos quelantes tales como DOTA, estructuras que tienen iones metálicos coordinados a tales quelantes, o sustancias de bajo peso molecular tales como SulfoCy5 están unidas, poseen igualmente capacidad de unión a CA9. Es decir, cuando un determinado conjugado posee capacidad de unión a CA9, es evidente que un péptido cíclico que tiene la secuencia de aminoácidos de la porción estructural cíclica contenida en el conjugado pero que carece de una carga útil, así como

conjugados que difieren únicamente en la carga útil, también poseen capacidad de unión a CA9.

Así, los péptidos de la presente invención tienen capacidad de unión a CA9 independientemente de la presencia o ausencia de la carga útil y del tipo de carga útil.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3 Síntesis de Fmoc-Qglucamina-NH₂

5 [Fórmula Química 27]

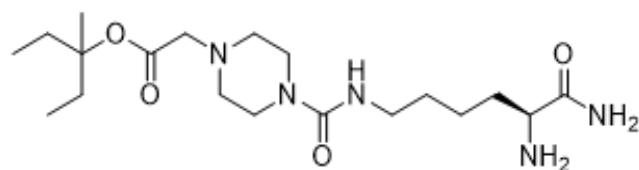


Se añadieron DIPEA (0.14 ml) y HATU (0.19 mg) a una solución de DMF (3.3 ml) que contenía N2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-N5-((2S)-2-hidroxi-2-((4'R,5S)-2,2,2',2'-tetrametil-[4,4'-bi(1,3-dioxolan)]-5-il)etil)-L-glutamina (200 mg, CAS: 1227510-37-3) y cloruro de amonio (34.9 mg, CAS: 12125-02-9), y la mezcla se agitó a 0°C durante 1 hora. La purificación se realizó mediante cromatografía instantánea en columna de sílice (DCM/MeOH = 100/0 a 80/20), y se recolectaron las fracciones que contenían el producto objetivo. Una porción del compuesto resultante (111 mg) se disolvió en DCM (2.7 ml) y etanol (1.8 ml) y se agitó con TFA (1 ml) a 25°C durante una semana. La suspensión resultante se diluyó en éter metil *terc*-butílico y se centrifugó. Tras eliminar el sobrenadante, se realizó trituración con éter metil *terc*-butílico para obtener el compuesto del título.

ESI-MS(+): m/z observado = 532.2 (M+H)⁺

EJEMPLO DE REFERENCIA 4 Síntesis de H-KCOpipzaa(Mpe)-NH₂

[Fórmula Química 28]



Se añadieron DIPEA (0.14 ml) y HATU (0.18 mg) a una solución de DMF (3.2 ml) que contenía N2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-N6-(4-(2-((3-metilpentan-3-il)oxi)-2-oxoetil)piperazin-1-carbonil)-L-lisina (200 mg, CAS: 2973753-38-5) y cloruro de amonio (34.4 mg, CAS: 12125-02-9), y la mezcla se agitó a 25°C durante 2 horas. La purificación se realizó mediante cromatografía instantánea en columna de sílice (DCM/MeOH = 100/0 a 90/10), y se recolectaron las fracciones que contenían el producto objetivo. Una porción (100 mg) del compuesto obtenido se disolvió en DMSO (1.6 ml); se añadió TEA (0.34 ml) y la mezcla se agitó a 60°C durante 1 hora. La mezcla se concentró a presión reducida utilizando V-10 de Biotage. Posteriormente, se realizó trituración con éter metil *terc*-butílico para obtener el compuesto del título.

ESI-MS(+): m/z observado = 400.3 (M+H)⁺

Aplicabilidad industrial

Los péptidos y conjugados de la presente invención tienen actividad de unión a CA9 y pueden utilizarse como composiciones farmacéuticas, composiciones diagnósticas y composiciones de investigación para la prevención o tratamiento de síntomas asociados a CA9, etc.