

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 028**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02701431 .5**  
96 Fecha de presentación: **01.03.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1368064**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.2003**

54 Título: **Síntesis de conjugados de péptido-quelato tetradentado para el diagnóstico del cáncer colorrectal**

30 Prioridad:  
**02.03.2001 GB 0105224**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.07.2012**

73 Titular/es:  
**GE HEALTHCARE LIMITED  
AMERSHAM PLACE LITTLE CHALFONT  
BUCKINGHAMSHIRE HP7 9NA, GB**

72 Inventor/es:  
**CUTHBERTSON, Alan;  
MENDIZABAL, Marivi;  
DIXON, Mark;  
STOREY, Anthony Eamon;  
BACON, Edward Richard;  
DESAI, Vinay Chandrakant;  
KASINA, Sudakar y  
WOLFE, Henry Raphael**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

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

ES 2 385 028 T3

## DESCRIPCIÓN

Síntesis de conjugados de péptido-quelato tetradentado para el diagnóstico del cáncer colorrectal

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a radiofármacos, en particular, la invención se refiere a la preparación de un conjugado de péptido-quelato, cuyo péptido tiene afinidad por el receptor de ST. Este compuesto es adecuado para la obtención de imágenes de diagnóstico del cáncer colorrectal en un mamífero.

El radiomarcado del conjugado de péptido-quelato no interfiere con la afinidad del péptido por el receptor de ST.

También se da a conocer un kit para la producción de un conjugado radiomarcado de péptido-quelato para obtener imágenes de cáncer colorrectal.

10 **Antecedentes de la técnica**

15 El carcinoma colorrectal (CCR) es el cuarto trastorno maligno más común en todo el mundo después de los cánceres de pulmón, mama y próstata. Las metástasis que tienen como origen el CCR son la principal causa de muerte en los pacientes diagnosticados con tumores primarios colorrectales. En los EE.UU. se diagnostican aproximadamente entre 150.000 y 200.000 nuevos casos por año y alrededor de 50.000 muertes se atribuyen a esta enfermedad. Muchos pacientes mueren debido a la diseminación metastásica de la enfermedad, con un 60-80 % de los casos que desarrollan lesiones hepáticas durante la enfermedad. La identificación positiva de la metástasis del hígado es por consiguiente una clara indicación de enfermedad latente. Aunque con una frecuencia mucho menor, otros posibles lugares de propagación incluyen los pulmones, el cerebro y, ocasionalmente, los huesos.

20 Debido a la fuerte correlación entre el grado de afectación hepática (número y localización de metástasis) y la resecabilidad, la evaluación adecuada de la idoneidad de los pacientes con respecto a la cirugía es cada vez más importante (Liver Metastasis: Biology, diagnosis and treatment. Garden O. J., Geregthy J. G., Nagomey D. M. eds. 1998). La necesidad de un agente capaz de detectar metástasis de pequeño tamaño (< 1 cm) tendrá un profundo impacto en el tratamiento y el manejo de pacientes con CCR. Existe la necesidad de detectar específicamente lesiones metastásicas pequeñas (< 1 cm) en el hígado. La detección precoz del número y la localización de las lesiones metastásicas es fundamental. También hay una necesidad de caracterizar y, específicamente, identificar el origen del tumor, sin interferencia de otras posibles lesiones (por ejemplo, quistes, lesiones benignas, tumores que no se pueden tratar).

30 El receptor del péptido intestinal vasoactivo (VIP) se sobreexpresa en las células del cáncer colorrectal, y por lo tanto puede servir como una diana para la detección de lesiones metastásicas. El documento US 600792 enseña un péptido radiomarcado que tiene como diana el VIP para la obtención de imágenes de cáncer colorrectal.

35 Una toxina termoestable de bajo peso molecular es producida por cepas de E. coli enterotóxica. Esta toxina, conocida como péptido ST, está implicada en la enfermedad diarreica aguda mediante la unión a su receptor en las células colorrectales y la estimulación de la guanilato ciclasa. En los documentos US 4545931 y US 4886663 se dan a conocer péptidos ST sintéticos que se unen al receptor de ST y que no median como enfermedad diarreica aguda. Estos péptidos producidos sintéticamente son adecuados para su administración a seres humanos con fines terapéuticos y de diagnóstico.

40 Los ligandos diana dirigidos a los receptores que se expresan de manera selectiva en las células tumorales de origen colorrectal son un medio para detectar específicamente la presencia de cánceres de origen colorrectal. Por consiguiente, el receptor de ST es un mecanismo de diana potencial. Las células de la mucosa gastrointestinal expresan específicamente el receptor de ST, y la expresión persiste después de que las células de la mucosa del colon y del recto sufren una transformación neoplásica maligna. No se han encontrado péptidos ST en ningún otro tejido extra-intestinal, por lo tanto se mantiene la especificidad de los ligandos por el tejido de origen gastrointestinal. Se han encontrado niveles de expresión similares en tejidos colorrectales humanos primarios y metastásicos con diferentes grados de diferenciación y localización. Un ligando específico para el receptor de ST sólo se unirá a la enfermedad metastásica, puesto que se podrá evitar el acceso a la parte apical de las células intestinales si se inyecta el compuesto por vía intravenosa.

45 El uso de péptidos ST radiomarcados para la obtención de imágenes y el diagnóstico de CCR ha sido previamente documentado. El documento US 5518888 reivindica agentes de radiodiagnóstico basados en péptidos ST. En una forma de realización de dicha invención, los péptidos pueden unirse a un agente para la obtención de imágenes radiactivo, tales como el yodo radiactivo, <sup>111</sup>In o <sup>99m</sup>Tc. El <sup>99m</sup>Tc es quelado por DTPA, que se convierte en un anhídrido y se hace reaccionar con un péptido ST. En el documento US 5518888 no se da a conocer ningún otro quelato. El radiomarcado produce de este modo los péptidos adecuados para uso en radioimagenología del cáncer colorrectal metastasizado. El documento US 6060037 da a conocer un procedimiento de radioimagenología de CCR metastásico utilizando tales péptidos ST radiomarcados. La detección de acumulación localizada o agregación de radiactividad después de la administración del péptido ST radiomarcado es indicativa de la presencia de células con receptores de ST. Los documentos WO 95/11694, WO 99/21587 y WO 99/39748 también dan a conocer péptidos

ST radiomarcados para la obtención de imágenes para diagnóstico. El documento WO 95/11694 describe composiciones que comprenden un péptido ST y un resto seleccionado de un agente terapéutico, un marcador adecuado para la detección *in vitro* y un marcador adecuado para la detección *in vivo*. Entre otros, el marcador para la detección *in vivo* puede ser un metal radiactivo quelado, que se conjuga al péptido ST después de la quelación. En el documento WO 99/21587 las clases preferidas de agentes complejantes de radiometales son las terpiridinas y las fenantrolinas. En el documento WO 99/39748, los agentes complejantes comprenden un anillo macrocíclico que contiene oligo-2,6-piridina que es un derivado de una terpiridina, cuaterpiridina, quinpiridina o sexipiridina. Los quelantes tetradentados son agentes complejantes de más preferencia que los enseñados por los documentos WO 99/21587 y WO 99/21587 (véase por ejemplo Baidoo and Lever Bioconj. Chem. 1990: 1: 132-137), pero se sabe que las condiciones de marcado para estos quelantes no son compatibles con el mantenimiento de los enlaces disulfuro, de los cuales tres están presentes en el péptido ST.

### **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra el efecto del pH 8,0, 8,5 y 9,0 en la reacción de marcado sobre la formación de especie 2 (CA-ST<sub>5-18</sub>).

La figura 2 muestra el efecto de la variación de la temperatura de la reacción de radiomarcado en la formación de especie 2 (CA-ST<sub>5-18</sub>). Las temperaturas evaluadas fueron 40 °C, 60 °C y 70 °C.

La figura 3 muestra el efecto de la masa de compuesto en la formación porcentual de especie 2 (CA-ST<sub>5-18</sub>), probada en 12,5 µg, 25 µg, 50 µg y 100 µg de compuesto.

La figura 4 muestra imágenes por SPECT (tomografía computerizada por emisión de fotón único) de ratones portadores de tumores T84 subcutáneos. Las imágenes son imágenes bidimensionales posteriores estáticas con colimador LEUHR obtenidas utilizando CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con <sup>99m</sup>Tc purificado por HPLC a razón de 20MBq por animal. Las relaciones tumor a hígado fueron: 1,1 a los 15 minutos, 2 a los 60 minutos y 4 a los 120 minutos. La calidad de las imágenes era comparable cuando se utilizaron preparaciones brutas.

La figura 5 muestra la retención relativa de CA1-ST<sub>5-18</sub> frente al control negativo, CA1-ST<sub>5-18</sub> (cys-ala).

La figura 6 muestra una comparación de la captación de CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con <sup>99m</sup>Tc purificado por HPLC y CA1-ST<sub>5-18</sub>(cys-ala) en ratones atómicos CD-1 portadores de tumores T84 subcutáneos. Imágenes bidimensionales posteriores estáticas con colimador LEUHR utilizando CA1-ST<sub>5-18</sub> purificado por HPLC a razón de 20MBq por animal.

La figura 7 muestra la biodistribución de CA1-ST<sub>5-18</sub> purificado a razón de 2MBq por animal en ratas y ratones atómicos RNU/rnu portadores de tumores T84 en el hígado. Los datos están expresados como la retención relativa (RR) y las relaciones de tumor a hígado y de tumor a músculo.

La figura 8 muestra una imagen de una rata atómica RNU/rnu portadora de tumores T84 en el hígado. Se trata de una imagen bidimensional posterior estática a los 120 minutos post-inyección (p.i.) usando CA1-ST<sub>5-18</sub> purificado por HPLC a razón de 20MBq con colimador LEUHR. La imagen es una imagen de todo el cuerpo con recuentos de fondo eliminados y riñones enmascarados. La relación tumor:hígado de la imagen era típicamente 2,5.

La figura 9 muestra una imagen de ratones atómicos RNU/rnu portadores de tumores T84 en el hígado en presencia y en ausencia de péptido en exceso. Las imágenes son imágenes bidimensionales posteriores estáticas a los 120 minutos p.i. de CA1-ST<sub>5-18</sub> purificado por HPLC a razón de 20MBq por animal con colimador LEUHR.

La figura 10 muestra la densidad de receptores (DR) de dos tumores de CCR de línea celular humana y cuatro tumores de CCR de xenoinjerto humano (nd = datos de densidad de receptores no detectados).

### **Descripción de la invención**

Los péptidos ST son péptidos cíclicos que contienen tres puentes disulfuro. Se ha encontrado que estos péptidos ST son inestables en las condiciones de pH básico requeridas para algunos radiomarcados de quelantes de <sup>99m</sup>Tc, que se traduce en la escisión de los puentes disulfuro y la pérdida inaceptable de potencia. Esta inestabilidad puede descartar un gran número de quelatos de <sup>99m</sup>Tc que requieren un pH de aproximadamente 8-9 para lograr un marcado eficiente. En consecuencia, los conjugados de péptido-quelato tendrían que ser marcados en condiciones ácidas para mantener una potencia alta. Sin embargo, tales quelatos necesitan protocolos de marcado complicados y pueden generar conjugados de <sup>99m</sup>Tc con poca eficacia, por ejemplo, con elevada captación hepatobiliar y rápido aclaramiento de la sangre. La presente invención proporciona procedimientos y reactivos para marcar conjugados de péptido-quelato en condiciones básicas, sin pérdida de potencia del péptido ST, para proporcionar agentes eficaces para la obtención de imágenes.

En la presente invención, el conjugado de péptido-quelato comprende un péptido que tiene afinidad por el receptor de ST conjugado con un agente quelante tetradentado, en el que el péptido que tiene afinidad por el receptor de ST comprende de 10 a 25 aminoácidos. "Un péptido que tiene afinidad por el receptor de ST" es un péptido

biológicamente activo, que tiene adecuadamente entre 10 y 25 aminoácidos, y de preferencia entre 13 y 19 aminoácidos, derivados de la secuencia del péptido ST, que se une al receptor de ST con alta afinidad. Los péptidos de la presente invención pueden ser de origen natural o sintético, pero de preferencia son sintéticos. Estos péptidos pueden conjugarse al quelato directamente o por medio de un "grupo conector". Los "grupos conectores" pueden comprender una secuencia peptídica de aproximadamente 5 a 9 aminoácidos, con o sin la inclusión de otros grupos tales como cadenas alifáticas de hasta 5 átomos de carbono de longitud. Los grupos conectores de preferencia son -poli-Lys, -poli-Glu, -(Gly)<sub>2</sub>-Glu-(Lys)<sub>3</sub>-, (Gly)<sub>2</sub>-Glu-Lys-Glu-Lys-, (Phe)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, (Lys)<sub>6</sub>-Gly-, -(Gly)<sub>3</sub>-(DGLu)<sub>3</sub>- y -(Gly)<sub>3</sub>-(ácido aminocaproico). Marcados con un radiometal adecuado, los péptidos ST de la invención son adecuados para su uso como agentes para la obtención de imágenes para detectar el cáncer de origen colorrectal. En la presente invención, los péptidos se seleccionan entre las secuencias ID. SEC. N° 1 a 7. Los péptidos que tienen afinidad por el receptor de ST especialmente preferidos son ID. SEC. N° 1 a 5, que se presentan en la lista de secuencias incluida.

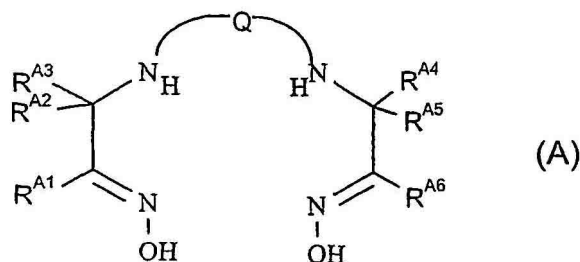
El control negativo utilizado en los experimentos de la presente invención es ID. SEC. N° 8, es decir, ID. SEC. N° 1 con todas las cisteínas sustituidas con alaninas y por tanto carece de los puentes disulfuro necesarios para la unión.

Tal como se utiliza en el presente documento, "agentes quelantes tetradentados" son quelatos que son adecuados para la formación de los conjugados de péptido-quelato según la presente invención, en los que el radiometal es coordinado por los cuatro átomos metálicos donantes del agente quelante tetradentado. Un ion de metal radiactivo adecuado es complejoado por un agente quelante tetradentado por medio de un conjunto donante que consta de cuatro donantes de metal que forman al menos un anillo quelato de 5 o 6 miembros con el radiometal. De preferencia, el agente quelante tetradentado forma 2 o más de tales anillos quelato de 5 o 6 miembros con el radiometal. Estos ligandos son particularmente adecuados para la formación de complejos de tecnecio (<sup>99m</sup>Tc), pero también pueden ser utilizados para otros radiometales.

El agente quelante tetradentado está presente en el conjugado con el fin de producir una forma radiomarcada del péptido, adecuada para el diagnóstico por imagen. Se puede incorporar un ión metálico radiactivo adecuado en el conjugado de péptido-quelato por medio de la formación de complejos con el agente quelante tetradentado. Una característica importante de la presente invención es que la potencia del péptido ST no se vea comprometida por el proceso de radiomarcado.

Los agentes quelantes tetradentados adecuados según la presente invención son las diaminodioximas y ligandos N<sub>3</sub>S, tales como:

(i) diaminodioximas de fórmula A:



en la que R<sup>A1</sup> a R<sup>A6</sup> son cada uno independientemente un grupo R;

en la que R es H o alquilo C<sub>1-10</sub>, alquilarilo, alcoxialquilo, hidroxialquilo, fluoroalquilo, aminoalquilo o carboxialquilo;

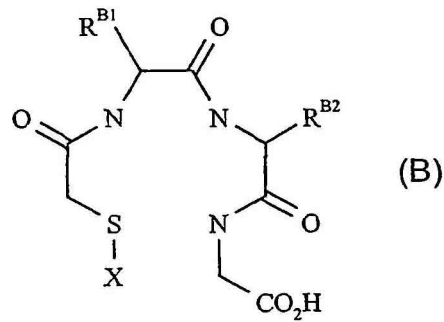
y Q es un grupo puente de fórmula -(W)<sub>n</sub>;

en la que n es 3, 4 o 5 y cada W es independientemente -O-, -NR- o -CR<sub>2</sub>- con la condición de que (W)<sub>n</sub> contenga un máximo de un grupo W, que es -O- o -NR-.

Las diaminodioximas de preferencia tienen R<sup>A1</sup> a R<sup>A6</sup> = alquilo C<sub>1-3</sub>, alquilarilo, alcoxialquilo, hidroxialquilo, fluoroalquilo o aminoalquilo.

Las diaminodioximas de más preferencia tienen R<sup>A1</sup> a R<sup>A6</sup> = CH<sub>3</sub>; y

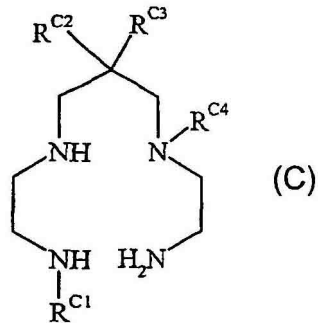
(ii) ligandos N<sub>3</sub>S de fórmula B:



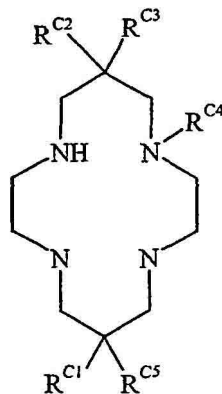
en la que X es un grupo protector tiol tal como benzoílo, acetilo o etoxietilo, que se escinde antes o durante el proceso de marcado, y;

5  $R^{B1}$  y  $R^{B2}$  pueden ser H o la cadena lateral de cualquier aminoácido. Otros agentes quelantes, que no están contemplados en la presente invención, son:

(iii) ligandos  $N_4$  de fórmula C:

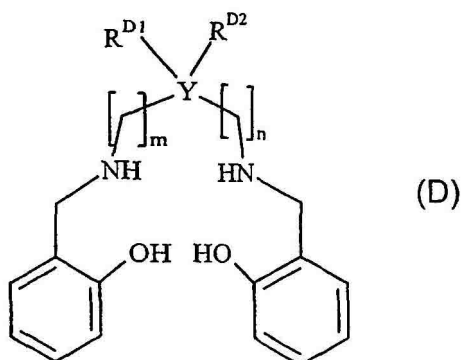


10 en la que  $R^{C1}$  a  $R^{C4}$  pueden ser H, alquilo, arilo o sus combinaciones y en la que uno de  $R^{C1}$  a  $R^{C4}$  debe ser un grupo funcional tal como alquilamina, sulfuro de alquilo, alcoxi, carboxilato de alquilo, alquilarilamina o sulfuro de arilo. Los ligandos de este tipo incluyen los que tienen enlaces amida C=O. También se incluyen versiones macrocíclicas de la fórmula C, tales como:



en la que  $R^{C5}$  es como se definió para  $R^{C1}$  a  $R^{C4}$ , anteriormente.

(iv) Diaminadifenoles de fórmula D:

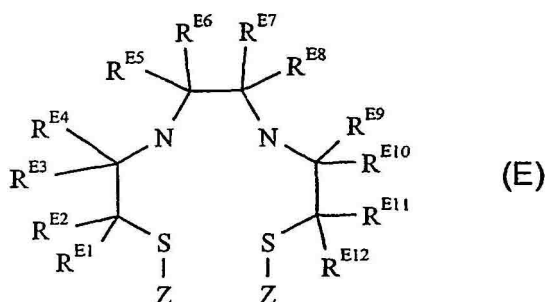


en la que Y es C o N;

$R^{D1}$  y  $R^{D2}$  pueden ser H, alquilo o arilo y en la que uno de  $R^{D1}$  y  $R^{D2}$  debe ser un grupo funcional tal como alquilamina, sulfuro de alquilo, alcoxi, carboxilato de alquilo, alquilarilamina o sulfuro de arilo, y;

5  $m = n = 1$  o  $2$ .

(v) Ligandos  $N_2S_2$  de fórmula E:



en la que Z es un grupo protector tiol, tal como benzoílo, acetilo o etoxietilo, que se escinde antes o durante el proceso de marcado, y;

10  $R^{E1}$  a  $R^{E12}$  pueden ser cada uno elegido entre H, un grupo arilo o un grupo alquilo y en la que uno de  $R^{E1}$  a  $R^{E12}$  debe ser un grupo funcional tal como alquilamina, sulfuro de alquilo, alcoxi, carboxilato de alquilo, alquilarilamina o sulfuro de arilo, y;

uno o más de los pares  $R^{E3}/R^{E4}$ ,  $R^{E5}/R^{E6}$ ,  $R^{E7}/R^{E8}$ ,  $R^{E9}/R^{E10}$  pueden representar un enlace C=O.

15 Un agente quelante de preferencia de la presente invención es una diaminadioxima de fórmula A, en la que  $R^{A1}$  a  $R^{A6}$  son todos  $CH_3$ , y Q es  $-(CH_2)_2NR(CH_2)_2-$ , en el que R es un grupo R como se definió para la Fórmula (A). El agente quelante de más preferencia es aquel en el que R de  $-(CH_2)_2NR(CH_2)_2-$  es aminoalquilo, especialmente  $R = -(CH_2)_2NH$ . Se hace referencia a este último en el resto del presente documento como "agente quelante 1" (CA1). Otro agente quelante de preferencia es un ligando  $N_3S$  de fórmula B en el que  $R^{B1}$  y  $R^{B2}$  son ambos H y X es acetilo. Este se conoce como "agente quelante 2" (CA2) durante el resto del documento. El "agente quelante 3" (CA3) es un  
20 ligando  $N_3S$  de fórmula B en el que  $R^{B1}$  es  $CH_2CH_2CH_2C=O$ ,  $R^{B2}$  es H y X es etoxietilo.

Los péptidos sintéticos según la presente invención se pueden sintetizar por medio de procedimientos en fase  
sólida, como es bien conocido en la técnica. Una síntesis de  $ST_{5-18}$  representativa se da en el ejemplo 2. Los  
conjugados de péptido-quelato según la presente invención se pueden preparar usando quelantes bifuncionales, es  
decir, compuestos en los que el quelante tetradentado porta un grupo funcional pendiente. Los grupos funcionales  
25 preferidos son los grupos funcionales amino o carboxilo, que permiten el acoplamiento fácil a través de enlaces  
amida a los grupos amina o carboxilo en los péptidos de interés, en especial al extremo amino o carboxilo terminal  
del péptido.

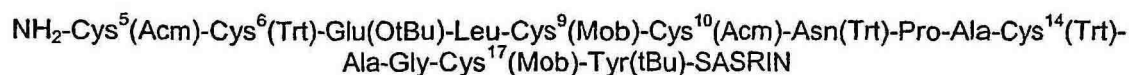
Los quelantes bifuncionales  $N_3S$  se pueden preparar por el método de Sudhaker y col. [Bioconjugate Chem., Vol.  
9,108-117 (1998)]. La síntesis de quelantes bifuncionales diaminadioxima se describe en el Ejemplo 3. Los  
30 compuestos de diaminadifenol se pueden preparar por el método de Pillai y col. [Nucl. Med. Biol., Vol. 20, 211-216  
(1993)]. Los compuestos de bisamidaditiol se pueden preparar por el método de Kung y col. [Tetr. Lett., Vol. 30,  
4069-4072 (1989)]. Los compuestos de monoamidamonoaminabistiol se pueden preparar por el método de Hansen y  
col [Inorg. Chem., Vol. 38, 5351-5358 (1999)]. Las tetraaminas funcionales se pueden preparar por el método de

Simon y col. [J. Am. Chem. Soc., Vol. 102, 7247 (1980)]. Se pueden resumir los procesos críticos de la síntesis del conjugado CA1-ST<sub>5-18</sub> como se muestra en el esquema 1 en la página siguiente.

5 La conjugación del péptido al quelato se lleva a cabo antes de la reacción de marcado. El procedimiento directo de conjugación se da como ejemplo en el compuesto CA1-ST<sub>5-18</sub> (o CA1-ID. SEC. N° 1). La conjugación a través de una molécula conectora se da como ejemplo en el compuesto Ca1-(Gly)<sub>3</sub>-(D-Glu)<sub>3</sub>-ST<sub>5-18</sub> (o CA1-ID. SEC. N° 5). Las conjugaciones se pueden llevar a cabo ya sea a través del extremo N-terminal o del extremo C-terminal de la molécula del péptido. Refiérase a la Tabla I para conocer estas estructuras y las estructuras de otros compuestos adecuados de uso en la presente invención.

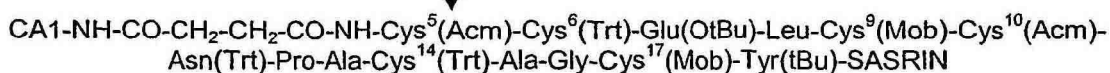
10 Los compuestos según la presente invención tienen pureza radioquímica (PRQ) alta y reproducible, farmacocinética ventajosa, tal como una absorción gastrointestinal reducida, y eficacia para la obtención de imágenes en los animales con tumores. Los compuestos ofrecen una ventaja bien definida sobre los compuestos dirigidos al CCR dados a conocer previamente, ya que tienen mejor farmacocinética y retención específica en el tejido tumoral en comparación con los tejidos de fondo.

**Esquema 1. Montaje de péptidos utilizando un sintetizador automático de péptidos**

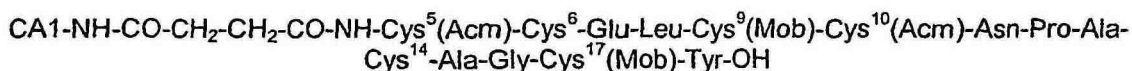


**Acoplamiento manual de anhídrido succínico y CA1**

**1) anhídrido succínico  
2) CA1; PyAOP/HOAt/NMM**

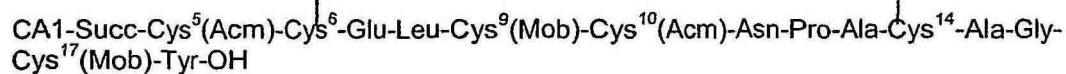


**Escisión del péptido parcialmente protegido de la fase sólida** | **TIS al 5 % en TFA; 30 minutos**



**Oxidación del Cys6-Cys14**  
**Purificación - disulfuro**

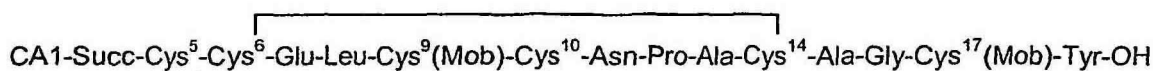
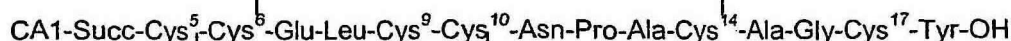
**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> acuoso, pH 8, 16 horas; TA**



**Oxidación del Cys5-Cys10**

**I2; DMSO:AcOH (1:1); TA; 30 minutos**

15

**Purificación - disulfuro****Oxidación del Cys9-Cys17****TFA/DMSO (90:10); TA; 15 minutos****Purificación - disulfuro****Purificación final e intercambio de sales****Abreviaturas**

Acm = acetamidometilo

HOAt =

Trt = tritilo

NMM = N-metilmorfolina

5 Mob = 4-metoxibencilo

TIS = triisopropilsilano

TA = temperatura ambiente

DMSO = dimetilsulfóxido

TFA = ácido trifluoroacético

AcOH = ácido acético

PyAOP = [7-azabenzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio-hexafluorofosfato]

SASRIN = resina supersensible al ácido

10 La presente invención da como resultado un complejo metálico que comprende un radiometal complejoado al agente quelante tetradentado del conjugado de péptido-quelato. Los agentes quelantes de preferencia para el complejo metálico se eligen de diaminadioximas de fórmula A, en la que R<sup>A1</sup>-R<sup>A6</sup> son todos CH<sub>3</sub> y Q es -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NR(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-. Una diaminadioxima de fórmula A especialmente de preferencia es CA1, como se definió anteriormente. Otros agentes quelantes preferidos para el complejo metálico son los ligandos N<sub>3</sub>S CA2 y CA3, definidos anteriormente. Se puede elegir un radiometal adecuado de emisores de positrones tales como <sup>64</sup>Cu y <sup>65</sup>Cu, o de emisores gamma tales como <sup>99m</sup>Tc. Una forma de realización de preferencia de la invención da como resultado un conjugado de péptido-quelato radiomarcado con <sup>99m</sup>Tc. Para el conjugado de péptido-quelato radiomarcado con <sup>99m</sup>Tc, la reacción radiomarcado se lleva a cabo de preferencia a pH básico según la presente invención.

20 Radiomarcado, como se define en la presente invención, es la unión química de un radiometal, tal como los descritos anteriormente. Los compuestos radiomarcados adecuados de la invención tienen afinidad por el receptor de ST para permitir la obtención de imágenes de diagnóstico de cánceres de origen colorrectal. Los compuestos radiomarcados de preferencia son los que se marcan de manera limpia, con la mínima producción de subproductos. Un ejemplo de uno de tales subproductos es el tecnecio hidrolizado reducido (THR) en el caso del marcado con <sup>99m</sup>Tc. En una forma de realización de preferencia de la invención, el conjugado de péptido-quelato se marca con <sup>99m</sup>Tc manteniendo altos niveles de PRQ y bajos niveles de THR. Los resultados de varios estudios descritos en los ejemplos muestran que los compuestos de preferencia de la presente invención son estables en las condiciones de marcado y mantienen su eficacia biológica tras el radiomarcado.

30 Los niveles THR son de particular importancia en el caso de los conjugados marcados con <sup>99m</sup>Tc de la presente invención, ya que una de las principales dianas biológicas está en el hígado. El THR se localiza en el hígado y por lo tanto, si se les permite permanecer, aumentará la actividad de fondo del tejido, disminuirá la relación diana a fondo y dará lugar a una disminución global de la calidad de las imágenes. La cantidad de THR es relativamente baja para todas las preparaciones (Ejemplo 10). Hay poca diferencia entre las características de marcado de Ca1-ST<sub>5-18</sub> a niveles de conjugado de 12,5-100 µg, en términos de la tasa de formación de las especies 2. Sin embargo, se produjo un incremento en THR a niveles reducidos de conjugado (Ejemplo 10). En comparación con la preparación no filtrada, no purificada por HPLC, tanto el filtrado como la adición de difosfonato de metileno (MDP, que se sabe que reduce los niveles de THR) tuvieron un efecto similar en la reducción de la captación hepática (Ejemplo 24). Ningún procedimiento redujo los recuentos de fondo del tejido al nivel observado con las preparaciones purificadas



por HPLC, pero aún es posible obtener imágenes de alta calidad de metástasis hepáticas con preparaciones no purificadas por HPLC.

El radiomarcado del conjugado de péptido-quelato se lleva a cabo en presencia de una sal estañosa como agente reductor, por ejemplo en un sistema tampón adecuado, tal como carbonato, borato, clorhidrato de trietanolamina-NaOH, dimetil leucil glicina, tris(hidroximetil) aminometano, 2-amino-2-metil-1:3propanodiol-HCl, dietanolamina-HCl, soluciones de Clark y Lubs (Bower and Bates, J. Res. Natn. Bur. Stand. 55, 191 (1957)), glicina, glicilglicina o TAPSC®. La reacción de marcado se lleva a cabo de preferencia a un pH básico, es decir, entre pH 8,0 y pH 10, de más preferencia a un pH de alrededor de 8,5. Los ejemplos 5 y 6 describen la realización de la reacción de radiomarcado utilizando tampón de borato o hidróxido de sodio a fin de mantener un pH adecuado. Un procedimiento de preferencia de la presente invención es el uso de un sistema tampón de borato en la reacción de radiomarcado.

Los experimentos de unión competitiva llevados a cabo (como se describe en el ejemplo 15) investigaron la potencia relativa de diversos compuestos de péptido ST. Los valores de  $K_i$  del orden de nM sugieren una buena unión del ligando de competencia. Estos datos muestran en primer lugar que las variaciones fuera del farmacóforo en el péptido ST producen poca diferencia en la unión ( $ST_{1-17}$  frente a  $ST_{5-18}$ ,  $K_i$  0,6 y 0,4 nM, respectivamente). La presencia de CA3 en los péptidos ST da como resultado un pequeño aumento en la  $K_i$ , es decir, una pequeña disminución resultante en la unión. La presencia de CA1 tiene un mayor efecto sobre la unión para reducir aún más el valor de  $K_i$  hasta 2,8 nM, una reducción de casi diez veces en la eficacia de unión. La afinidad de unión del orden de los nanomoles se considera aceptablemente alta y las diferencias resultantes en la reducción de la unión no se observan in vivo. El control negativo no demostró unión (hasta 500  $\mu$ M).

Los compuestos de preferencia de la presente invención demostraron valores de  $K_i$  inferiores a 100 nM, lo que indica una alta afinidad por el receptor (véase Ejemplo 17). De todos los compuestos probados, CA1- $ST_{5-18}$ , CA3- $ST_{5-18}$  y CA1-gly<sub>3</sub>-Dglu<sub>3</sub>-ST mostraron la mayor potencia en este ensayo, con valores de  $K_i$  de 2,8 nM, 0,8 nM y 1,0 nM, respectivamente. La eficacia in vivo de estos compuestos seleccionados se discute a continuación. Los datos obtenidos en el ejemplo 15, y la alta unión ( $K_i$ ) del péptido de simulación de marcado (péptido sometido al protocolo de radiomarcado en ausencia del radiometal), soporta el hecho de que el material radiomarcado sigue teniendo actividad biológica.

La invención abarca también la preparación de preparaciones de radiofarmacéuticas. Por la expresión "preparación de radiofarmacéuticas" se entiende una composición que comprende el complejo radiometálico de la invención en una forma adecuada para la administración a seres humanos. Para la administración a seres humanos, una preparación de radiofarmacéutica debe ser estéril. De preferencia está en una forma inyectable, por ejemplo, para  $^{99m}\text{Tc}$ , la reconstitución del conjugado de péptido-quelato con pertecnetato en disolución salina estéril.

La preparación de radiofarmacéutica de la presente invención también se puede proporcionar en una forma de monodosis lista para la inyección a un ser humano y podría, por ejemplo suministrarse en una jeringa precargada estéril. La jeringa que contiene la monodosis también se suministrará dentro de un escudo de jeringa (para proteger al operador de una posible dosis radiactiva).

Las preparaciones de radiofarmacéuticas de la presente invención son útiles para la obtención de imágenes del cáncer de origen colorrectal. La obtención de imágenes utilizando dicho radiofármaco puede llevarse a cabo por medio de imágenes de tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computerizada de emisión de fotón único (SPECT), dependiendo de la naturaleza del radiometal.

La presente invención proporciona kits para la producción de estos radiofármacos. Los kits adecuados están diseñados para ofrecer los radiofármacos estériles adecuados para la administración a seres humanos, por ejemplo, a través de la inyección en el torrente sanguíneo. Cuando el radiometal es  $^{99m}\text{Tc}$ , el kit comprende un vial que contiene el conjugado de péptido-quelato para el metal junto con un agente reductor farmacéuticamente aceptable. El agente reductor farmacéuticamente aceptable es una sal estañosa, tal como cloruro estañoso o tartrato estañoso. El kit puede comprender un complejo metálico que, tras la adición del radiometal, sufre transmetalación (es decir, intercambio de ligandos) dando el producto deseado. Para  $^{99m}\text{Tc}$ , el kit está de preferencia liofilizado y está diseñado para ser reconstituido con pertecnetato de  $^{99m}\text{Tc}$  ( $\text{TcO}_4^-$ ) estéril a partir de un generador de radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$  para dar una disolución de radiofármaco adecuada para la administración a seres humanos sin otra manipulación.

El conjugado de péptido-quelato está de preferencia presente en el kit en una forma susceptible de ser transportado y almacenado durante periodos de tiempo relativamente amplios. La reconstitución con eluido de un generador de  $^{99m}\text{Tc}$  en las condiciones preferidas de radiomarcado da como resultado un péptido marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  con especificidad por el receptor de ST. Es una característica importante de la presente invención que, en tal kit, la reacción de radiomarcado no altera la afinidad del péptido por el receptor de ST. Se ha demostrado que los péptidos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  de la presente invención son estables durante un máximo de 4 horas a temperatura ambiente y en presencia de niveles de actividad de hasta 1 GBq.

Los kits o jeringas precargadas anteriores opcionalmente pueden contener ingredientes adicionales tales como tampones; solubilizantes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, ciclodextrinas o tensioactivos tales como

Pluronic™, Tween™ o fosfolípidos); estabilizantes farmacéuticamente aceptables, radioprotectores o antioxidantes (tales como ácido ascórbico, ácido gentísico o ácido para-aminobenzoico) o agentes de carga para liofilización (tales como cloruro de sodio o manitol).

5 Es una característica de la invención que los complejos metálicos han mantenido la potencia para el receptor de ST, así como una farmacocinética adecuada. Los datos obtenidos en el ejemplo 16 indican que control positivo,  $^{125}\text{I}$ -ST<sub>1-17</sub> tiene la mayor unión del 20 % del material radiactivo añadido. El control negativo, CA3-ST<sub>5-18</sub> (Cys-Ala), no mostró ninguna unión específica (unión a nivel NSB, <1 %). CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  mostró unión disminuida (6 % del total añadido) en comparación con el control positivo, pero todavía es significativamente mayor que la del control negativo. Los compuestos resultantes de la presente invención también tienen un aclaramiento de la sangre óptimo, rápido aclaramiento hepático y rápido aclaramiento del tejido de fondo. El aclaramiento hepático es una característica particularmente importante de la presente invención debido a la alta incidencia de metástasis del CCR en ese órgano. Además, se ha demostrado que los compuestos de la presente invención permiten obtener imágenes de metástasis de cáncer colorrectal que tienen un diámetro inferior a 1 cm. Esta es una característica que permite, además, la distinción que debe establecerse entre metástasis focales y difusas. Anteriormente no ha sido posible conseguir estas características en un agente dirigido al receptor de ST. Este es, por consiguiente, un desarrollo sorprendente sobre la técnica anterior.

20 Los complejos metálicos resultantes de la presente invención se eliminan rápidamente por la orina (>90 % en 60 minutos p.i.). Una característica adicional de la presente invención es la baja captación gastrointestinal, que reduce el riesgo de efectos secundarios no deseados. La baja absorción en los tejidos de fondo tales como el hígado, que puede interferir con la calidad de las imágenes, es una ventaja de los complejos metálicos de la presente invención. Para CA1-ST<sub>5-18</sub> la captación hepática fue del 0,93 % de la dosis inyectada por gramo a las 2 horas p.i. (ejemplo 17). CA1-ST<sub>5-18</sub> muestra la mayor relación tumor a tejido de fondo, la mayor captación (%ID/g) y retención relativa de todos los compuestos evaluados. Esto muestra que de todos los compuestos examinados, CA1-ST<sub>5-18</sub> mostró la mejor calidad farmacocinética para un agente para la obtención de imágenes de CCR (ejemplo 17).

25 El modo preferido de formación de imágenes es la SPECT. Se ha demostrado que es posible obtener imágenes de tumores de entre 0,5 y 1 cm de diámetro por SPECT utilizando el modelo subcutáneo (descrito en el ejemplo 17). Las imágenes obtenidas en el ejemplo 18 muestran que es posible la obtención de imágenes a partir de los 15 minutos p.i., y a los 120 minutos p.i. sólo el tumor y los riñones son visibles. El tamaño del tumor del que se obtuvieron las imágenes era de la región esperada en la población diana. Las imágenes han sido adquiridas en un modo bidimensional, con una dosis radiactiva relativamente baja, de 20 MBq/animal. Se sabe que la resolución espacial entre los órganos es mejor en los seres humanos de modo que se espera que las imágenes obtenidas sean al menos tan buenas como las obtenidas en los modelos animales.

35 Como se muestra en los ejemplos 18, 19, 21 y 23, los compuestos de preferencia resultantes de la invención presentan propiedades de visualización de imágenes superiores que no se han informado anteriormente en la técnica. La captación tumoral específica in vivo ha sido demostrada en dos modelos animales diferentes. Estos modelos se describen en los ejemplos 17 y 20. La obtención de imágenes tanto de tumores subcutáneos como de metástasis hepáticas se logró a <2 horas p.i. en ratones. Fue posible obtener imágenes en ratones a partir de los 15 minutos p.i. Esto apoyará la ventana ideal de obtención de imágenes clínicas en los seres humanos de entre 1 y 6 horas p.i.

40 Las imágenes producidas en el ejemplo 18 (figura 4) han mostrado de manera constante una clara identificación de los tumores de a partir de los 15 minutos p.i. con buenas relaciones de tumor a músculo (no se muestran) y de tumor a hígado, que mejoran con el tiempo de modo que para los 120 minutos p.i. sólo el tumor y los riñones son visibles. Los datos obtenidos en el ejemplo 19 demuestran buena captación de CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y mala captación para el control negativo (figura 5). Las imágenes bidimensionales posteriores estáticas de los mismos animales adquiridas en los 120 minutos p.i. mostraron un patrón similar; buena imagen de CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y la mala imagen del control negativo (figura 6). En la imagen producida en el ejemplo 21 (figura 8), las metástasis son claramente visibles, con una relación tumor:hígado de 1,5-3,0 en base al análisis de la región de interés (ROI). Las imágenes fueron adquiridas de manera coherente y sin manipulación importante, con ambas formulaciones: la preparación purificada por HPLC y la preparación bruta.

50 Los experimentos de obtención de imágenes como se describen en el ejemplo 21 demuestran la retención específica de CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en tumores de CCR. Estos datos apoyan la especificidad del CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  por los receptores de ST, y ponen de relieve la importancia de la estructura conformacional de los péptidos ST. Cuando se inyectaron ratones portadores de tumores subcutáneos de carcinoma pulmonar de Lewis con CA1-ST<sub>5-18</sub>, como se describe en el ejemplo 22, se demostró una captación significativamente mayor de CA1-ST<sub>5-18</sub> en los tumores colorrectales que en los de origen no colónico.

55 Estudios de la literatura indican poca variación en la expresión del receptor entre muestras de tumores, y los datos informados (80-120 fmol/mg de proteína) compararon bien con la expresión promedio encontrada en este estudio. No obstante, se ha visto una gran diferencia en la expresión del receptor entre los dos donantes humanos (ejemplo 25).

En los estudios de biodistribución en una variedad de xenoinjertos de tumores con diferente expresión del receptor de ST, la más alta expresión se mostró en las células T84, pero fue similar a la expresión en tumores humanos (ejemplo 25). Se analizó la expresión relativa en una serie de diferentes líneas celulares y se encontró que estaba en el siguiente orden: T84 > CaCO2 > LS180 > HT29 > SW480. Los datos muestran una retención comparativamente más elevada de CA1-ST<sub>5-18</sub> en los tumores con elevada expresión de receptores de ST, CaCO2 y T84, en comparación con el resto. Se obtuvieron imágenes de tumores que expresan menor densidad de receptores que la encontrada en los tumores humanos (LS180), como resultado el CA1-ST<sub>5-18</sub> será capaz de detectar una amplia variedad de tumores humanos.

Los valores esperados de los estudios previos sugieren una pequeña pérdida en la expresión, ya sea con el origen del tumor o con la disminución en el grado. Por lo tanto, es poco probable una población de pacientes con metástasis con baja expresión de receptores de ST. Más importante aún, la expresión de los receptores en tumores de CCR humanos se encuentra directamente entre la de dos tumores CCR de los que pueden obtenerse imágenes, lo que sugiere que la expresión del receptor en tumores humanos es suficiente para obtener imágenes con CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con <sup>99m</sup>Tc. Se observó baja retención en los tumores con el control negativo, CA3-ST<sub>5-18</sub> (cys-ala). Los datos también muestran que a pesar de la muy baja densidad de receptores todavía hay retención específica del CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con <sup>99m</sup>Tc en esos tumores. La captación tumoral en los tumores de células T84 y LS 180, que se hicieron crecer por vía subcutánea o en el hígado de los animales inmunodeficientes, es suficiente para obtener imágenes, como se demuestra tanto en el modelo subcutáneo como en el de metástasis hepáticas. De este modo, se ha demostrado que es posible obtener imágenes de tumores pequeños en la región de niveles de expresión del receptor de ST que se encuentra en los tumores humanos.

Los compuestos resultantes de la presente invención satisfacen todos los requisitos principales identificados para un mejor agente de obtención de imágenes del CCR, en particular la obtención con éxito de imágenes de tumores en un modelo animal que se cree que representa los aspectos más difíciles de la enfermedad clínica. Se ha demostrado eficacia excepcional en el modelo de eficacia crítico de metástasis hepáticas. Las formas de realización de preferencia permiten obtener imágenes de tumores que representan el intervalo de densidades de receptores que se encuentran en las metástasis hepáticas humanas del CCR. La eficacia se mantiene en presencia de péptido en exceso, a los niveles esperados en una formulación clínica potencial. Los estudios de imágenes han demostrado que es probable que los compuestos preferidos tengan mayor sensibilidad y especificidad que la TC de rayos X. Los compuestos resultantes de la presente invención podrían utilizarse en el diagnóstico inicial de la enfermedad, y lo que más importante aún, en la estadificación o determinación apropiada de la extensión de la enfermedad, en la medición de la respuesta al tratamiento y en el seguimiento de los pacientes tratados por CCR primario.

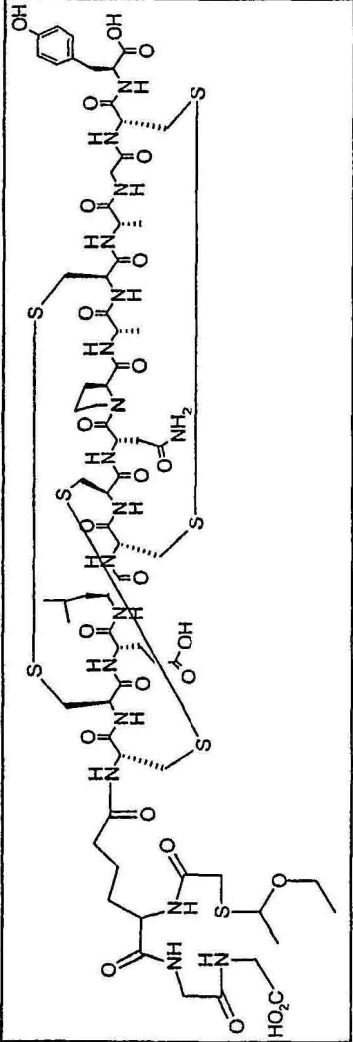
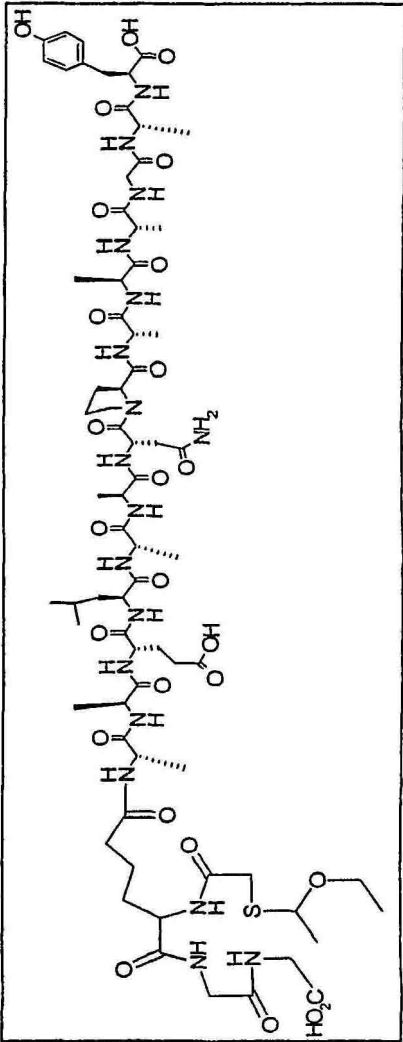
Los compuestos resultantes de la presente invención son por lo tanto superiores a cualquier otro compuesto para la obtención de imágenes de CCR informado. Son retenidos especialmente en los tumores de origen CCR. El potencial de obtención de imágenes se demostró en un marco de tiempo clínicamente aceptable en un tamaño de tumor diana deseado. Se ha demostrado una sorprendente captación, retención, farmacocinética y eficacia en vista de la inestabilidad informada del vector a pH básico.

## Ejemplos

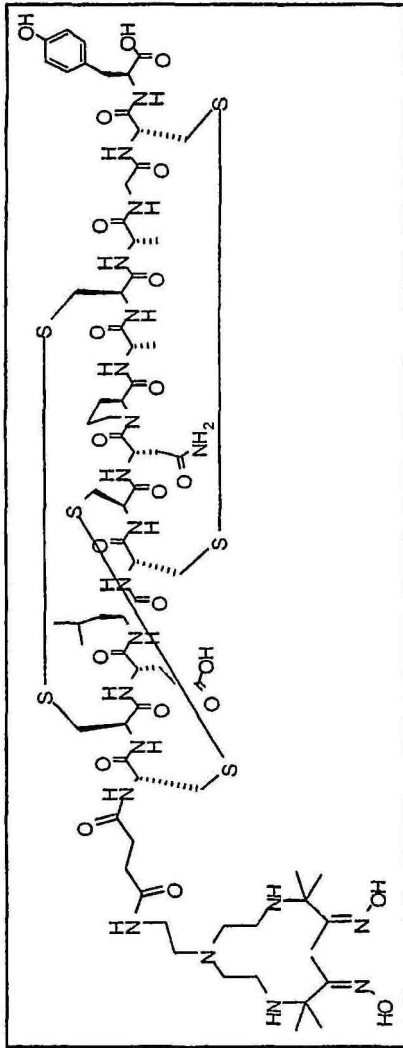
### Ejemplo 1. Conjugados de péptido-quelato

Los compuestos utilizados se dan en la Tabla I. Los conjugados se prepararon como se describe en el ejemplo 2 como alícuotas de 100 µg en viales de plástico y se almacenaron a -18 °C. Antes de su uso, se dejó calentar los conjugados hasta temperatura ambiente.

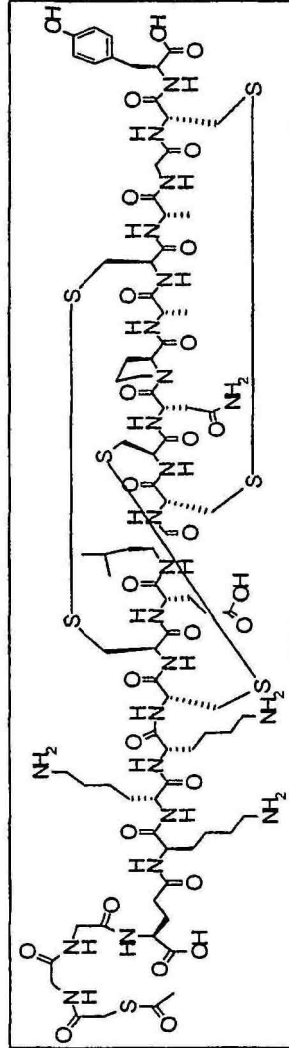
Tabla I: Compuestos de la invención

<p>CA3-ST<sub>5-18</sub></p> 	<p>CA3-ST<sub>5-18</sub> (cys-ala)</p> 
<p>CA1-ST<sub>5-18</sub></p>	<p>CA1-ST<sub>5-18</sub></p>

(continuación)

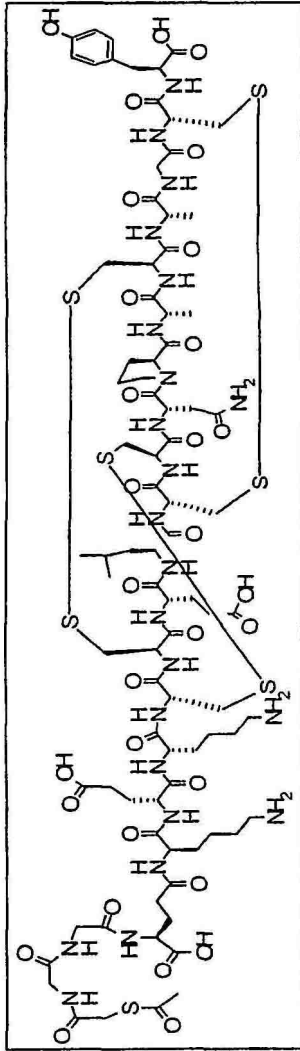


$CA_2-(Gly)_2-Glu-(Lys)_3-ST_{5-18}$

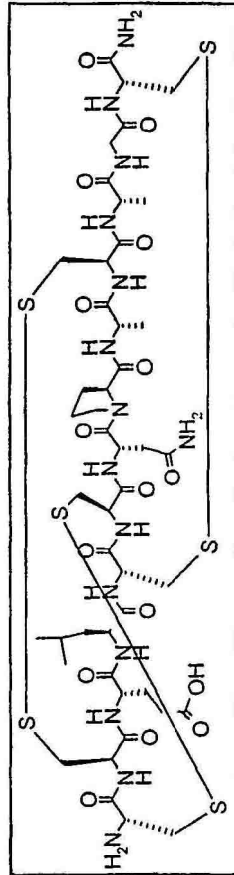


$CA_2-(Gly)_2-Glu-Lys-Glu-Lys-ST_{5-18}$

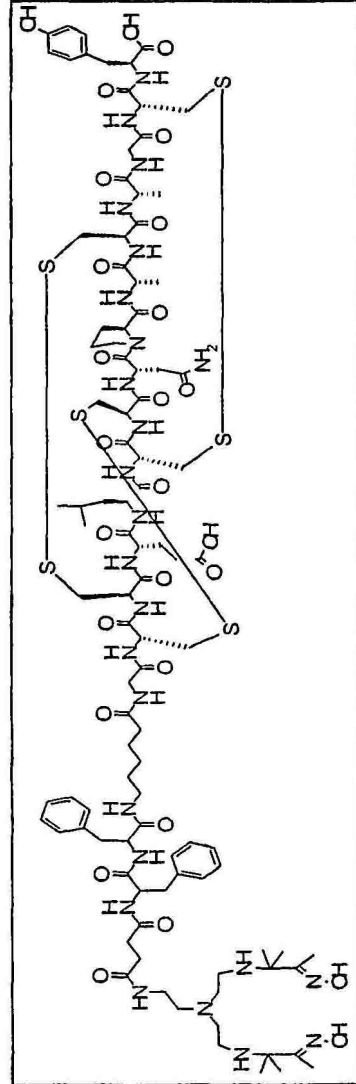
(continuación)



ST<sub>5-17</sub> C terminus amide

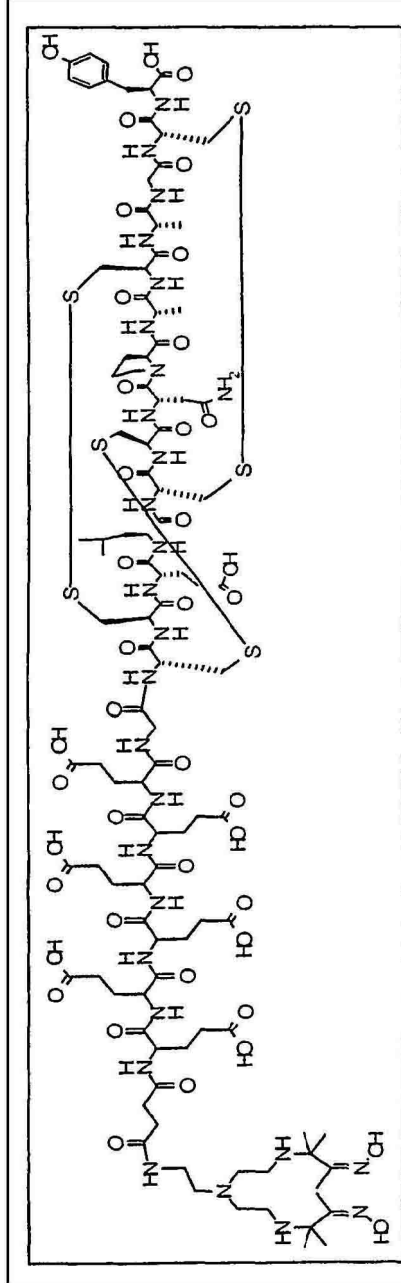


CA2-(Phe)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-ST<sub>5-18</sub>

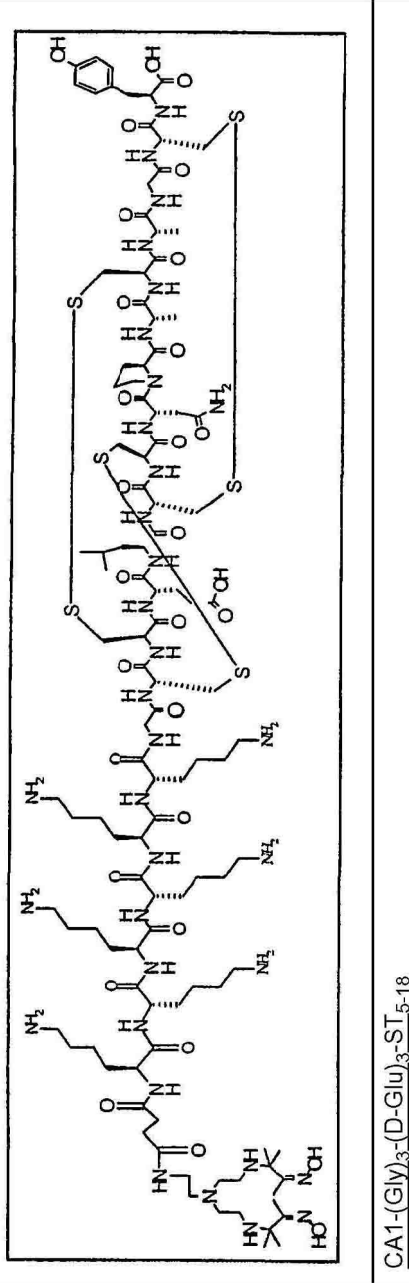


CA1-(Glu)<sub>6</sub>-ST<sub>5-18</sub>

(continuación)

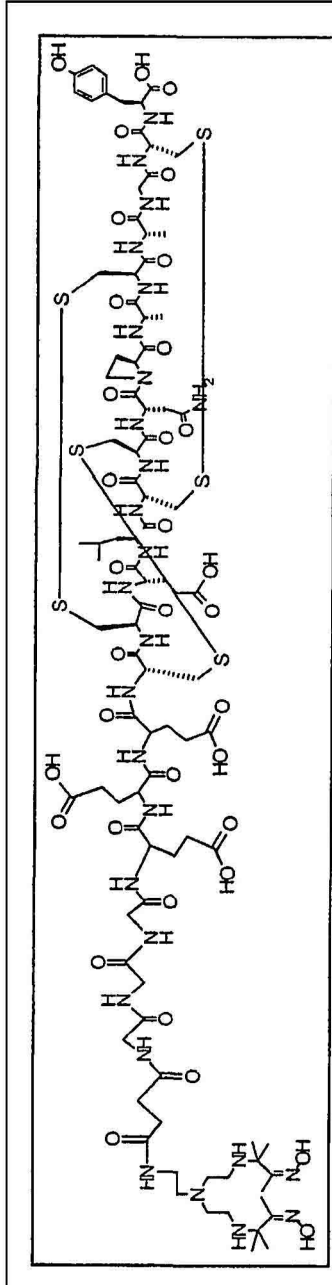


CA1-(Lys)<sub>3</sub>-(D-Glu)<sub>3</sub>-ST<sub>5-18</sub>

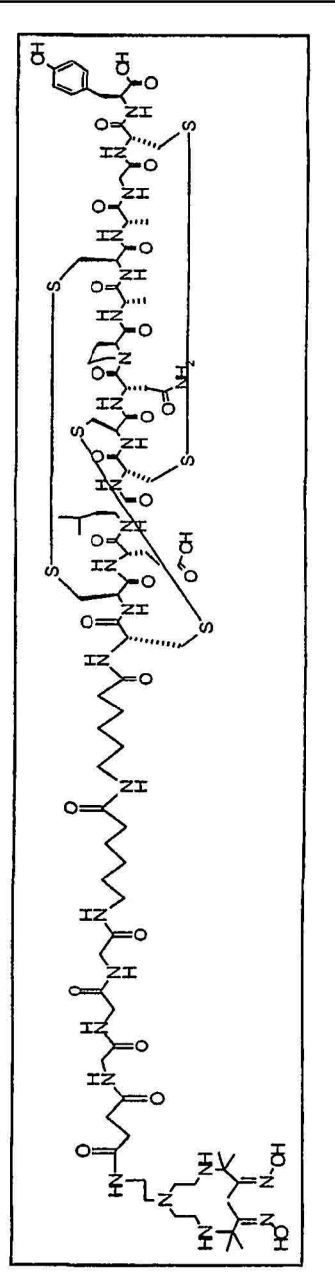


CA1-(Gly)<sub>3</sub>-(D-Glu)<sub>3</sub>-ST<sub>5-18</sub>

(continuación)



CA1-(Gly)<sub>3</sub>-(ácido aminocaproico)<sub>2</sub>-ST<sub>5-18</sub>





**Ejemplo 2. Síntesis de CA1-ST<sub>5-18</sub>***2.1: Síntesis en fase sólida*

El montaje en fase sólida de la secuencia peptídica se realizó sobre el soporte Fmoc-Tyr(tBu)-SASRIN (10 g de polímero; carga 0,6 mmol/g) utilizando un sintetizador automático de péptidos Advanced Chemtech 90. Los aminoácidos fueron todos de la configuración L con la función  $\alpha$ -amino bloqueada con el grupo protector 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

Los grupos funcionales reactivos de la cadena lateral portaban los siguientes grupos protectores:

tritol (Trt) - para las cisteínas 6 y 14 y asparagina,

acetamidometilo (Acm) – para las cisteínas 5 y 10,

10 4-metoxibencilo (Mob) – para las cisteínas 9 y 17,

éster terc-butílico – para el ácido glutámico

éter terc-butílico - para la tirosina

*2.2: Reacciones de acoplamiento y desprotección*

15 Se llevaron a cabo dobles ciclos de acoplamiento utilizando un exceso de 5 veces de derivados de aminoácidos activados con Fmoc disueltos en N-metilpirrolidona (NMP). El primer acoplamiento se llevó a cabo mediante la activación de aminoácidos con Fmoc con DIC/HOBt, y el segundo acoplamiento con la activación de aminoácidos con Fmoc con HBTU/HOBt/DIEA.

20 Se eliminaron los reactivos en exceso del polímero por medio del lavado, tres veces con NMP, tres veces con metanol y tres veces con NMP antes de la eliminación del grupo Fmoc en piperidina al 20 %/NMP (se realizaron ciclos de 5 minutos y 20 minutos). Una vez montada, se lavó la resina del péptido tres veces con NMP, tres veces con DCM y tres veces con metanol antes de secar durante la noche en una estufa de vacío a temperatura ambiente. El peso de la resina final fue de 20,76 g (rendimiento 84,2 %).

*2.3: Escisión del péptido parcialmente protegido del soporte sólido*

25 A la resina del péptido seco en el burbujeador de nitrógeno se le añadió TFA (25 ml) que contenía TIS al 5 % y agua al 5 %, y la mezcla se hizo burbujear bajo nitrógeno durante 30 minutos. La disolución del péptido se drenó entonces en tolueno (200 ml) y se evaporó en vacío a TA. Se añadió éter dietílico frío al residuo oleoso con el fin de precipitar el producto como un sólido. Después de la trituración con éter dietílico y el secado, se obtuvieron 600 mg del péptido ditiol bruto. Se demostró que la pureza por HPLC del producto bruto era de alrededor del 70% con varios productos secundarios identificados debido a las modificaciones durante la etapa de escisión con TFA. La impureza más significativa (10-15 %) fue causada por la escisión de una de las ramificaciones laterales oxima de CA1.

*2.4: Ciclización 1: oxidación del péptido ditiol bruto: disulfuro 6,14*

35 Se disolvió el péptido ditiol bruto del punto 2.3 anterior (0,132 mmol, 300 mg) en porciones en 600 ml de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M (pH 8) en agua/acetnitrilo (80:20) que contenía ferrocianuro de potasio (0,3 mmol, 100 mg). La reacción se dejó en agitación bajo nitrógeno durante 16 horas y a continuación se usó el análisis por HPLC para confirmar la conversión completa del ditiol de partida en el producto oxidado. A continuación se acidificó la disolución del péptido hasta pH 2 con TFA, se filtró a través de un filtro de 0,45 micrómetros (Millipore) y posteriormente se bombeó directamente en la columna de HPLC preparativa y se inició la elución en gradiente. Las fracciones con pureza >80 % se combinaron y se liofilizaron, obteniéndose 140 mg del producto deseado.

*2.5: Ciclización 2: Desprotección del grupo Acm y ciclización 6,14; 5,10*

40 Se disolvió el producto mono-disulfuro del punto 2.4 anterior (0,14 g, 0,062 mmol) en 150 ml de ácido acético/DMSO (1:1) que contenía anisol 0,1 ml y se añadió yodo (0,1 g, 0,39 mmol). La mezcla de reacción se agitó en la oscuridad durante 30 minutos antes de diluir hasta un volumen total de 450 ml con agua destilada. A continuación, se extrajo la disolución del péptido dos veces con éter dietílico en un embudo de separación y la fase acuosa se analizó por HPLC.

45 El análisis por HPLC reveló la presencia de dos nuevos productos presentes en una relación 4:1. Ambos productos tenían el peso molecular deseado como se evidencia por el análisis de EM y correspondían a dos isómeros conformacionales. La capa acuosa se filtró una vez más a través de un filtro de 0,45 micrómetros (Millipore) antes de bombear directamente en la columna de HPLC preparativa e iniciar la elución en gradiente. Las fracciones con pureza >80 % se combinaron y se liofilizaron, obteniéndose 40 mg del producto deseado.

**2.6: Ciclización 3: Desprotección del grupo Mob y ciclización**

Al producto bis-disulfuro del punto 2.5 anterior (40 mg, 0,019 mmol) se le añadió una disolución de DMSO al 10 %/TFA (50 ml) que contenía anisol 0,1 ml, y la mezcla se agitó suavemente (20 minutos). El TFA se evaporó en vacío a temperatura ambiente y el producto se hizo precipitar por la adición de éter dietílico. Después de la trituración con éter dietílico se recuperaron 25 mg del producto completamente plegado. La HPLC preparativa del producto bruto y la liofilización dio 16 mg del producto deseado (pureza >98 %). Análisis de EM por LCQ; (M+H)<sup>+</sup> hallado = 1873, (M+H)<sup>+</sup> esperado = 1873.

**2.7: Intercambio de sales**

La sal de TFA pura anterior se disolvió en agua que contenía acetato de amonio al 0,1 %. Se llevó a cabo el gradiente de elución en una columna de fase inversa C18 utilizando un gradiente de B del 10 hasta el 60 % durante más de 40 minutos, en la que el tampón A = acetato de amonio al 0,1 %/H<sub>2</sub>O y el tampón B = acetato de amonio al 0,1 % en acetonitrilo al 80 %/H<sub>2</sub>O). Se recuperó la sal de acetato (15 mg) después de la liofilización.

**Ejemplo 3. Síntesis del agente quelante 1 (CA1)**

A una disolución de tris-(2-aminoetil) amina (Aldrich; 2 ml, 13 mmol) en acetonitrilo (20 ml) se le añadió bicarbonato de sodio (2,2 g, 26 mmol). Se añadió lentamente y a 0 °C una disolución de 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano (1,8 g, 13 mmol) en acetonitrilo seco (10 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas y posteriormente se filtró. El filtrante se lavó con acetonitrilo y se evaporó el filtrado. El producto bruto se disolvió en acetonitrilo y se purificó por HPLC (Hamilton PRP-1; A: NH<sub>3</sub> acuoso al 2 %, B: MeCN; B al 0-100 % en 20 minutos; 3 ml/min) para dar CA1. Rendimiento: 0,88 g, 19 %.

**Ejemplo 4. Conjugación del péptido al agente quelante****4.1: Acoplamiento del conector de ácido succínico**

Se transfirió una alícuota (1 g, aproximadamente 0,3 mmol) de la resina del péptido del ejemplo 2 a un burbujeador de nitrógeno, donde se llevó a cabo una nueva serie de lavados en DMF (3 x 15 ml). A continuación se añadió una disolución que contenía anhídrido succínico 1 mmol en DMF (20 ml) y la mezcla se hizo burbujear bajo nitrógeno durante 30 minutos. Se lavó el polímero 5 veces con una cantidad de 15 ml de DMF y se tomó una muestra de resina para el análisis por la prueba de Kaiser para confirmar la ausencia de grupos amino libres.

**4.2: Acoplamiento del agente quelante 1 (CA1)**

La funcionalidad ácida unida a la resina se preactivó a continuación in situ mediante la adición de una disolución en DMF (15 ml) que contenía PyAOP (0,52 g, 1 mmol), HOAt (0,14 g, 1 mmol) y NMM (0,2 ml, 2 mmoles). La activación en la resina se llevó a cabo durante 10 minutos seguida por la adición de una disolución en DMF (10 ml) de CA1 (0,4 g, 1,1 mmol). La mezcla se hizo burbujear durante 3 horas, a continuación se eliminaron los reactivos en exceso por filtración seguido por el lavado con DMF (5 x 15 ml), DCM (3 x 15 ml) y éter (3 x 15 ml). A continuación se secó el péptido-resina en una corriente de nitrógeno.

**Ejemplo 5. Radiomarcado: procedimiento con hidróxido de sodio**

Se disolvió una alícuota de conjugado (100 µg) en disolución salina purgada con nitrógeno (900 µl) y se añadió a un vial P6 silanizado utilizando puntas de pipeta silanizadas. El pH de la disolución se ajustó hasta pH 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 0,01M y se tapó el vial. A la disolución se le añadió Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (1 ml, 1 GBq/ml) desde un generador recién eluido (tiempo desde la elución inferior a 2 horas). El pH de la disolución se ajustó nuevamente a pH 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 0,01 M. A continuación se añadió una disolución recién preparada de SnCl<sub>2</sub> purgada con nitrógeno (0,1 ml, 10 mg/100ml de disolución salina). El pH de la disolución se ajustó nuevamente a pH 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 0,01 M. Después de cada adición se agitó el vial para asegurar el mezclado. La preparación se dejó reposar a temperatura ambiente.

**Ejemplo 6. Radiomarcado: procedimiento con tampón de borato**

Se añadió tampón de borato 12,5 mM (1 ml) a una alícuota de conjugado y se sometió a ultrasonido durante 30 segundos. La disolución resultante se añadió a un vial P6 silanizado, utilizando puntas de pipeta silanizadas, y se tapó el vial. A la disolución se le añadió Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (1 ml, 1 GBq/ml) desde un generador recién eluido (tiempo desde la elución inferior a 2 horas). A continuación se añadió una disolución recién preparada de SnCl<sub>2</sub> purgada con nitrógeno (0,1 ml, 10 mg/100ml de disolución salina). Después de cada adición se agitó el vial para asegurar el mezclado.

**Ejemplo 7. Análisis del marcado**

La investigación de las características del marcado de los conjugados de CA1 se realizó mediante el marcado de CA1-ST<sub>5-18</sub> utilizando el procedimiento con hidróxido de sodio que se describe en el ejemplo 5. El análisis simultáneo por HPLC y por cromatografía instantánea en capa fina (ITLC) se realizó aproximadamente a los 15, 60 y 120

minutos después de la reconstitución. Además, se realizó una HPLC preparativa para obtener muestras puras de las dos especies con  $^{99m}\text{Tc}$ . El análisis de ITLC se realizó en cada muestra purificada para confirmar la concordancia entre las dos técnicas analíticas. Se realizaron otros estudios sobre conjugados CA1 alternativos para confirmar las características del marcado observadas.

- 5 Los resultados de la investigación inicial de las características del marcado mostraron una sola especie importante de  $^{99m}\text{Tc}$  en puntos temporales tempranos, que se convirtieron casi completamente en una segunda especie en el plazo de unas horas. Se observó buena concordancia entre ITLC y el análisis por HPLC. Se resolvieron dos especies conjugadas con  $^{99m}\text{Tc}$  tanto por HPLC como por ITLC y las cantidades relativas de cada especie se correlacionaron bien. Para confirmar más, se realizó una HPLC preparativa con el fin de obtener muestras puras de las dos especies.

#### **Ejemplo 8. Efecto del pH sobre el radiomarcado**

- 15 El efecto del pH sobre las características del marcado se investigó mediante la comparación del marcado de CA1-ST<sub>5-18</sub> (100 µg), utilizando el procedimiento de tampón de borato descrito en el ejemplo 6, a pH 8,1, 8,5 y 9,0. El análisis por ITLC se realizó a los 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la reconstitución. Se estudió un intervalo de pH relativamente estrecho debido a la conocida inestabilidad del vector de ST<sub>5-18</sub> a pH alto, causada por la presencia de tres puentes disulfuro.

Se muestran los resultados de la comparación del marcado de CA1-ST<sub>5-18</sub> a pH 8,1, 8,5 y 9,0 (figura 1). Los resultados se expresan como % de especie 2 formado, como se puede ver por medio del análisis por ITLC (papel de ITLC/SG Gelman, eluyente de disolución salina:acetonitrilo, 70:30).

#### **Ejemplo 9. Efecto de la temperatura en el radiomarcado**

- 25 El efecto de la temperatura sobre las características del marcado se investigó mediante la comparación del marcado de CA1-ST<sub>5-18</sub> (100 µg), utilizando el procedimiento con tampón de borato (pH 9,0) descrito anteriormente, seguido por el calentamiento a 40, 60 y 75 °C. Se dejó reposar cada preparación a temperatura ambiente durante 10 minutos después de la reconstitución y a continuación se calentó durante 20 minutos. El análisis por ITLC se realizó antes del calentamiento (10 minutos después de la reconstitución), 10 minutos después del calentamiento (40 minutos después de la reconstitución) y 60 minutos después del calentamiento (100 minutos después de la reconstitución).

Se muestran los resultados de la comparación del marcado de CA1-ST<sub>5-18</sub> a 40, 60 y 70 °C (figura 2). Los resultados se expresan nuevamente como % del pico 2 formado, según se mide mediante el análisis por ITLC (papel de ITLC/SG Gelman, eluyente de disolución salina:acetonitrilo, 70:30).

#### **Ejemplo 10. Efecto del nivel de conjugado en el radiomarcado**

- El efecto del nivel de conjugado en las características del marcado se investigó mediante la comparación del marcado de varias cantidades de CA1-ST<sub>5-18</sub> (12,5, 25, 50 y 100 µg) utilizando el procedimiento con tampón de borato (pH 9,0) descrito anteriormente. El análisis por ITLC se realizó a los 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la reconstitución.

- 35 Se muestran los resultados del marcado de CA1-ST<sub>5-18</sub> en niveles variables (12,5, 25, 50 y 100 µg, equivalentes a  $6,6 \times 10^{-9}$ ,  $1,3 \times 10^{-8}$ ,  $2,7 \times 10^{-8}$  y  $5,3 \times 10^{-8}$  moles) ( figura 3). Los resultados se expresan como el porcentaje de especie 2 formado, como puede verse por medio del análisis por ITLC (papel de ITLC/SG Gelman, eluyente de disolución salina:acetonitrilo, 70:30). Se han mostrado los datos de THR (Tabla II).

**Tabla II: Niveles de THR en preparaciones radiomarcadas.**

	100 µg	50 µg	25 µg	12,5 µg
THR (%)	0,6	1,5	1,9	2,7

- 40 **Ejemplo 11. Estabilidad del conjugado en las condiciones de marcado**

- 45 Para establecer la estabilidad del material de partida en las condiciones de marcado, se llevó a cabo un experimento de marcado "blanco", inactivo. Un marcado "blanco" implicó la sustitución del  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  por disolución salina. Se sometió el CA1-ST<sub>5-18</sub> (100 µg) al procedimiento de marcado con tampón de borato (pH 9,0, 60 °C, 20 minutos). A continuación, se purificó el material de partida por HPLC y se llevó a cabo un ensayo de unión competitiva para determinar si existía alguna pérdida de afinidad por el receptor en comparación con la situación previa al procedimiento de marcado. Se realizó el análisis por HPLC para detectar cualquier degradación del compuesto.

No se observó degradación del compuesto por HPLC y la potencia (medida por el ensayo de unión competitiva) no se alteró de manera significativa.

**Ejemplo 12. Competencia entre CA1-benzamida y ST<sub>5-18</sub>**

5 Para investigar la coordinación de 99mTc al conjugado de péptido, se realizó un estudio de competencia. En primer lugar, se marcaron independientemente CA1-benzamida (que fue elegido para imitar la porción CA1 del CA1-ST<sub>5-18</sub>) y ST<sub>5-18</sub> usando el procedimiento con tampón de borato (pH 9,0, 60 °C durante 20 minutos) y se caracterizó por HPLC e ITLC. Para el estudio de competencia, se marcaron cantidades equimolares de CA1-benzamida (31 µg, 6,92 x 10<sup>-8</sup>) y ST<sub>5-18</sub> (100 µg, 6,92 x 10<sup>-8</sup>) juntos en el mismo recipiente utilizando el procedimiento con tampón borato. Los análisis por ITLC y HPLC, como se describe en los ejemplos 13 y 14, determinaron dónde se había coordinado el tecnecio.

**Ejemplo 13. ITLC**

- 10 Papel de ITLC/SG Gelman eluido con disolución salina  
 Papel de ITLC/SG Gelman eluido con metil etil cetona (MEK, 2-butanona)  
 Papel de ITLC/SG Gelman eluido con una mezcla 70:30 v/v de disolución salina y acetonitrilo  
 Papel Whatman N° 1 (W1) eluido con una mezcla 50:50 v/v de agua y acetonitrilo

**Ejemplo 14. HPLC**

- 15 Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el hardware Gilson y el software Unipoint.  
 Columna: Phenomenex Luna C-18, 4,6 x 250 mm, 5 µm  
 Eluyente A: ácido acético al 0,1 % (pH elevado hasta pH 5,0 con amoníaco) en agua al 90 %/acetonitrilo al 10 %  
 Eluyente B: ácido acético al 0,1 % (pH elevado hasta pH 5,0 con amoníaco) en agua al 10 %/ acetonitrilo al 90 %  
 Flujo: 1 ml/min
- 20 Detector UV: λ = 230 nm  
 Se utilizaron gradientes similares para los diferentes conjugados. Un gradiente típico fue:  
 T<sub>0</sub>: B al 0 %  
 T<sub>5</sub>: B al 15 %  
 T<sub>20</sub>: B al 15 %
- 25 T<sub>21</sub>: B al 0 %  
 T<sub>30</sub>: B al 0 %

**Ejemplo 15. Ensayo de unión competitiva**

30 Se evaluó la potencia de los compuestos por medio de un ensayo de unión de radioligandos para determinar la constante de inhibición (Ki) como una medida de la potencia de la unión. Los procedimientos se describen en otros lugares, pero brevemente, se hizo competir [<sup>125</sup>I]ST<sub>1-17</sub> con compuestos ST fríos (0,0001-50 µM) en placas de 96 pocillos que contenían aproximadamente 1 µg de membrana intestinal de rata y se incubaron 1 hora a 37 °C. Se filtraron las muestras (filtros GF/B, Whatman) para recuperar el péptido radiomarcado unido y se realizó el conteo para determinar el % de unido/libre.

35 La potencia de los compuestos se determinó mediante la constante de inhibición (Ki) por su capacidad para competir con el radioligando, [<sup>125</sup>I] ST<sub>1-17</sub>. Las potencias de los compuestos seleccionados se muestran en la Tabla III.

**Tabla III: Datos del ensayo de Ki para los compuestos de CCR. Los valores de Ki que se muestran son el promedio de los valores por triplicado de los pocillos de ensayo. La unión inespecífica representa menos del 0,1 % en todos los casos y la unión total (sin péptido competidor) no es mayor al 20 %.**

Compuesto	Valor medio de Ki (nM)	Comentarios
ST <sub>1-17</sub>	0,6	Péptido ST
ST <sub>5-18</sub>	0,4	Vector central seleccionado
CA3-ST <sub>5-18</sub>	0,8	Marcado
CA3-ST <sub>5-18</sub> (cyc-ala)	ninguno	Control negativo
CA1-ST <sub>5-18</sub>	2,8	No marcado
CA-ST <sub>5-18</sub>	3,5	Simulación de marcado

**Ejemplo 16. Ensayo de unión radiactiva**

Para determinar si el radiomarcado afectaba a la unión del compuesto, se probaron los compuestos marcados para determinar su capacidad para unirse al receptor. Brevemente, se incubaron los compuestos radiomarcados purificados por HPLC (aproximadamente 0,05 nM) con 6 µg/150 µl de volumen final de membrana intestinal de rata (una hora), en presencia y en ausencia del péptido competidor (ST<sub>5-18</sub> 50 µM). Se filtraron las muestras (filtros GF/B, Whatman) para recuperar el péptido radiomarcado unido y se realizó el conteo para determinar el % de unido/libre. La unión inespecífica representó menos del 1 % en todos los casos.

Para garantizar que se mantenía la potencia después del marcado, se desarrolló un ensayo que mide la unión de los compuestos marcados.

**10 Ejemplo 17. Biodistribución en un modelo de tumor subcutáneo**

El modelo subcutáneo se utilizó como una selección inicial apropiada in vivo. Brevemente, se inyectaron ratones (Charles River, hembras atímicas CD-1, de aproximadamente 20 g) por vía subcutánea en el pescuezo con células de carcinoma de colon humano T84 (0,1 ml, 1 x 10<sup>8</sup> células/ml en medio) a través de una aguja de calibre 23 y se dejaron desarrollar los tumores durante 6 a 8 semanas.

15 Se estudiaron al menos tres animales por punto de prueba. Los resultados se expresan como % de la dosis inyectada por gramo (% DI/g) de tejido. Debido al rápido aclaramiento del CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con <sup>99m</sup>Tc (más del 90 % se excreta por la orina 60 minutos p.i.) la captación tumoral también se expresa como retención relativa (RR).

Los compuestos fueron seleccionados por su captación en tumores T84 subcutáneos en el ratón (Tabla IV). Este modelo permite la evaluación de la imaginabilidad de CA1-ST<sub>5-18</sub> al permitir la comparación entre la captación del tumor y del tejido de fondo.

**Tabla IV: Datos de selección para los compuestos de la invención.**

Selección	CA3-ST <sub>5-18</sub> (cyc-ala)	CA3-ST <sub>5-18</sub>	CA1-ST <sub>5-18</sub>	CA1-lys <sub>6</sub> -gly-ST <sub>5-18</sub>	CA1-gly <sub>3</sub> -Dglu <sub>3</sub> -ST <sub>5-18</sub>
Valor de Ki (nM)	ninguno	0,8	2,8	72	1
HBS (% di a las 2 horas p.i.)	26	5	1,0	1,48	0,71
Urinario (% di a las 2 horas p.i.)	32	90	>90	76	63
Hígado (% di a las 2 horas p.i.)	0,93	0,5	0,1	4,9	0,46
Captación y relaciones tumorales (% di/g a las 2 horas p.i.)	0,21	0,8	0,94	1,0	0,26
RC a las 2 horas p.i.	0,1	0,24	0,32	0,3	0,08
RR a las 2 horas p.i.	0,17	2,5	6,4	1,6	1,9
Tumor/hígado	0,08	2	12,4	0,23	0,63
Retención durante 2 horas	8	30	20	34	5,5

**Ejemplo 18. Obtención de imágenes en el modelo de tumor subcutáneo**

25 Los tumores se dejaron desarrollar como en el ejemplo 17. Los animales fueron controlados durante el crecimiento del tumor durante 8 a 10 semanas, hasta que los tumores tuvieron un tamaño de 0,5 a 1 cm. Después de este tiempo, se inyectaron los animales con el artículo de prueba (0,1 ml, 20 MBq/ml o 200 MBq/ml) como una inyección intravenosa rápida a través de la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados en varios puntos temporales p.i. y se obtuvieron imágenes bidimensionales de todo el cuerpo entre los 5 minutos y 24 horas p.i. con una cámara gamma (Park Medical Isocam-1). Los tiempos de adquisición de imágenes fueron típicamente de 15-30 minutos o 30 150-250K conteos (todo el cuerpo, con colimador LEUHR).

**Ejemplo 19. Captación de CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con <sup>99m</sup>Tc y CA3-ST<sub>5-18</sub>(Cys-Ala) (control negativo) en los tumores CCR**

5 CA3-ST<sub>5-18</sub>(Cys-Ala) tiene la misma secuencia peptídica que CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con <sup>99m</sup>Tc, excepto que todas las cisteínas han sido sustituidas por aminoácidos alanina, lo que elimina los tres puentes disulfuro necesarios para la unión. CA3-ST<sub>5-18</sub>(Cys-Ala) también contiene el CA3 a diferencia de CA1 y por lo tanto se marcó utilizando un protocolo adecuado para este quelato. Para examinar la captación y la retención de CA3-ST<sub>5-18</sub>(Cys-Ala) y CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con <sup>99m</sup>Tc, se inyectaron ratones atímicos CD-1 portadores de tumores T84 subcutáneos, se sacrificaron y se diseccionaron en diversos tiempos p.i. Los datos se presentan en las figuras 5 y 6.

**Ejemplo 20. Biodistribución en el modelo de metástasis hepáticas**

10 El modelo de metástasis hepáticas se utilizó tanto en ratones como en ratas. Como para el modelo de tumores subcutáneos, excepto en el establecimiento de los tumores, las células se inyectaron a través del bazo y se dejó que se transfirieran al hígado a través de la circulación. Dos minutos después de la inyección de las células, se realizó una esplenectomía. Se dejó que los animales generaran tumores durante 6 a 8 semanas.

15 Los animales fueron controlados durante el crecimiento tumoral durante 8 a 10 semanas, hasta que los tumores tuvieron un tamaño de 0,5 a 1 cm. Después de este tiempo, se inyectaron los animales con el artículo de prueba (0,1 ml, 20 MBq/ml o 200 MBq/ml) como una inyección intravenosa rápida a través de la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados en varios puntos temporales p.i. Se realizó la disección de músculo, riñones, pulmón, tiroides, hígado, estómago, intestino delgado, intestino grueso y el tumor y se tomó una muestra de orina y de sangre. Los tejidos diseccionados, las muestras de sangre y los patrones fueron pesados y contados (Wallac Wizard). Se estudiaron al menos tres animales por punto de prueba. Los resultados se expresan como % DI/g de tejido. Debido al rápido aclaramiento del CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con <sup>99m</sup>Tc (más del 90 % se excreta por la orina 60 minutos p.i.) la captación tumoral también se expresa como RR (figura 7).

**Ejemplo 21. Obtención de imágenes en el modelo de metástasis hepáticas**

25 Los tumores se dejaron desarrollar en los animales como se describe en el ejemplo 20. Los animales fueron controlados durante el crecimiento tumoral durante 8 a 10 semanas, hasta que los tumores tuvieron un tamaño de 0,5 a 1 cm. Después de este tiempo, se inyectaron los animales con el artículo de prueba (0,1 ml, 200 MBq/ml) como una inyección intravenosa rápida a través de la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados en varios puntos temporales p.i. y se adquirieron imágenes bidimensionales de todo el cuerpo entre los 5 minutos y 24 horas p.i. con una cámara gamma (Park Medical Isocam-1). Los tiempos de adquisición de imágenes fueron típicamente de 15-30 minutos o 150-250K conteos (todo el cuerpo, con colimador LEUHR). Se muestra la captación de CA1-ST<sub>5-18</sub> marcado con <sup>99m</sup>Tc en el modelo de metástasis de hígado de rata (figura 8). La imagen tiene los riñones enmascarados para mejorar la resolución de las imágenes de las metástasis.

**Ejemplo 22. Captación de CA1-ST<sub>5-18</sub> en un tumor no colónico**

35 Para examinar la especificidad de los compuestos de la presente invención por los carcinomas de colon, se inyectaron ratones C57BL/6 que portaban tumores subcutáneos de carcinoma pulmonar de Lewis con CA1-ST<sub>5-18</sub> y se realizó la disección en varios puntos temporales p.i. El carcinoma pulmonar de Lewis está originado espontáneamente en el pulmón de ratones C57BL/6 y por lo tanto no es de origen colorrectal y se cree que no expresa el receptor de ST.

**Ejemplo 23. Captación de CA1-ST<sub>5-18</sub> mediada por el receptor de ST**

40 Para examinar la especificidad de los compuestos de la presente invención por carcinomas de colon, se obtuvieron imágenes de ratones atímicos portadores de tumores T84 como se describe en el ejemplo 17. La inyección conjunta de 100 µg/ratón de péptido ST inyectados con CA1-ST<sub>5-18</sub> redujo la captación en un 40 %. (Figura 9).

**Ejemplo 24. Efecto de las impurezas**

45 Se observó que existía un aumento en la actividad del tejido de fondo observada con las preparaciones no purificadas por HPLC; esto que podría deberse potencialmente a varios factores: la presencia de péptido en exceso, la presencia de impurezas marcadas con <sup>99m</sup>Tc (por ejemplo THR u otros). Se llevaron a cabo otros estudios para investigar las otras posibles causas para el aumento del fondo observado con las preparaciones no purificadas por HPLC, se probaron diferentes enfoques para reducir las impurezas, tales como THR. Las preparaciones se filtraron (tamaño del filtro 0,2 µm) o se les añadió MDP, que se sabe que reduce los niveles de THR.

**Ejemplo 25. Comparación del modelo de tumor usado con tejido humano**

50 Los datos de densidad de receptores en T84 muestran buena comparación con los de la metástasis en el hígado humano (figura 10). La comparación directa de los datos de metástasis hepáticas humanas y de densidad de receptores en xenoinjertos tumorales (Bmáx) muestran claramente que la densidad media de receptores de tumores humanos se encuentra entre la observada para los tumores T84 y LS180.

Para determinar si la captación variaba con las diferencias en la densidad de receptores, se llevaron a cabo estudios de biodistribución en una variedad de xenoinjertos de tumores con diferentes expresiones del receptor de ST.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Amersham plc
- 5 <120> Conjugados mejorados de péptido-quelato
  - <130> PZ0107
  - <160> 8
  - <170> PatentIn version 3.1
- 10 <210> 1
  - <211> 14
  - <212> PRT
  - <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
  - <223> Péptido sintético
- <400> 1
 

	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Tyr
	1				5					10				
- 20 <210> 2
  - <211> 17
  - <212> PRT
  - <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
  - <223> Péptido sintético
- <400> 2
 

	Asn	Ser	Ser	Asn	Tyr	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly
	1				5					10					15	
	Cys															
- 30 <210> 3
  - <211> 21
  - <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 3

Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala
1				5					10					15	
Cys	Ala	Gly	Cys	Tyr											
			20												

<210> 4

<211> 21

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 4

Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Gly	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala
1				5					10					15	
Cys	Ala	Gly	Cys	Tyr											
			20												

<210> 5

<211> 20

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

25

<220>

<221> Aminoácido D

<222> (4)..(6)

<223>



<220>

<221> Aminoácido D

<222> (4)..(6)

<223>

5

<400> 5

Gly	Gly	Gly	Glu	Glu	Glu	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys
1				5					10					15	
Ala	Gly	Cys	Tyr												
			20												

<210> 6

<211> 19

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (4)..(5)

<223> X indica ácido aminocaproico

20

<400> 6

Gly	Gly	Gly	Xaa	Xaa	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala
1				5					10					15	
Gly	Cys	Tyr													

<210> 7

<211> 17

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (3)..(3)

<223> X indica (CH2)5

5

<400> 7

Phe	Phe	Xaa	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys
1				5					10					15	
Tyr															

<210> 8

<211> 14

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 8

Ala	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Asn	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Tyr
1				5					10				

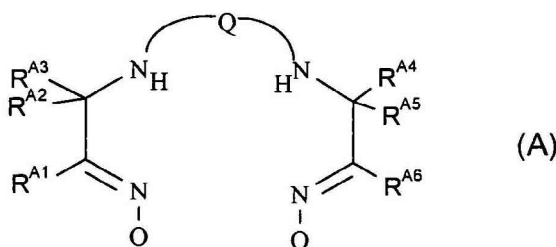
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un complejo metálico que comprende complejar un radiometal a un agente quelante tetradentado de un conjugado de péptido-quelato en presencia de un agente reductor que es una sal estañosa, en el que dicho conjugado de péptido-quelato comprende un péptido que tiene afinidad por el receptor de ST conjugado al agente quelante tetradentado, en el que el péptido que tiene afinidad por el receptor de ST se elige de ID. SEC. 1 a 7, y en el que el agente tetradentado se elige de diaminadioximas y ligandos N<sub>3</sub>S.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el radiometal de dicho complejo metálico se elige de <sup>64</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu y <sup>99m</sup>Tc.

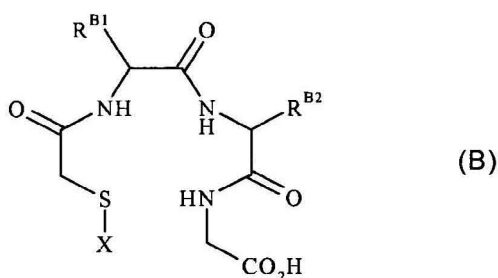
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el radiometal de dicho complejo metálico es <sup>99m</sup>Tc.

4. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho agente quelante tetradentado es de fórmula A:



en la que R<sup>A1</sup> a R<sup>A6</sup> son todos CH<sub>3</sub> y Q es -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NR(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- y en el que R es hidrógeno o alquilo C<sub>1-10</sub>, alquilarilo, alcoxialquilo, hidroxialquilo, fluoroalquilo, aminoalquilo o carboxialquilo.

5. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho agente quelante tetradentado es de fórmula B:



en la que R<sup>B1</sup> y R<sup>B2</sup> son ambos H y X es un grupo protector tiol.

6. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la conjugación del conjugado de péptido-quelato es en el extremo N terminal o en el extremo C terminal del péptido.

7. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho conjugado de péptido-quelato además comprende un grupo conector entre el péptido y el agente quelante tetradentado.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el grupo conector comprende una secuencia peptídica de 5 a 9 aminoácidos.

9. El procedimiento de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el grupo conector se selecciona de -poly-Lys-, -poly-Glu-, -(Gly)<sub>2</sub>-Glu-(Lys)<sub>3</sub>-, (Gly)<sub>2</sub>-Glu-Lys-Glu-Lys-, (Phe)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, (Lys)<sub>6</sub>-Gly-, -(Gly)<sub>3</sub>-(DGlu)<sub>3</sub>- y -(Gly)<sub>3</sub>-(ácido aminocaproico)<sub>2</sub>-.

10. Un kit para llevar a cabo el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende:

i) un conjugado de péptido-quelato y

ii) un agente reductor que es una sal estañosa, en el que dicho conjugado de péptido-quelato comprende un péptido que tiene afinidad por el receptor de ST conjugado a un agente quelante tetradentado, en el que el péptido que tiene afinidad por el receptor de ST se elige de ID. SEC. N° 1 a 7, y en el que el agente quelante tetradentado se elige de diaminadioximas y ligandos N<sub>3</sub>S.

11. El kit de la reivindicación 10 y que además comprende uno o más estabilizantes; antioxidantes; agentes de carga para liofilización; y solubilizantes.

Figura 1

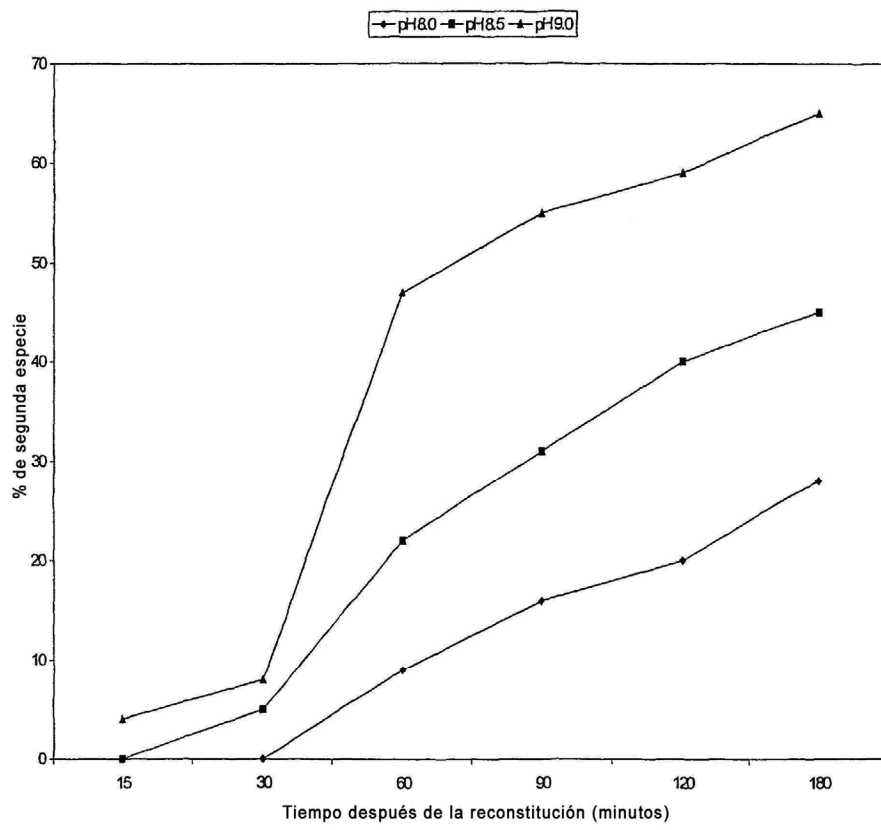


Figura 2

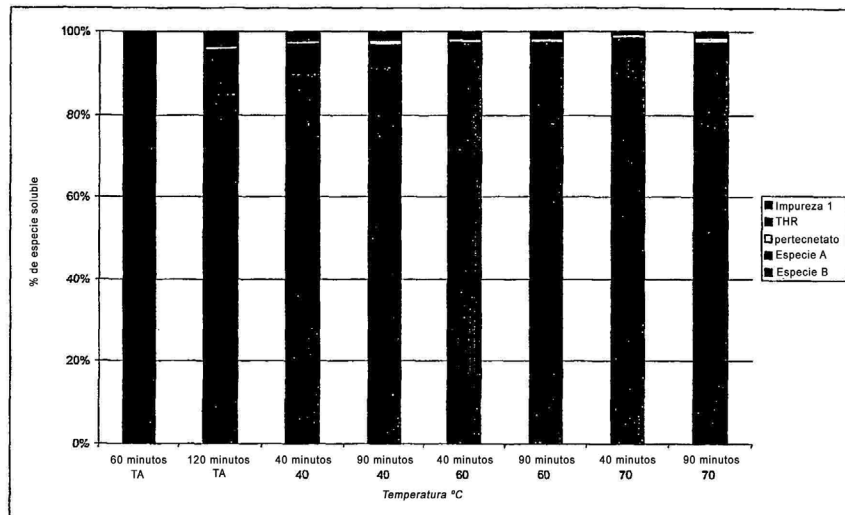


Figura 3

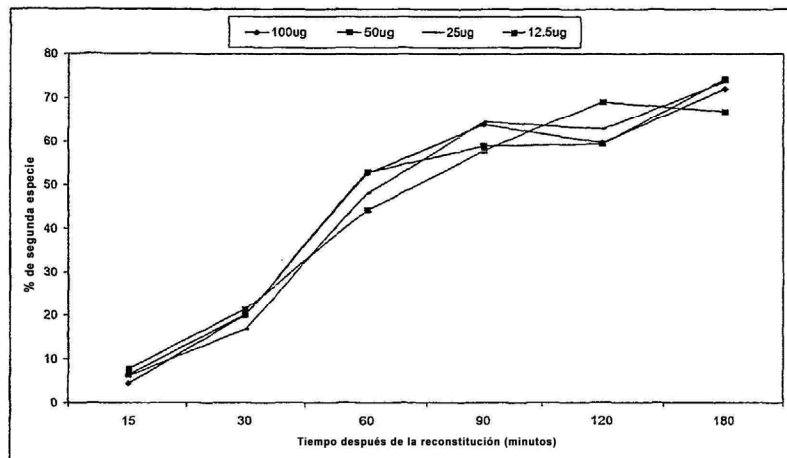


Figura 4

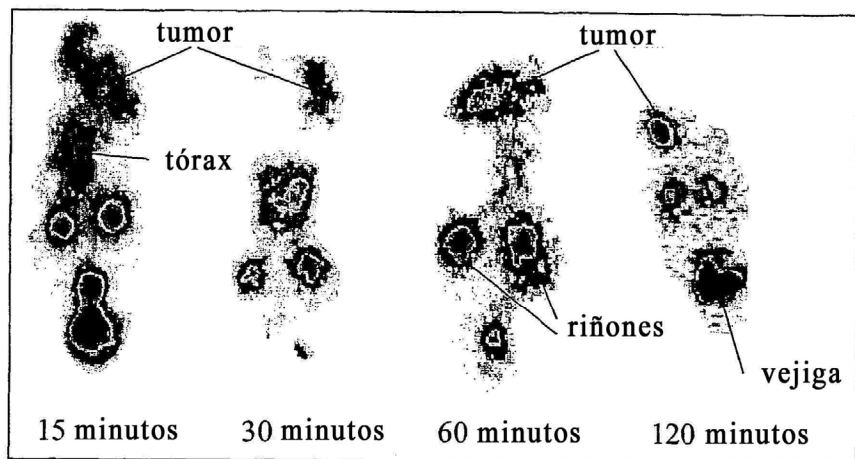


Figura 5

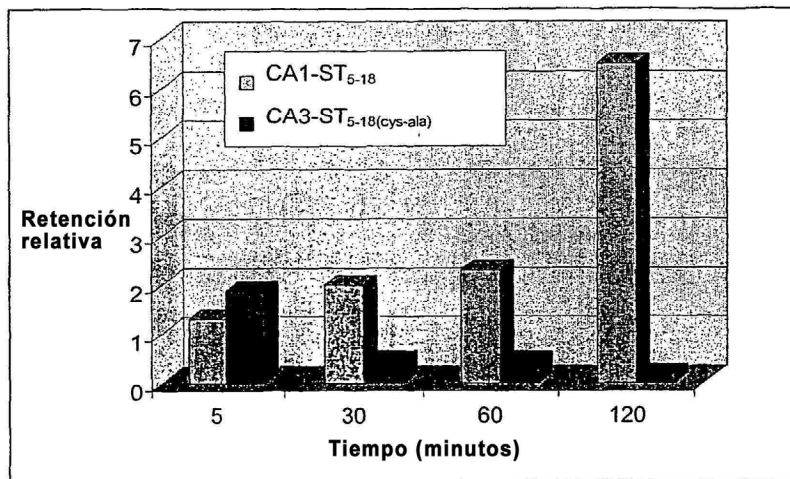




Figura 6

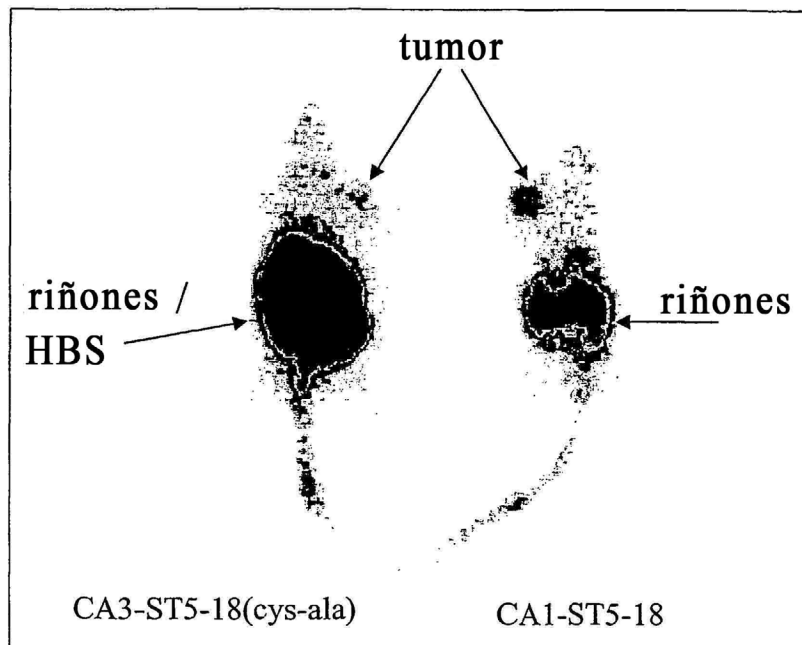


Figura 7

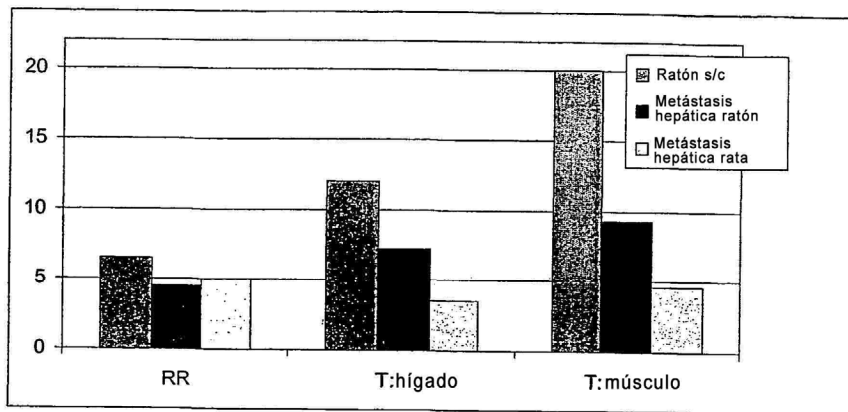


Figura 8

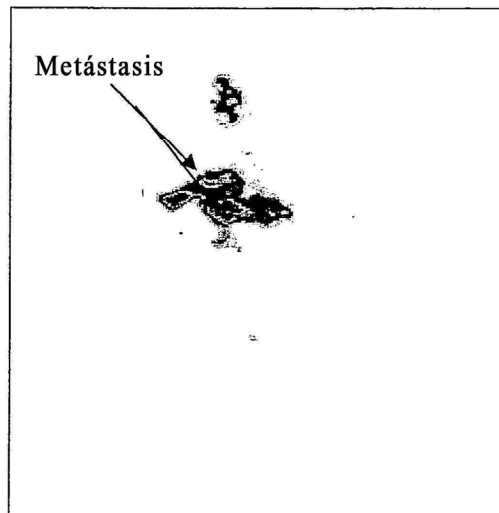


Figura 9

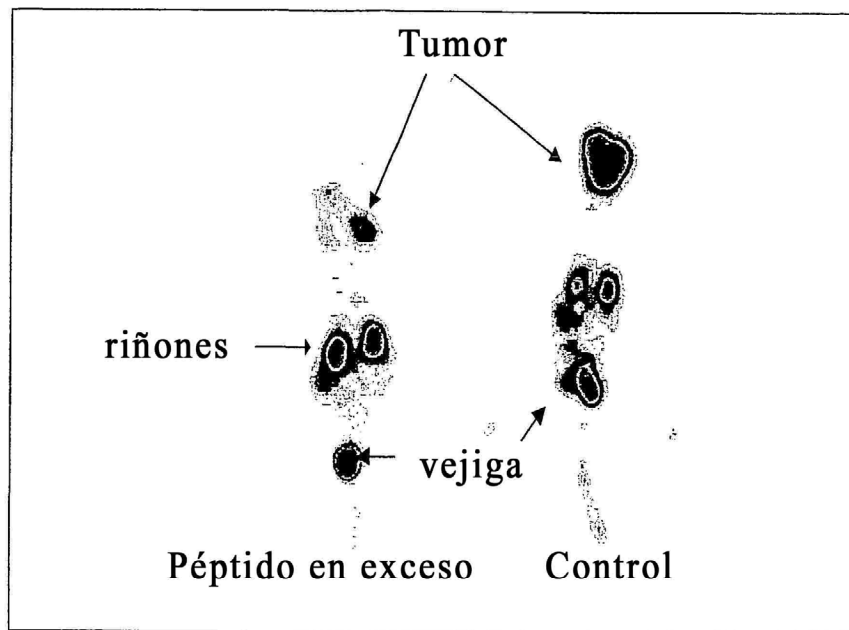


Figure 10

