

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 961**

51 Int. Cl.:

A61K 103/20 (2006.01)

A61K 103/10 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

C07K 14/655 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.1996 E 07019899 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 1872800**

54 Título: **Composiciones de péptidos radiomarcados para dirigir a un sitio específico**

30 Prioridad:

07.06.1995 US 480373

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

18.02.2013

73 Titular/es:

**MALLINCKRODT LLC (100.0%)
675 McDonnell Boulevard
Hazelwood, MO 63042, US**

72 Inventor/es:

**SRINIVASAN, ANANTHACHARI;
DYSZLEWSKI, MARY MARMION;
BUGAJ, JOSEPH E. y
ERION, JACK L.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 395 961 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de peptidos radiomarcados para dirigir a un sitio específico

5 Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere en general a composiciones de péptidos radiomarcados para uso radiofarmacéutico y, más específicamente, se refiere a un péptido radiomarcado para uso diagnóstico o terapéutico que posee un aminoácido carboxi-terminal no modificado. En particular se reivindican los conjugados péptido/quelato y métodos para hacer conjugados péptido/quelato.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Varias composiciones de péptidos radiomarcados se han desarrollado o están en desarrollo para dirigir un radionucleido terapéutico o diagnóstico a un sitio específico. El principio general implica unir un radionucleido seleccionado a un péptido que posee una elevada especificidad por un órgano o tejido particular de manera que el órgano o tejido pueda producir una imagen gammagráfica con fines diagnósticos o pueda tratarse por medio de un radioisótopo terapéutico. Este campo de investigación ha demostrado una aplicabilidad particular para la obtención de imágenes y tratamiento de tumores. Los sitios biológicos particularmente convenientes incluyen tumores neuroendocrinos tales como tumores abdominales y carcinomas de pulmón de células pequeñas, tumores cerebrales, tumores de próstata, tumores de mama, tumores de colon, y tumores ováricos.

20 [0003] Algunos de los péptidos radiomarcados para dirigirlos al sitio específico incluyen un pentetreótido marcado con In-111 (Mallinckrodt Medical, Inc.) que se dirige a tumores neuroendocrinos, una somatostatina o análogo de somatostatina marcados con tecnecio 99m (Patente Estadounidense n° 5.225.180, Publicación Internacional n° 94/00489) para obtener una imagen de tejidos u órganos que presentan receptores de somatostatina, un análogo de somatostatina marcado con In-111 identificado como RC-160 (W. A. P. Breeman, et al., European J. Nuc. Medicine, 21, 328 (1994)), y péptidos cíclicos marcados con tecnecio 99m (Publicación Internacional n° 94/00489). Cada uno de estos péptidos o derivados de péptidos se han preparado para su uso como radiofármaco por modificación del aminoácido carboxi-terminal, bien a un grupo alcohol o amida. Se creía que esto era necesario para prevenir la degradación por las peptidasas y para asegurar un tiempo de permanencia mayor del péptido en la sangre.

25 [0004] De Jong et al. (Journal of Nuclear Medicine, vol. 33, n° 5, mayo de 1992, página 955) informa acerca de los resultados de una investigación sobre la manipulación hepatobiliar de dos análogos de somatostatina: 125I-Tyr3-octreótido y 111In-DTPA-DPhe1-octreótido.

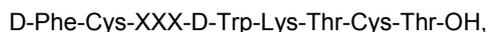
30 [0005] Bakker et al. (Life Sciences, vol. 32, n° 5, mayo de 1991, página 981) divulga el marcado del DTPA-D-Phe1-octreótido con 111In o 115In. Ello sugiere que el 111In-DTPA-D-Phe1-octreótido es un radiofármaco prometedor para la obtención de imágenes gammagráficas de los tumores positivos para receptores de somatostatina.

35 [0006] Kwekkeboom et al. (Journal of Nuclear Medicine, vol. 32, n° 5, mayo de 1991, página 981) y Pless et al. (Proceedings of the American Peptide Symposium, Leiden, vol. Symp. 12, junio de 1991, páginas 106-108). divulgan el uso de 111In-DTPA-D-Phe1-octreótido en la obtención de imágenes gammagráficas de tumores.

40 [0007] Breeman et al. (Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, editado por J. Allen, 1995, páginas 537-542) divulga el uso de 111In-DTPA-D-Phe1-octreótido y 111In-DTPA-D-Phe1-RC-160 en la obtención de imágenes gammagráficas de tumores.

Resumen de la Invención

45 [0008] La invención proporciona un conjugado péptido/quelato, comprendiendo un péptido que tiene la fórmula:



50 en donde XXX representa Phe o Tr, y -OH indica que el aminoácido terminal carboxi está en su forma de ácido carboxílico, y un agente quelante acoplado con el péptido.

55 [0009] La invención también proporciona un método para hacer un conjugado péptido/quelato como se establece en la reivindicación 6.

60 [0010] La invención también proporciona un método para hacer una composición radiofarmacéutica, comprendiendo radiomarcado un conjugado péptido/quelato reaccionando el conjugado péptido/quelato con un radionucleido, en donde el conjugado péptido/quelato comprende un péptido acoplado al agente quelante, el péptido teniendo la fórmula:

65

D-Phe-Cys-XXX-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH,

en donde XXX representa Phe o Tyr, y -OH indica que el aminoácido terminal carboxi está en su forma de ácido carboxílico.

5

[0011] Otros aspectos de la invención se establecen en las reivindicaciones añadidas.

10

[0012] Se describe una composición radiofarmacéutica para dirigir a un sitio biológico seleccionado. La composición comprende n péptido radiomarcado seleccionado del grupo que consiste de somatostatina, péptido vasointestinal (VIP), polipéptido activador de la adenilata ciclase de la pituitaria (PACAP), Sustancia P, encefalinas, neurocininas y análogos o derivados de cualquiera de las anteriores así como péptidos capaces de enlazar con el receptor correspondiente de cualquiera de los péptidos anteriores. El péptido radiomarcado se caracteriza por tener su aminoácido terminal carboxi en su forma de ácido carboxílico y el péptido está acoplado a un radionucleido de diagnóstico o terapéutico por un agente quelante.

15

20

[0013] Una composición radiofarmacéutica puede comprender un péptido radiomarcado seleccionado del grupo consistente de somatostatina, un análogo de la somatostatina, un derivado de la somatostatina y péptidos capaces de enlazar con el receptor de la somatostatina, donde el péptido está acoplado a un radionucleido de diagnóstico o terapéutico por un agente quelante, se proporciona. El péptido radiomarcado está caracterizado por tener su aminoácido terminal carboxi en su forma de ácido carboxílico. Preferiblemente el radiofarmacéutico es D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH marcado con In-111 o Tecnecio 99m a través de un agente quelante.

25

[0014] Se describe un método para dirigir a un péptido radiomarcado seleccionado del grupo seleccionado del grupo consistente de somatostatina, un análogo de la somatostatina, un derivado de la somatostatina y péptidos capaces de enlazar con el receptor de la somatostatina se proporciona en donde el péptido radiomarcado tiene su aminoácido terminal carboxi en su forma de ácido carboxílico y está acoplado con un radionucleido de diagnóstico o terapéutico por un agente quelante y la radiomarca es detectada en el sitio biológico seleccionado por medios de centellografía.

30

35

[0015] Se describe la provisión de una composición radiofarmacéutica que comprende un péptido radiomarcado o análogo o derivado del mismo que retiene su aminoácido carboxi-terminal en su forma de ácido carboxílico; la provisión de una composición radiofarmacéutica para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas que proporciona un aclaramiento hepático y sanguíneo mejorado cuando se compara con composiciones similares que poseen un aminoácido carboxi-terminal modificado; la provisión de una composición radiofarmacéutica que permite una visualización más rápida del tumor en las aplicaciones diagnósticas que las composiciones similares que poseen un aminoácido carboxi-terminal modificado; la provisión de una composición radiofarmacéutica que exhibe mayor captación y retención en el tumor que las composiciones similares que tienen un aminoácido carboxi-terminal modificado; y la provisión de un método para dirigir un péptido radiomarcado de la presente invención a un sitio biológico o tejido seleccionado para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas.

40

Descripción detallada

45

50

55

[0016] Se ha descubierto que la eficacia de un péptido radiomarcado para dirigirlo a un sitio biológico seleccionado para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas se mejora en forma significativa mediante la retención del aminoácido carboxi-terminal del péptido en su forma de ácido carboxílico. Sorprendentemente, un péptido radiomarcado de la presente invención que tiene un aminoácido carboxi-terminal no modificado presenta propiedades in vivo mejoradas cuando se compara con los péptidos radiomarcados correspondientes que se han modificado específicamente para eliminar el ácido carboxílico en el aminoácido carboxi-terminal. En particular, los péptidos radiomarcados de la presente invención presentan un aclaramiento sanguíneo y hepático mejorado así como una captación en el sitio biológico y tiempo de retención mejorados. Por lo tanto, se describe una composición radiofarmacéutica para dirigir a un sitio biológico seleccionado que comprende un péptido radiomarcado seleccionado del grupo consistente de somatostatina, péptido vasointestinal (VIP), polipéptido activador de la adenilata ciclase de la pituitaria (PACAP), Sustancia P, encefalinas, neurocininas y análogos o derivados de cualquiera de las anteriores así como péptidos capaces de enlazar con el receptor correspondiente de cualquiera de los péptidos anteriores en donde el péptido radiomarcado tiene su aminoácido terminal carboxi en su forma de ácido carboxílico y el péptido está acoplado a un radionucleido de diagnóstico o terapéutico por un agente quelante.

60

65

[0017] Los péptidos utilizados en conjunción con la presente invención pueden obtenerse mediante protocolos conocidos de aislamiento y purificación a partir de fuentes naturales, pueden sintetizarse por métodos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida o solución de acuerdo con la secuencia peptídica conocida del péptido, o pueden obtenerse a partir de preparaciones disponibles en el comercio. Incluidos en la presente están péptidos que muestran las propiedades de enlace biológicas del péptido nativo y conservan las características de enlace específicas del péptido nativo. Los derivados y análogos del péptido, como se usan en la presente, incluyen modificaciones en la composición, identidad y derivatización de los aminoácidos individuales del péptido siempre que el péptido conserve las propiedades de enlace específicas del péptido nativo. Ejemplos de dichas modificaciones incluirían, modificación de cualquiera de los aminoácidos para incluir el D-estereoisómero, sustitución en la cadena

lateral aromática de un aminoácido aromático, derivatización de los grupos amino o carboxilo en las cadenas laterales de un aminoácido que contiene dicho grupo en una cadena lateral, sustituciones en el término amino o carboxi del péptido, vínculo del péptido a un segundo péptido o fracción biológicamente activa, y ciclización del péptido. (G. Van bist y D. Tourwe, Peptide Research, 5, 8 (1992)). En una realización preferida el péptido usado para preparar la composición radiofarmacéutica es somatostatina, derivados de la somatostatina, análogos de la somatostatina o péptidos que enlazan con el receptor de la somatostatina en donde el aminoácido terminal carboxi están en su forma de ácido carboxílico. Más preferiblemente, el péptido es D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH (péptido 1) o D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH (péptido 2).

[0018] El péptido seleccionado para el uso en el radiofarmacéutico está radiomarcado acoplado un agente quelante al péptido. El agente quelante es capaz de unir en forma covalente un radionucleido seleccionado al mismo. El agente quelante y el radionucleido se acoplan al péptido y al agente quelante, respectivamente, de una manera que no interfiere ni afecta desfavorablemente las propiedades de unión o especificidad del péptido. El uso de diversos agentes quelantes para radiomarcarse péptidos es bien conocido en la técnica. Los agentes quelantes apropiados generalmente incluyen aquellos que contienen un ligando tetradentado con al menos un grupo azufrado disponible para unirse al radionucleido metálico tales como los ligandos conocidos N3S y N2S2. Más particularmente, los grupos quelantes que pueden utilizarse en conjunción con los péptidos de la presente invención incluyen 2,3- bis(mercaptoacetamido) propanoato (Patente Estadounidense nº 4.444.690), S-benzoilmercaptoacetilglicilglicina (Patente Estadounidense nº 4.861.869), dianhídridos dicíclicos tales como DTPA y EDTA y derivados de los mismos (Patente Estadounidense nº 4.479.930), los quelatos NS que contienen grupos amino para mejorar la cinética de quelación (Patente Estadounidense nº 5.310.536), quelatos N2S2 conforme a lo descrito en la Patente Estadounidense nº 4.965.392, quelatos N3S conforme a lo descrito en la Patente Estadounidense nº 5.120.526, y los quelatos N2S2 que contienen conectores escindibles conforme a lo descrito en la Patente Estadounidense nº 5.175.257. El agente quelante se acopla al péptido por una metodología estándar conocida en el campo de la invención y puede añadirse en cualquier ubicación sobre el péptido siempre que la actividad biológica del péptido no se vea afectada desfavorablemente. Preferentemente, el grupo quelante se acopla covalentemente al aminoácido amino-terminal del péptido. El grupo quelante puede unirse convenientemente al péptido durante la síntesis del péptido en fase sólida o puede añadirse mediante química en fase solución después de obtenido el péptido. Los grupos quelantes preferidos incluyen DTPA, carboximetil DTPA, ligandos tetradentados que contienen una combinación de átomos de N y S dadores o átomos de N dadores.

[0019] Puede utilizarse cualquier radionucleido que posea valor diagnóstico o terapéutico como marcador radioactivo para los péptidos de la presente invención. En una realización preferida, el radionucleido es un radionucleido -emisor o _-emisor seleccionado de las series de elementos lantánidos o actínidos. También pueden utilizarse radionucleidos emisores de positrones, por ejemplo 68Ga.

[0020] Los radionucleidos γ -emisores apropiados incluyen aquellos que son útiles en las aplicaciones de diagnóstico por imágenes. Los radionucleidos γ -emisores con preferencia tienen una semiduración de 1 hora a 40 días, con preferencia de 12 horas a 3 días. Los ejemplos de radionucleidos γ -emisores apropiados incluyen 67Ga, 111In, 99mTc, 169Yb y 186Re. Por sobre todo, se prefiere el radionucleido 99mTc.

[0021] Los radionucleidos β -emisores apropiados incluyen aquellos que son útiles en las aplicaciones terapéuticas. Los ejemplos incluyen 90Y, 67Cu, 186Re, 188Re, 169Er, 121In, 127Te, 143Pr, 198Au, 109Pd, 165Dy, 32P, 142Pr y 153Sm. El radionucleido β -emisor con preferencia tiene una vida media de 2 horas a dos semanas, y con mayor preferencia de aproximadamente 2 horas a 100 horas.

[0022] Los conjugados péptido/quelato de la invención se marcan haciendo reaccionar el conjugado con el radionucleido seleccionado, por ejemplo una sal metálica, preferentemente soluble en agua. La reacción se realiza por métodos conocidos en la técnica, con preferencia utilizando un agente reductor (por ejemplo, cloruro estannoso) y un agente de transferencia (por ejemplo, tartrato, gluconato, citrato o manitol) conforme a lo descrito en los Ejemplos 4 y 5 más abajo.

[0023] Los conjugados péptido/quelato radiomarcados de la invención y sus sales aceptables para uso farmacéutico son útiles como agente para diagnóstico por imágenes o en aplicaciones terapéuticas. El conjugado péptido/quelato radiomarcado se prepara en un vehículo aceptable para uso farmacéutico, por ejemplo solución salina o plasma sanguíneo, y se administra a un individuo en una cantidad efectiva para uso terapéutico o diagnóstico conforme a lo determinado por el uso de métodos estándar conocidos por aquellos expertos en la técnica. El vehículo también puede contener materiales auxiliares aceptables para uso farmacéutico tales como sales, buffers, conservantes y similares. Preferentemente, la composición radiofarmacéutica se proporciona en un kit por el que el radionucleido se proporciona en un vial y el conjugado del grupo péptido/quelante se proporciona en un segundo vial y los contenidos se mezclan justo antes de la administración. La mezcla puede calentarse de ser necesario para obtener un marcado completo. La provisión de tales complejos radiomarcados en forma de kit y la preparación del producto radiomarcado final son estándar y rutinarios en el campo de la medicina nuclear. El producto radiofarmacéutico final debe ser de alta pureza radioquímica, con preferencia mayor que 95%, y al menos mayor que 90%, conforme a lo determinado por los protocolos estándar conocidos en la técnica.

[0024] El complejo radiomarcado se prepara para administrar una dosis radioactiva de entre aproximadamente 0,05 mCi y aproximadamente 40 mCi, con preferencia aproximadamente 1mCi a aproximadamente 20 mCi, al individuo de acuerdo con las determinaciones estándar de dosis de productos radiofarmacéuticos. Según se utiliza en la presente, “una cantidad efectiva para uso diagnóstico” significa una cantidad del radiofármaco suficiente para permitir su detección mediante los medios gammagráficos y “una cantidad efectiva para uso terapéutico” significa una cantidad suficiente para realizar un tratamiento terapéutico en el sitio biológico buscado. Los péptidos radiomarcados pueden administrarse por vía intravenosa en cualquier medio convencional para inyección intravenosa. La detección por imágenes del sitio biológico puede realizarse dentro de aproximadamente los 2-5 minutos posteriores a la inyección, pero también puede realizarse varias horas después de la inyección. Puede utilizarse cualquier método convencional de detección por imágenes con fines diagnósticos.

[0025] Los siguientes ejemplos describen realizaciones preferidas de la invención. Otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones de la presente serán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva o práctica de la invención divulgada en la presente.

Ejemplo 1

[0026] El presente ejemplo describe la síntesis de un conjugado péptido/grupo quelante de la presente invención donde el aminoácido carboxi-terminal retiene su grupo ácido carboxílico.

[0027] Se sintetizó un conjugado péptido/grupo quelante compuesto por D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH como péptido (péptido 1) y DTPA como grupo quelante unido al extremo amino-terminal de la secuencia del péptido 1 en una escala 0,2-0,3 mmol usando un sintetizador de Péptidos Modelo 431A de Applied Biosystems. Se utilizó resina SASRIN cargada con Fmoc-O-t-butil treonina (0,3-0,4 mmol/g de la resina)(Bachem Biosciences). Después de la sucesiva condensación con los aminoácidos, el grupo protector Fmoc N-terminal se eliminó de acuerdo con los protocolos generales del sintetizador. La síntesis en fase sólida se continuó con 1,1,4-Tris(t-butiloxycarbonilmetil)-7,7-bis(carboximetil)-1,4,7-triazaheptano. Una vez que la síntesis se completó, el producto, el DTPA-péptido producto de mono-adición, se desdobló utilizando una solución de ácido trifluoroacético:agua:anisol:triisopropilsilano durante 1-6 horas a temperatura ambiente. El producto se precipitó con éter y se purificó mediante cromatografía de C-18 en fase reversa. La ruptura, desprotección y purificación por CL produjeron un mono-DTPA-péptido 1 de alta pureza, m/e 1409 (M + 1).

Ejemplo 2

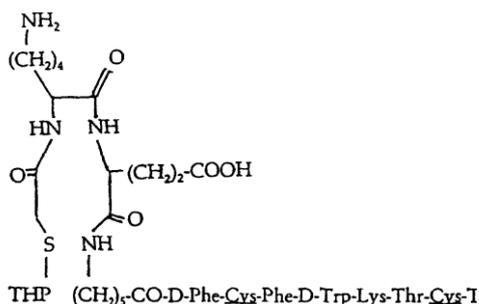
[0028] Este ejemplo ilustra la síntesis de un conjugado péptido/grupo quelante que posee su aminoácido carboxi-terminal en su forma de ácido carboxílico que es útil con respecto a la presente invención.

[0029] El DTPA-péptido 2 se sintetizó conforme al procedimiento expuesto en el Ejemplo 1 sólo que el péptido sintetizado fue el péptido 2. La ruptura, desprotección y purificación por CL produjeron un mono-DTPA-péptido 2 de alta pureza, m/e 1425 (M + 1).

Ejemplo 3

[0030] Este ejemplo ilustra la síntesis de un conjugado péptido/grupo quelante que posee su aminoácido carboxi-terminal en su forma de ácido carboxílico que es útil con respecto a la presente invención.

[0031] Se sintetizó un conjugado péptido/grupo quelante constituido por el péptido 1 como péptido y un ligando N3S (como se muestra más abajo) como grupo quelante unido al extremo amino-terminal del péptido 1 mediante una combinación de métodos en fase sólida-solución. El H-Lys("Troc)-Glu-Aha-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys("Troc)-Thr-Cys-Thr-OH (péptido 3) se sintetizó a partir de resina SASRIN cargada con Fmoc-O-t-butil treonina (0,3-0,4 mmol/g de la resina) (Bachem Biosciences) conforme al procedimiento general descrito en el Ejemplo 1 anterior. El compuesto se caracterizó por su espectro de masa, m/e 1752 (M + 1). A una solución del péptido 3 anterior en dimetilformamida que contenía trietilamina (10 ml de DMF/mmol del péptido y 1 ml de trietilamina/mmol del péptido), se añadió succinimidato éster del ácido S-tetrahidropiraniil-mercaptoacético y la solución se agitó a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó y el producto se aisló mediante cromatografía instantánea de C-18. El producto de esta etapa (THP-S-MA-Lys("Troc)-Glu-Aha-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys("Troc)-Thr-Cys-Thr-OH) se agitó con polvo de Zn/THF/agua para eliminar los grupos protectores Troc para dar el producto final:



Ejemplo 4

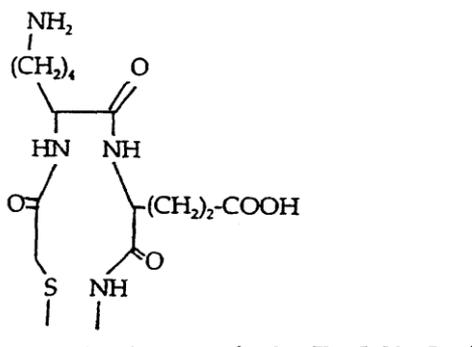
[0032] Este ejemplo ilustra la síntesis de un conjugado péptido/grupo quelante que posee su aminoácido carboxi-terminal en su forma de ácido carboxílico que es útil con respecto a la presente invención.

5

[0033] Se sintetizó un conjugado péptido/grupo quelante compuesto por el péptido 2 como péptido y un ligando N_3S (como se muestra más abajo) como grupo quelante unido al extremo amino-terminal del péptido 2 por un método combinado en fase sólida-solución. El H-Lys($^{\text{t}}$ -Troc)-Glu-Aha-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys($^{\text{t}}$ -Troc)-Thr-Cys-Thr-OH (péptido 4) se sintetizó a partir de resina SASRIN cargada con Fmoc-O-t-butil treonina (0,3-0,4 mmol/g de la resina) (Bachem Biosciences) conforme al procedimiento general descrito en el Ejemplo 1 anterior. El compuesto se caracterizó por su espectro de masa, m/e 1752 (M + 1). A una solución del péptido 4 anterior en dimetilformamida que contenía trietilamina (10 ml de DMF/mmol del péptido y 1 ml de trietilamina/mmol del péptido), se añadió succinimidato éster del ácido S-tetrahidropiranyl-mercaptoacético y la solución se agitó a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó y el producto se aisló mediante cromatografía instantánea de C-18. El producto de esta etapa (THP-S-MALys($^{\text{t}}$ -Troc)-Glu-Aha-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys($^{\text{t}}$ -Troc)-Thr-Cys-Thr-OH) se agitó con polvo de Zn/THF/agua para eliminar los grupos protectores Troc para dar el producto final:

10

15



Ejemplo 5

[0034] Este ejemplo describe el radiomarcado de los conjugados DTPA-péptido 1 y DTPA-péptido 2/grupo quelante producidos en los Ejemplos 1 y 2 anteriores, respectivamente.

20

[0035] Cinco microgramos de DTPA-péptido 1 o DTPA-péptido 2 se disolvieron en agua que contenía 0,05 N HCl y que también contenía 0,624 mg de acetato de sodio y 0,440 mg de ácido ascórbico. Se añadieron tres mCi de In-111, como cloruro de indio. El marcado se realizó a temperatura ambiente y se completó dentro de los 15 minutos. El volumen de reacción final fue 200 μl y el pH fue 4. El rendimiento de péptido radiomarcado 1 o 2 fue >98% y la pureza también fue >98%.

25

Ejemplo 6

[0036] Este ejemplo describe el marcado con Tc-99m del conjugado N3S-péptido 1/grupo quelante descrito en el Ejemplo 3.

30

[0037] El marcado con Tc-99m se realizó utilizando un kit Merck-Frosst disponible en el comercio. Los componentes del kit se disolvieron en 1 ml de agua. En una ampolla separada que contenía 1 ml de pertecneiato, 30 mCi, proveniente de un generador disponible en el comercio, se añadieron 100 μl de la solución del kit Merck -

35

Frosst y se dejó la solución en reposo durante 15 minutos. A esta solución, se añadieron 100µg del producto N3S - péptido 1 y la solución se calentó a 100°C durante 15-20 minutos. La solución estaba lista para la administración después del filtrado a través de un filtro estéril.

5 Ejemplo 7

10 **[0038]** Este ejemplo ilustra las propiedades mejoradas de un péptido radiomarcado de la presente invención que retiene su ácido carboxílico del aminoácido C-terminal en comparación con un agente para obtención de imágenes neuroendócrinas marcado con In-111 comercial provisto por Mallinckrodt Medical, Inc. con la marca comercial Octreoscan®.

15 **[0039]** A ratas macho Lewis se aplicaron implantes con material tumoral CA20948 en la zona del flanco izquierdo aproximadamente 14-18 días antes de la inyección del/de los compuesto(s) radiomarcado(s) para establecer una masa tumoral viable que expresara receptores de somatostatina. El día del estudio las ratas (n=3/grupo) reciben una dosis intravenosa del/de los complejo(s) de In-111, la actividad específica de la preparación era de aproximadamente 2800 Ci/mmol., y los animales se sacrificaron 1, 4 y 24 horas después de la inyección. Se extirparon los siguientes órganos/tejidos y se cuantificó la captación del trazador radioactivo: sangre, hígado, bazo, corazón, músculo, riñones, intestino delgado, estómago, tiroides, hueso (fémur), glándulas suprarrenales, páncreas y tumor. A las 24 horas, las heces y orina también fueron recolectadas y se hizo recuento radioactivo para determinar las vías de excreción y patrones globales de depuración del/de los complejo(s). Además, se inyectaron dos ratas para estudios de metabolismo para evaluar la estabilidad in vivo del complejo, y se inyectaron otras dos ratas para la visualización de los animales mediante gammagrafía gamma. Los tejidos se analizaron para medir el % de dosis inyectada (%DI) y el % de DI/gramo de tejido para determinar la biodistribución global del/de los complejo(s). A partir de estos valores se evaluaron las relaciones entre los valores tejido blanco: tejido no blanco, los cuales se calcularon para determinar la eficacia de la composición de prueba relativa a los controles. Los resultados se muestran en la Tabla 1 más abajo.

30

35

40

45

50

55

60

65

Tiempo: 1 hora			
Órgano	¹¹¹ In-DTPA-péptido 1	¹¹¹ In-DTPA-péptido 2	Octreoscan®
Sangre	0,115 (±0,004)	0,062 (±0,002)	0,154 (±0,004)
Hígado	0,187 (±0,011)	0,042 (±0,002)	0,12 (±0,019)
Riñón	2,747 (±0,219)	2,366 (±0,175)	2,15 (±0,303)
Tumor	2,004 (±0,121)	2,689 (±0,1)	0,57 (±0,10)
Páncreas	2,788 (±0,156)	6,776 (±0,6)	0,57 (±0,106)
TU/BL	17	43	6
Tiempo: 4 horas			
Órgano	¹¹¹ In-DTPA-péptido 1	¹¹¹ In-DTPA-péptido 2	Octreoscan®
Sangre	0,023 (±0,004)	0,010 (±0,002)	0,035 (±0,004)
Hígado	0,139 (±0,011)	0,028 (±0,002)	0,9 (±0,019)
Riñón	3,664 (±0,219)	2,275 (±0,175)	2,06 (±0,303)
Tumor	1,744 (±0,121)	2,271 (±0,5)	0,76 (±0,03)
Páncreas	2,312 (±0,156)	5,755 (±0,6)	0,79 (±0,02)
TU/BL	76	227	59
Tiempo: 24 horas			
Órgano	¹¹¹ In-DTPA-péptido 1	¹¹¹ In-DTPA-péptido 2	Octreoscan®
Sangre	0,009 (±0,004)	0,008 (±0,002)	0,004 (±0,001)
Hígado	0,107 (±0,011)	0,021 (±0,002)	0,029 (±0,008)
Riñón	2,384 (±0,059)	2,371 (±0,201)	1,75 (±0,011)
Tumor	1,074 (±0,058)	1,492 (±0,5)	0,33 (±0,03)
Páncreas	1,312 (±0,081)	2,659 (±0,6)	0,43 (±0,02)
TU/BL	119	187	59
*Los números entre paréntesis = desviaciones típicas			

5 **[0040]** Estos resultados ilustran la captación tumoral incrementada y el tiempo de retención de un péptido radiomarcado que tiene su aminoácido carboxi-terminal en su forma de ácido carboxílico en comparación con un péptido radiomarcado comercial específico para el mismo receptor tumoral y asimismo indican una depuración más rápida de la sangre. Con respecto a los estudios de metabolismo, las muestras de orina se analizaron mediante HPLC de fase reversa y los resultados mostraron que los complejos se excretaron sin ninguna descomposición significativa.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado péptido/quelato, que comprende un péptido que tiene la fórmula:

5 D-Phe-Cys-XXX-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH,

en donde XXX representa Phe o Tyr, y -OH indica que el aminoácido terminal carboxi está en su forma de ácido carboxílico.
y un agente quelante acoplado al péptido.

10 2. El conjugado péptido/quelato de la reivindicación 1, en donde XXX es Phe.
3. El conjugado péptido/quelato de la reivindicación 1, en donde XXX es Tyr.
15 4. El conjugado péptido/quelato de la reivindicación 1, en donde el agente quelante comprende un ligando tetradentado con al menos un grupo azufrado disponible para enlazar un radionucleido metálico.

5. El conjugado péptido/quelato de la reivindicación 1, en donde el agente quelante es seleccionado del grupo que consiste de DTPA, carboximetil DTPA, EDTA, un ligando tetradentado que contiene una combinación de átomos donantes de N y S, y un ligando tetradentado que contiene átomos sonantes de N.

20 6. Un método para hacer un conjugado péptido/quelato que comprende acoplar un agente quelante a un péptido que tiene la fórmula:

25 D-Phe-Cys-XXX-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH,

en donde XXX representa Phe o Tyr, y -OH indica que el aminoácido terminal carboxi es un su forma de ácido carboxílico, en donde el agente quelante está unido al péptido durante la síntesis del péptido en la fase solida o añadido por química en la fase de solución después de que se ha obtenido el péptido.

30 7. Un método de hacer una composición radiofarmacéutica, que comprende radiomarcarse un conjugado péptido/quelato reaccionando el conjugado péptido/quelato con un radionucleido, en donde el conjugado péptido/quelato comprende un péptido acoplado a un agente quelante, el péptido teniendo la fórmula:

35 D-Phe-Cys-XXX-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH,

en donde XXX representa Phe o Tyr, y -OH indica que el aminoácido terminal carboxi está en su forma de ácido carboxílico.

40 8. El método de la reivindicación 6 ó 7 en el que XXX es Phe.
9. El método de la reivindicación 6 ó 7 en el que XXX es Tyr.

45 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el agente quelante comprende un ligando tetradentado con al menos un grupo azufrado disponible para enlazar con un radionucleido metálico.

50 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el agente quelante es seleccionado del grupo consistente de DTPA, carboximetil DTPA, EDTA, un ligando tetradentado que contiene una combinación de átomos sonantes de N y S, y un ligando tetradentado que contiene átomos donantes de N.