

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 423**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2003 E 10179508 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2260875**

54 Título: **Agentes de formación de imágenes dirigidos al receptor de folato**

30 Prioridad:

06.05.2002 US 378571 P

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

01.07.2014

73 Titular/es:

**ENDOCYTE, INC. (100.0%)
3000 Kent Avenue
West Lafayette, IN 47906, US**

72 Inventor/es:

**PARKER, MATTHEW A y
LEAMON, CHRISTOPHER PAUL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 472 423 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes de formación de imágenes dirigidos al receptor de folato.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a compuestos y a procedimientos para dirigir a un agente de formación de imágenes a células de un animal. Más particularmente, los agentes de formación de imágenes a base de radionúclidos se dirigen a células que tienen receptores para una vitamina usando dicha vitamina, o un derivado de unión a los receptores de la vitamina o un análogo del mismo, como el ligando de direccionamiento para el agente de formación de imágenes.

Antecedentes y resumen de la invención

10 El transporte transmembrana es una función celular fundamental. Puesto que los médicos han reconocido la importancia del transporte transmembrana para muchos campos de las ciencias biológicas y médicas, incluyendo la terapia farmacológica y la transferencia génica, se han realizado esfuerzos de investigación significativos dirigidos a la comprensión y la aplicación de dichos procedimientos. Así pues, por ejemplo, se ha intentado la administración transmembrana de ácidos nucleicos a través del uso de vehículos de proteínas, vehículos de anticuerpos, sistemas de administración liposómicos, electroporación, inyección directa, fusión celular, vehículos virales, choque osmótico y transformación mediada por calcio-fosfato. Sin embargo, muchas de estas técnicas están limitadas tanto por los tipos de células en los que se produce el transporte transmembrana como por las condiciones necesarias para que se produzca un transporte transmembrana satisfactorio de moléculas exógenas. Además, muchas de estas técnicas están limitadas por el tipo y el tamaño de la molécula exógena que puede transportarse a través de la membrana celular sin pérdida de bioactividad.

25 Un mecanismo para el transporte transmembrana de las moléculas exógenas que tiene una amplia aplicabilidad es la endocitosis mediada por un receptor. Ventajosamente, la endocitosis mediada por un receptor se produce tanto *in vivo* como *in vitro*. La endocitosis mediada por un receptor implica el movimiento de ligandos unidos a receptores de la membrana hacia el interior de una zona limitada por la membrana a través de la invaginación de la membrana. El procedimiento se inicia o activa mediante la unión de un ligando específico del receptor con el receptor. Se han caracterizado muchos sistemas endocitóticos mediados por receptores, incluyendo aquellos que generan la internalización de galactosa, manosa, manosa-6-fosfato, transferrina, asialoglucoproteína, folato, transcobalamina (vitamina B₁₂), α -2-macroglobulinas, insulina y otros factores de crecimiento peptídicos, tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF).

30 La endocitosis mediada por un receptor se ha usado para administrar moléculas exógenas, tales como proteínas y ácidos nucleicos a células. Generalmente, un ligando específico se conjuga químicamente mediante unión covalente, iónica o de hidrógeno a una molécula exógena de interés, formando una molécula conjugada que tiene un resto (la parte de ligando) que todavía es reconocido en el conjugado por un receptor diana. Usando esta técnica, se ha conjugado la proteína fototóxica psoraleno con insulina, y se ha internalizado mediante la ruta endocitótica del receptor de insulina (Gasparro, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 141 (2) pág. 502-509, 15 de diciembre de 1986); se ha usado el receptor específico de los hepatocitos para asialoglucoproteínas de galactosa terminales para la administración transmembrana específica de los hepatocitos de asialoorosomucoide-poli-lisina formando un complejo no covalentemente con un plásmido (Wu, G. Y., *J. Biol. Chem.*, 262 (10), pág. 4429-4432, 1987); se ha usado el receptor celular para EGF para administrar polinucleótidos unidos covalentemente a EGF al interior de la célula (Myers, solicitud de patente europea 86810614.7, publicada el 6 de junio de 1988); se ha usado el receptor celular ubicado en el intestino para el complejo organometálico de vitamina B₁₂-factor intrínseco para mediar en la administración de un fármaco, una hormona, un péptido bioactivo y un inmunógeno que forme un complejo con vitamina B₁₂ al sistema circulatorio tras la administración oral (Russell-Jones *et al.*, solicitud de patente europea 86307849.9, publicada el 29 de abril de 1987); se ha usado el receptor de manosa-6-fosfato para administrar lipoproteínas de baja densidad a células (Murray, G. J. y Neville, D. M., Jr., *J. Biol. Chem.*, vol. 255 (24), pág. 1194-11948, 1980); se ha usado el receptor de la subunidad de unión a la toxina del cólera para administrar insulina a células carentes de receptores de insulina (Roth y Maddox, *J. Coll. Phys.* vol. 115, pág. 151, 1983); y se ha empleado el receptor de gonadotropina coriónica humana para administrar una cadena a de ricina acoplada a GCH a células con el receptor de GCH apropiado (Oeltmann y Heath, *J. Biol. Chem.*, vol. 254, pág. 1028 (1979)).

50 En una realización, la presente invención implica el transporte transmembrana de un agente de formación de imágenes a base de radionúclido a través de una membrana que tiene receptores para el folato. Se pone en contacto una membrana celular que porta receptores para el folato con un conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes durante un tiempo suficiente para iniciar y permitir el transporte transmembrana del conjugado, y se monitoriza la biodistribución del conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes en el animal. En otra realización, el resto de folato simplemente se une a un receptor de la vitamina de la superficie celular para concentrar el radionúclido quelado sobre la superficie celular.

La invención aprovecha (1) la ubicación de los receptores de la vitamina y (2) los procesos endocíticos mediados por receptores asociados. Por ejemplo, la invención aprovecha la expresión única, sobreexpresión o expresión de

preferencia de receptores de vitamina, transportadores u otras proteínas presentes en la superficie que se unen específicamente a vitaminas, o derivados o análogos de las mismas, en células tumorales u otros tipos celulares que sobreexpresan dichos receptores. Por consiguiente, la invención se puede usar para detectar células, tales como células tumorales u otros tipos de células, que sobreexpresan los receptores de vitamina, o los receptores de derivados o análogos de vitamina, aprovechando los procesos endocíticos mediados por receptores que se producen cuando dichas células se ponen en contacto con el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes.

Los receptores de vitaminas, tales como el receptor de folato (RF) de alta afinidad, se expresan a niveles altos, por ejemplo, en células cancerosas. Se ha publicado que todos los cánceres epiteliales de ovario, glándula mamaria, colon, pulmón, nariz, garganta y cerebro expresan niveles elevados del RF. De hecho, se sabe que más del 90 % de todos los tumores de ovario humanos expresan grandes cantidades de este receptor. Por lo tanto, la presente invención se puede usar para la formación de imágenes de diagnóstico de una variedad de tipos de tumores y de otros tipos de células implicados en estados patológicos.

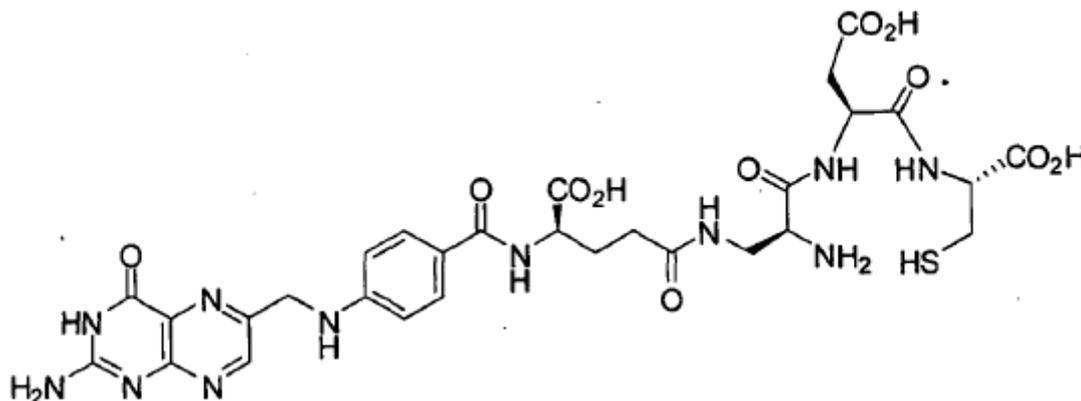
Se han usado quelantes de radionúclidos que forman complejos con ligandos como sondas no invasivas con el fin de formar imágenes de diagnóstico. Por ejemplo, se han usado péptido intestinal vasoactivo, análogos de somatostatina y anticuerpos monoclonales como ligandos para localizar radionúclidos para células, tales como células tumorales. Los anticuerpos monoclonales, y diversos fragmentos de los mismos, recibieron inicialmente la mayor atención, porque se creía que era posible conseguir la dirección específica a un tumor precisa usando anticuerpos monoclonales como ligandos de direccionamiento. Desafortunadamente, este enfoque fue problemático porque i) los anticuerpos tienen tiempos de circulación prolongados debido a su gran tamaño, lo que es desfavorable a efectos de la formación de imágenes; ii) los anticuerpos son costosos de producir; iii) los anticuerpos pueden ser inmunógenos, y por consiguiente, se deben humanizar cuando se usan múltiples dosis; y iv) las proporciones del tumor con respecto al tejido no diana (T/NT) de los radionúclidos ligados a anticuerpos son subóptimas. Por lo tanto, el centro de atención se ha dirigido recientemente hacia el uso de ligandos con especificidad tumoral más pequeños, que no tienen dichas limitaciones.

Se han usado vitaminas, tales como el ácido fólico, para dirigir agentes de formación de imágenes a células tumorales, y son ventajosas debido a su pequeño tamaño. El primer complejo dirigido a base de ácido fólico descrito para la formación de imágenes de tumores *in vivo* fue un derivado de histamina que contenía ¹²⁵I yodo. Este complejo no se consideró un candidato clínico relevante debido al componente de radionúclido ¹²⁵I de larga vida. Posteriormente, se desarrolló un conjugado de deferoxamina-folato para la formación de imágenes de tumores (la deferoxamina quela ⁶⁷Ga, un radionúclido que emite radiación gamma que tiene una semivida de 78 horas). Se observó aclaramiento hepático con este conjugado y, por lo tanto, se detuvo el desarrollo preclínico debido a problemas anticipados en la formación de imágenes de manera precisa de ubicaciones de la región abdominal. Sin embargo, este obstáculo se superó sustituyendo el quelante de deferoxamina con el ácido dietilentriamino-pentaacético (DTPA), un quelante eficaz de ¹¹¹In (semivida de 68 horas). Se confirmó que la vía principal de eliminación de ¹¹¹In-DTPA-folato era a través de los riñones.

Más recientemente, se ha adoptado ^{99m}Tc como el radionúclido preferido para la formación de imágenes, porque i) el radionúclido se obtiene fácilmente de generadores de ⁹⁹Mo-^{99m}Tc disponibles en el mercado; ii) el coste de producción de grandes cantidades de ^{99m}Tc es insignificante en comparación con el coste de producción de ¹¹¹In; y iii) ^{99m}Tc tiene una semivida mucho más corta (6 horas), lo que permite que se administren mayores dosis de radionúclido, produciendo imágenes con mayor resolución sin el riesgo de exponer órganos vitales a radiación peligrosa.

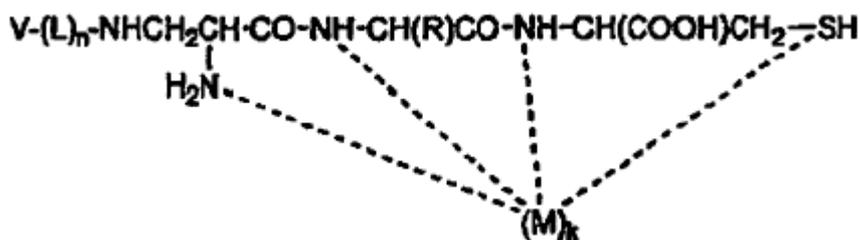
Se han desarrollado varios conjugados de ^{99m}Tc a base de folato. Por ejemplo, los conjugados de folato de ^{99m}Tc-6-hidrazinonicotinamido-hidrazido (HYNIC; Guo, *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 40 (9): 1563-1569 (1999)), ^{99m}Tc-12-amino-3,3,9,9-tetrametil-5-oxa-4,8-diaza-2,10-dodecanodiona-dioxima (OXA) (Linder, *et al.*, *Soc. Nucl. Med., Proc. XLVII Encuentro Anual*, 2000, 41 (5): 119P), ^{99m}Tc-etilendicisteína (Ilgan, *et al.*, *Cancer Biother. & Radiopharm.*, 13 (6): 427-435 (1998)) y ^{99m}Tc-DTPA-folato (Mathias, *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 11 (2): 253-257 (2000)) han mostrado cualidades prometedoras de captación en tumores *in vivo*. Sin embargo, se necesitan conjugados de ^{99m}Tc a base de vitaminas alternativos, o conjugados a base de vitaminas que empleen otros radionúclidos, que presenten proporciones de tumor con respecto al tejido no diana (T/NT) óptimas y se eliminen a través de los riñones. Dichos conjugados a base de vitaminas deben ser adecuados para un desarrollo clínico como agentes de formación de imágenes de tumores y para el diagnóstico de otros estados patológicos.

La invención se refiere a un procedimiento para la formación de imágenes de una población de células tumorales en un animal que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula:



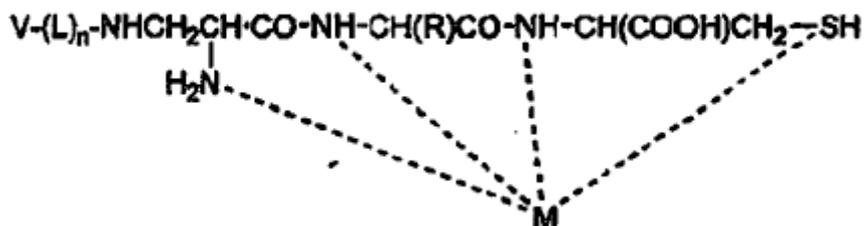
quelado a un catión de un radionúclido.

En una divulgación, se proporciona un compuesto de fórmula:



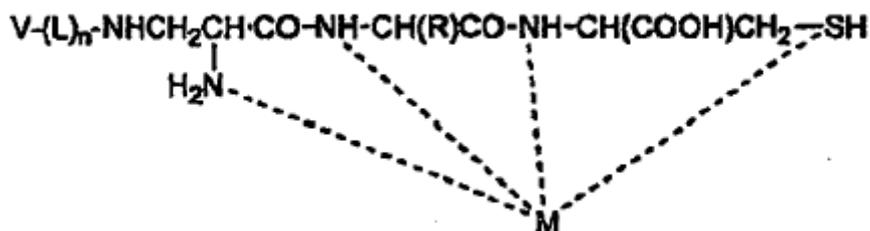
- 5 en la que V es una vitamina, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo, L es un engarce divalente, R es una cadena lateral de un aminoácido de fórmula $H_2NCHR\text{COOH}$, M es un catión de un radionúclido, n es 1 o 0; y k es 1 o 0. La vitamina es un sustrato para el transporte transmembrana mediado por el receptor *in vivo*.

- 10 En otra divulgación, se proporciona una composición para la formación de imágenes de diagnóstico que comprende un compuesto de fórmula:



- 15 en la que V es una vitamina, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo, L es un engarce divalente, R es una cadena lateral de un aminoácido de fórmula $H_2NCHR\text{COOH}$, M es un catión de un radionúclido, n es 1 o 0, y un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo. La vitamina es un sustrato para el transporte transmembrana mediado por el receptor *in vivo*.

En otra divulgación más, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de una población de células en un animal, en el que las células se caracterizan por un receptor de vitamina en la superficie de las mismas. El procedimiento comprende las etapas de administrar al animal una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula:



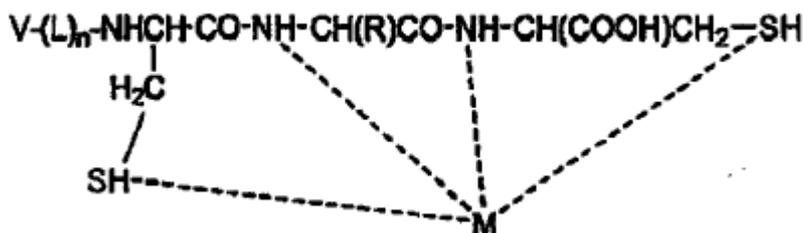
5 en la que V es una vitamina, o un derivado de unión al receptor o un análogo del mismo, específica del receptor de vitamina de la superficie celular, L es un engarce divalente, R es una cadena lateral de un aminoácido de fórmula $H_2NCHR\text{COOH}$, M es un catión de un radionúclido, n es 1 o 0, y un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo, y monitorizar la biodistribución del compuesto en el animal.

En otra divulgación, se proporciona un compuesto de fórmula:



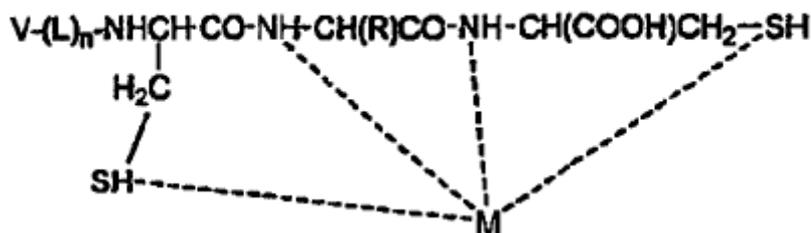
10 en la que V es una vitamina que es un sustrato para el transporte transmembrana mediado por el receptor *in vivo*, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo, L es un engarce divalente, R es una cadena lateral de un aminoácido de fórmula $H_2NCHR\text{COOH}$, M es un catión de un radionúclido, n es 1 o 0 y k es 1 o 0.

En otra divulgación más, se proporciona una composición para la formación de imágenes de diagnóstico que comprende un compuesto de fórmula:



15 en la que V es una vitamina que es un sustrato para el transporte transmembrana mediado por el receptor *in vivo*, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo, L es un engarce divalente, R es una cadena lateral de un aminoácido de fórmula $H_2NCHR\text{COOH}$, M es un catión de un radionúclido, n es 1 o 0, y un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En otra divulgación más, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de una población de células en un animal, en el que las células se caracterizan por un receptor de vitamina en la superficie de las mismas. El procedimiento comprende las etapas de administrar al animal una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula:



en la que V es la vitamina, o un derivado de unión al receptor o un análogo del mismo, específica para el receptor de vitamina de la superficie celular, L es un engarce divalente, R es una cadena lateral de un aminoácido de fórmula $H_2NCHRCOOH$, M es un catión de un radionúclido, n es 1 o 0, y un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo, y monitorizar la biodistribución del compuesto en el animal.

En cualquiera de estas divulgaciones, V del compuesto puede ser, por ejemplo, una vitamina seleccionada del grupo que consiste en folato, riboflavina, tiamina, vitamina B_{12} y biotina, o un derivado o análogo de las mismas. En cualquiera de estos aspectos o divulgaciones, el radionúclido del compuesto se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en radioisótopos de galio, indio, cobre, tecnecio y renio.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estructura de EC20, un compuesto a modo de ejemplo usado como agente de formación de imágenes de acuerdo con la invención.

Figura 2. Radiocromatograma de HPLC de ^{99m}Tc -EC20. Las muestras de ^{99m}Tc -EC20 se eluyeron isocráticamente en una columna C18 (3,9 x 150 mm) Nova-Pak de Waters usando una fase móvil acuosa que contenía metanol al 20 % y ácido trifluoroacético al 0,2 % a un caudal de 1 ml/min. Se monitorizó el análisis de HPLC tanto con el detector UV (280 nm) como con un radiodetector FC-3200 de Bioscan. Pico A, ^{99m}Tc libre; pico B, un quelato que contiene folato de estructura desconocida; picos C y D, diastereómeros que poseen una configuración bien *syn* o *anti* del enlace tecnecio-oxígeno en el anillo quelante Dap-Asp-Cys de EC20.

Figura 3. Estructuras de los isómeros de Re-EC20 y ^{99m}Tc -EC20 (posición *syn* o *anti* del enlace metal-oxo).

Figura 4. Bloqueo de la unión de 3H -ácido fólico a células KB con diversos competidores que contienen folato. Se incubaron células KB durante 15 min en hielo con 3H -ácido fólico 100 nM en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de los competidores. (●) Ácido fólico; (■) EC20; (▲) Isómero A de EC20:Re; (▼) Isómero B de EC20:Re; (□) DTPA-folato. Las barras de error representan 1 desviación estándar (n = 3).

Figura 5. Asociación dependiente del tiempo de ^{99m}Tc -EC20. Se incubaron células KB con ^{99m}Tc -EC20 10 nM durante periodos crecientes de tiempo a 37 °C. Tras múltiples lavados, se recogieron las células y se sometieron a recuento para determinar la radiactividad asociada. Las barras de error representan 1 desviación estándar (n = 3).

Figura 6. Asociación dependiente de la concentración de ^{99m}Tc -EC20. Se incubaron células KB durante 2 h a 37 °C en presencia de concentraciones crecientes de ^{99m}Tc -EC20. Tras múltiples lavados, se recogieron las células y se sometieron a recuento para determinar la radiactividad asociada. Las barras de error representan 1 desviación estándar (n = 3).

Figura 7. Asociación dependiente de la concentración de ^{99m}Tc -EC20 "pico B". Se incubaron células KB durante 2 h a 37 °C en presencia de concentraciones crecientes de "pico B" que se aisló de manera cromatográfica a partir de la formulación de ^{99m}Tc -EC20. Tras múltiples lavados, se recogieron las células y se sometieron a recuento para determinar la radiactividad asociada. Las barras de error representan 1 desviación estándar (n = 3). (●), Pico B; (°), Pico B más ácido fólico 1 mM.

Figura 8. Aclaramiento sanguíneo de ^{99m}Tc -EC20 en ratones Balb/c. Todos los animales recibieron una dosis intravenosa de 50 $\mu g/kg$ de EC20 (67 nmol/kg) en aproximadamente 0,1 ml durante una breve anestesia con éter dietílico. En los tiempos designados tras la inyección, se sacrificó cada animal mediante asfixia con CO_2 , se extrajo sangre y se sometió a recuento para determinar la radiactividad asociada. Las barras de error representan 1 desviación estándar (n = 3 animales).

Figura 9. Imágenes de radiación gamma de cuerpo entero (vista ventral). Las imágenes se obtuvieron 4 h después de la administración intravenosa de ^{99m}Tc -EC20 a un ratón Balb/c que tenía un tumor M109 positivo en el receptor de folato subcutáneo. Solo los riñones (K) y el tumor (T) presentan una acumulación significativa de este radiotrazador.

Figura 10. Estructuras de EC11, EC13, EC14, EC15, EC19, EC20, EC31 y EC53.

Figura 11. Distribución tisular de ^{99m}Tc -EC20 en ratones Balb/c con tumores M109 positivos en RF y tumores 4T1 negativos en RF.

Figura 12. Análisis de HPLC de EC11.

Figura 13. Análisis de espectroscopía de masas de EC11.

Figura 14. Análisis de RMN de EC 11.

Figura 15. Análisis de HPLC de EC 13.

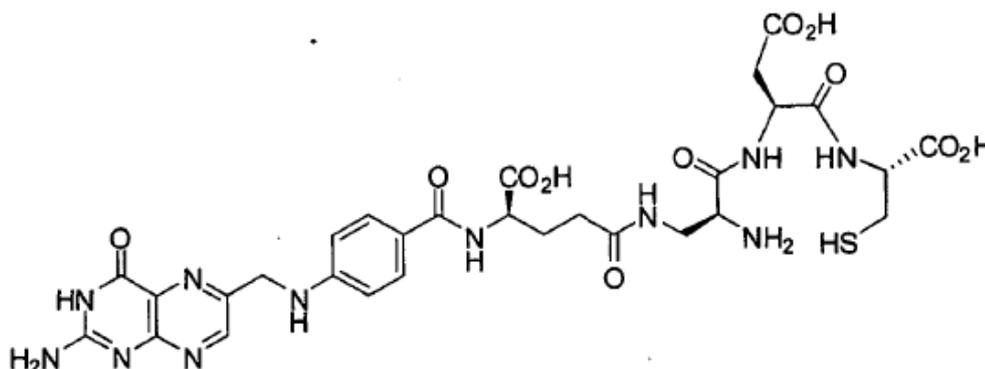
Figura 16. Análisis de RMN de EC14.

- Figura 17. Análisis de espectroscopía de masas de EC 15.
- Figura 18. Análisis de HPLC de EC19.
- Figura 19. Análisis de espectroscopía de masas de EC 19.
- Figura 20. Análisis de HPLC de EC31.
- Figura 21. Análisis de HPLC de EC53.
- Figura 22. Análisis de espectroscopía de masas de EC53.
- Figura 23. Análisis de espectroscopía de masas de EC53.

Descripción detallada de la invención

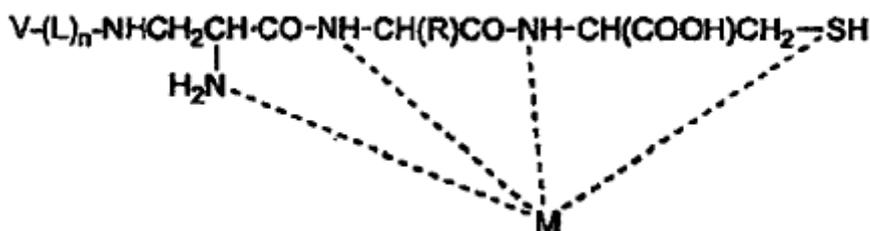
De acuerdo con la divulgación, se proporcionan procedimientos para dirigir agentes de formación de imágenes a base de radionúclidos a poblaciones de células que expresan de forma única, sobreexpresan o expresan preferentemente receptores de vitaminas. Por consiguiente, una vitamina, o un derivado de unión a un receptor o análogo del mismo, se usa como el ligando de direccionamiento para el agente de formación de imágenes. El conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes se puede usar para dirigir radionúclidos a células y para concentrar los radionúclidos en una población de células, tal como una población de células tumorales, para su uso en la formación de imágenes de diagnóstico.

La invención se refiere a un procedimiento de formación de imágenes de una población de células tumorales en un animal que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula:

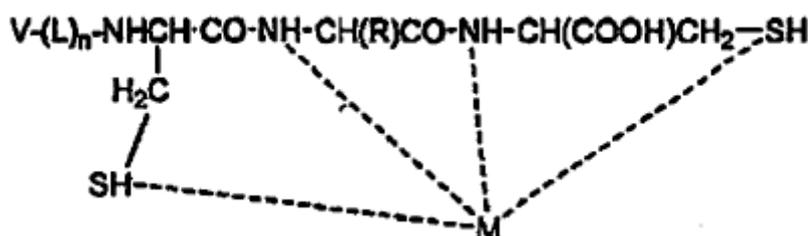


quelado a un catión de un radionúclido.

La solicitud desvela una composición de formación de imágenes de diagnóstico que comprende un compuesto de fórmula:

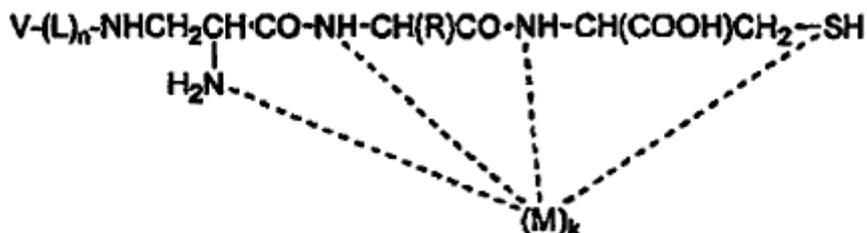


o

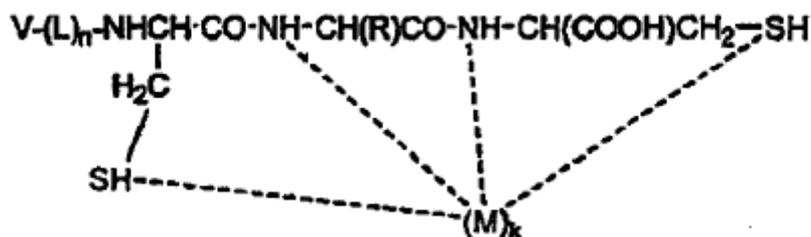


para su uso en dichos procedimientos. En el compuesto, V es una vitamina, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo, L es un engarce divalente, R es una cadena lateral de un aminoácido de fórmula $H_2NCHR\text{COOH}$, M es un catión de un radionúclido y n es 1 o 0. La vitamina, o derivado de unión al receptor de la vitamina o análogo del mismo, es un sustrato para el transporte transmembrana mediado por el receptor *in vivo*.

5 La solicitud también desvela los compuestos de las fórmulas:



y



10 en las que V es una vitamina, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo, L es un engarce divalente, R es una cadena lateral de un aminoácido de fórmula $H_2NCHR\text{COOH}$, M es un catión de un radionúclido, n es 1 o 0 y k es 1 o 0. La vitamina es un sustrato para el transporte transmembrana mediado por el receptor *in vivo*.

15 Un ejemplo de estos compuestos es un compuesto denominado EC20 representado en la Fig. 1. Los ejemplos de otros compuestos para su uso de acuerdo con la presente divulgación son compuestos denominados EC11, EC13, EC14, EC15, EC19, EC31 y EC53 (véase la Fig. 10). El resto de vitamina (por ejemplo, el resto de ácido fólico de EC20) proporciona una unión de alta afinidad a los RF celulares. Los compuestos también contienen un quelante a base de péptido bifuncional que proporciona el sitio para la quelación del radionúclido, por ejemplo, ^{99m}Tc (véase la Fig. 1), y los compuestos pueden, opcionalmente, contener un engarce a través del cual el resto de vitamina se une covalentemente al resto quelante.

20 De acuerdo con la invención, el resto de vitamina del compuesto es una vitamina que es un sustrato para el transporte transmembrana mediado por receptores *in vivo*, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo. La vitamina de las divulgaciones anteriores se une, opcionalmente, a través de un engarce (L) con la parte de quelante de los compuestos. En la invención, y como se muestra en la Fig. 1, EC20 comprende un análogo de ácido fólico unido al resto quelante, porque EC20 tiene el ácido glutámico en la configuración D. La parte de quelante comprende un resto de ácido α,β -diaminopropiónico unido a un grupo cisteína a través de un tercer residuo de aminoácido. La parte de quelante del compuesto está adaptada a unirse a un catión radionúclido (M) (en el que $k = 1$).

De acuerdo con la invención, el compuesto con radionúclido unido se denomina "conjugados de vitamina-agente de formación de imágenes".

30 La estructura del engarce, si está presente, no es de importancia fundamental para las divulgaciones anteriores. Por lo tanto, por ejemplo, puede ser cualquier engarce divalente biocompatible. Por lo general, el engarce comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 átomos de carbono, más comúnmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono. Normalmente, se emplean engarces de menor peso molecular (es decir, aquellos que tienen un peso molecular aproximado de aproximadamente 30 a aproximadamente 300). Además, el resto de vitamina puede ser una vitamina, o un derivado o análogo de la misma. Por ejemplo, el folato contiene un ácido glutámico en la configuración L unido a ácido pterico. EC11 y EC14 contienen dos residuos de ácido glutámico y, por tanto, estos compuestos, por ejemplo, también se pueden considerar derivados de ácido fólico (Fig. 10).

Entre las vitaminas que se cree que desencadenan la endocitosis mediada por un receptor y que tienen aplicación de acuerdo con el procedimiento desvelado en el presente documento están la niacina, el ácido pantoténico, el ácido fólico, la riboflavina, la tiamina, la biotina, la vitamina B₁₂ y las vitaminas liposolubles A, D, E y K. Estas vitaminas, y sus análogos y derivados, constituyen vitaminas que se pueden acoplar con agentes de formación de imágenes para formar los conjugados de vitamina-quelante para su uso de acuerdo con la invención. Los restos de vitamina preferidos incluyen ácido fólico, biotina, riboflavina, tiamina, vitamina B₁₂, y los análogos y derivados de estas moléculas de vitamina, y otras moléculas de unión a receptores de vitaminas relacionados.

De acuerdo con las divulgaciones anteriores, se pueden usar ácido fólico, ácido folínico, ácido ptericoico, ácido pteropoliglutámico y pteridinas de unión a los receptores de folato, tales como tetrahidropterinas, dihidrofolatos, tetrahidrofolatos y sus análogos desaza y didesaza. Las expresiones análogos "desaza" y "didesaza" se refieren a los análogos de folato reconocidos en la técnica que tienen un átomo de carbono sustituido con uno o dos átomos de nitrógeno en la estructura del ácido fólico natural. Por ejemplo, los análogos desaza incluyen los análogos 1-desaza, 3-desaza, 5-desaza, 8-desaza y 1.0-desaza. Los análogos didesaza incluyen, por ejemplo, los análogos 1,5-didesaza, 5,10-didesaza, 8,10-didesaza y 5,8-didesaza. Los anteriores son derivados o análogos de folato y se pueden unir a los receptores de folato. Otros derivados o análogos de folato útiles de acuerdo con las anteriores divulgaciones son los análogos de unión a los receptores de folato aminopterina, ametopterina (metotrexato), N¹⁰-metilfolato, 2-desamino-hidroxifolato, análogos desaza, tales como 1-desazametopterina o 3-desazametopterina y ácido 3',5'-dicloro-4-amino-4-desoxi-N¹⁰-metilpteroilglutámico (diclorometotrexato).

La vitamina o derivado o análogo de la misma, puede ser capaz de unirse selectivamente a la población de células que se va a visualizar debido a la expresión de preferencia en las células diana de un receptor para la vitamina, o derivado o análogo, en el que el receptor es accesible para la unión. El sitio de unión para la vitamina puede incluir receptores para cualquier molécula de vitamina capaz de unirse específicamente a un receptor, siendo el receptor u otra proteína expresado de manera única, sobreexpresado o preferentemente expresado por la población de células que se va a visualizar. Una proteína presente en la superficie expresada de manera única, sobreexpresada o expresada preferentemente por las células que se van a visualizar es un receptor no presente o presente en cantidades menores en otras células, proporcionando un medio para la visualización sensible, rápida y selectiva de las células diana para la formación de imágenes de diagnóstico usando los conjugados de vitamina-agente de formación de imágenes de la presente invención.

De acuerdo con la invención, el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes es capaz de unirse con una alta afinidad a los receptores en las células cancerosas u otras células que se vayan a visualizar. La unión de alta afinidad puede ser inherente al resto de vitamina o la afinidad de unión se puede mejorar mediante el uso de una vitamina modificada químicamente (es decir, un análogo o un derivado) o mediante el enlace químico particular entre la vitamina y el resto quelante que está presente en el conjugado.

De acuerdo con la divulgación, el quelante se puede conjugar con múltiples vitaminas diferentes, o derivados o análogos de unión a receptores de vitaminas para aumentar la posibilidad de la unión con los respectivos receptores de membrana celular. Como alternativa, las partes independientes de la dosis de un conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes pueden constituir diferentes conjugados de vitamina-agente de formación de imágenes para aumentar la posibilidad de unión a los respectivos receptores de membrana celular.

En general, se puede usar cualquier manera de formar un complejo entre el quelante y la vitamina, o el derivado o análogo de unión al receptor de vitamina, de acuerdo con las presentes divulgaciones. El quelante puede formar un complejo con la vitamina, o el derivado o análogo de unión al receptor de vitamina, mediante la conjugación directa del quelante y la vitamina usando de un engarce divalente. Como alternativa, la vitamina y el quelante se pueden conjugar sin el empleo de un engarce. Si se usa un engarce, el engarce puede conjugar directamente la vitamina, o el derivado o análogo de unión al receptor de vitamina, y el quelante a través de un enlace de hidrógeno, iónico o covalente. Además, de acuerdo con las presentes divulgaciones, el engarce divalente puede comprender un medio indirecto para asociar el quelante con la vitamina, o el derivado o análogo de unión al receptor de vitamina, tal como mediante la conexión a través de engarces intermedios, brazos espaciadores o moléculas puente. Los medios tanto directos como indirectos para la asociación no deben impedir la unión de la vitamina, o del derivado o análogo de unión al receptor de vitamina, con el receptor de vitamina sobre la membrana celular para el funcionamiento del procedimiento de la presente invención.

El enlace covalente de la vitamina, o derivado o análogo de unión al receptor de vitamina, y el quelante se puede producir, independientemente de si se emplea un engarce o no, a través de la formación de enlaces de tipo amida, éster o imino entre grupos de ácido, de aldehído, hidroxilo, amino o hidrazo. Por ejemplo, un ácido carboxílico del resto de vitamina o del quelante se puede activar usando carbonil-diimidazol o reactivos de acoplamiento de carbodiimida convencionales, tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y, tras ello, hacer reaccionar con el otro componente del conjugado, o con un engarce, que tenga al acoplado, con o sin un engarce, a través de enlaces de tipo éster, amida o tioéster.

Los radionúclidos adecuados para la formación de imágenes de diagnóstico incluyen radioisótopos de galio, indio, cobre, tecnecio y renio, incluyendo los isótopos ¹¹¹In, ^{99m}Tc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga o ⁶⁸Ga. Estos radionúclidos son catiónicos y forman complejos con el quelante a través del grupo quelante del conjugado para formar el conjugado

de vitamina-agente de formación de imágenes.

El conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes de acuerdo con la invención se usa para visualizar de manera selectiva, usando técnicas de formación de imágenes escintigráficas, una población de células en un animal en el que la población de células expresa de manera única, sobreexpresa o expresa preferentemente receptores para una vitamina, o un derivado de unión al receptor de vitamina o análogo del mismo. Se pueden usar el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes para visualizar poblaciones de células patógenas, siempre que las células expresen de manera única o preferentemente, o sobreexpresen receptores de vitamina o receptores que se unen a derivados o análogos de vitamina.

La invención es aplicable a poblaciones de células patógenas que provocan una variedad de patologías que incluyen cáncer y enfermedades mediadas por cualquier otro tipo de células patógenas que sobreexpresan receptores de vitamina, o receptores capaces de unirse a derivados o análogos de vitamina. Por lo tanto, la población de células patógenas puede ser tumorígena, incluyendo tumores benignos y tumores malignos. Si la población de células es una población de células cancerosas, las células cancerosas pueden surgir espontáneamente o mediante procedimientos, tales como mutaciones presentes en la línea germinal del animal huésped o mutaciones somáticas, o el cáncer puede inducirse de manera química, viral o mediante radiación. La invención se puede usar para la formación de imágenes de diagnóstico de cánceres, tales como carcinomas, sarcomas, linfomas, enfermedad de Hodgkin, melanomas, mesoteliomas, linfoma de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos y mielomas. La población de células cancerosas puede incluir, pero sin limitación, cáncer oral, nasofaríngeo, de tiroides, endocrino, de piel, gástrico, esofágico, laríngeo, de garganta, pancreático, de colon, de vejiga, de huesos, de ovario, de cuello uterino, uterino, de mama, de testículos, de próstata, rectal, renal, hepático, pulmonar y de cerebro. En realizaciones en las que la población de células es una población de células cancerosas, usando el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes, es posible visualizar células tumorales, incluyendo células de tumor primario o células que han experimentado metástasis o están en el procedimiento de disociarse del tumor primario.

Los conjugados de vitamina-agente de formación de imágenes de la presente divulgación se pueden usar para diagnosticar un estado patológico o para monitorizar la progresión de una enfermedad. Por ejemplo, el procedimiento de formación de imágenes de diagnóstico de acuerdo con la vitamina se puede usar para monitorizar la progresión del cáncer en combinación con tratamientos profilácticos para prevenir la reaparición de un tumor tras su eliminación mediante cualquier enfoque terapéutico, incluyendo la extirpación quirúrgica del tumor, radioterapia, quimioterapia o terapia biológica.

El procedimiento de la presente invención se puede usar para aplicaciones tanto de medicina clínica en seres humanos como veterinarias. Así pues, el animal que alberga la población de células que se visualizan puede ser un ser humano o, en el caso de aplicaciones veterinarias, puede ser un animal de laboratorio, agrícola, doméstico o salvaje. La presente invención se puede aplicar a animales incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, animales de laboratorio, tales como roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres, etc.), conejos, monos, chimpancés, animales domésticos, tales como perros, gatos y conejos, animales de la agricultura, tales como vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, y animales salvajes en cautividad, tales como osos, osos panda, leones, tigres, leopardos, elefantes, cebras, jirafas, gorilas, delfines y ballenas.

Las composiciones para la formación de imágenes de diagnóstico comprenden una cantidad del conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes eficaz para visualizar las células diana para la formación de imágenes de diagnóstico en un animal cuando se administra en una o más dosis. La composición de formación de imágenes de diagnóstico que contiene el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes se administra preferentemente al animal por vía parenteral, por ejemplo, por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intratecal. Como alternativa, la composición que contiene el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes se puede administrar al animal mediante otros procedimientos médicamente útiles, y se puede usar cualquier dosis eficaz y forma farmacéutica adecuada, incluyendo formas farmacéuticas para inhalación y orales.

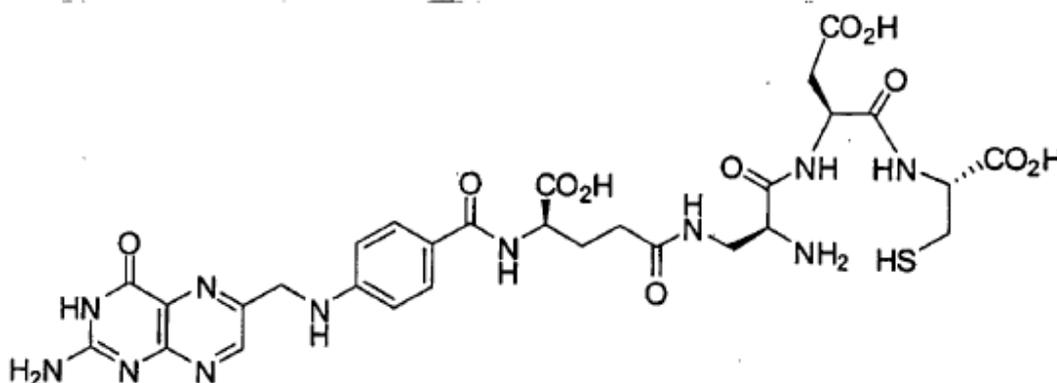
Los ejemplos de formas farmacéuticas parenterales incluyen disoluciones acuosas del conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes, en solución salina isotónica, glucosa al 5 % u otros vehículos líquidos farmacéuticamente aceptables bien conocidos, tales como alcoholes, glicoles, ésteres y amidas líquidos. La forma farmacéutica parenteral de acuerdo con la presente invención puede estar en forma de un liofilizado que se puede reconstituir que comprende la dosis del conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes.

La dosis del conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes en la composición de formación de imágenes de diagnóstico puede variar de manera significativa dependiendo del tamaño del animal, la población de células diana para la formación de imágenes de diagnóstico, el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes específico que se está usando y la vía de administración del conjugado. La cantidad eficaz que se administrará al animal se basa en la superficie corporal, peso y evaluación realizada por el médico del estado del animal. Una dosis eficaz puede variar de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 1 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 500 µg/kg, y lo más preferentemente de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 25 µg/kg.

Se puede usar cualquier pauta de dosificación eficaz para administrar la composición de formación de imágenes de diagnóstico que contiene el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes. Por ejemplo, la composición de formación de imágenes de diagnóstico se puede administrar como una sola dosis, o se puede administrar en dosis múltiples, si es necesario, para conseguir la visualización de la población de células diana. Se pueden administrar inyecciones adicionales de la composición de formación de imágenes de diagnóstico que contiene el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes al animal en un intervalo de días o meses tras la/s inyección/inyecciones inicial/es, y las inyecciones adicionales pueden ser útiles para monitorizar el progreso del estado patológico. La composición de formación de imágenes de diagnóstico que contiene el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes también se puede administrar en combinación con vitamina sin marcar. "En combinación con" significa que la vitamina sin marcar bien se puede administrar junto con el agente de formación de imágenes o que la vitamina sin marcar se puede inyectar previamente antes de la administración del agente de formación de imágenes para mejorar la calidad de la imagen. Por ejemplo, el agente de formación de imágenes se puede administrar en combinación con de aproximadamente 0,5 ng/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o de aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de la vitamina sin marcar.

La composición de formación de imágenes de diagnóstico normalmente se formula para la administración parenteral y se administra al animal en una cantidad eficaz para permitir la formación de imágenes de la población de células diana. Por lo general, la composición de formación de imágenes de diagnóstico que contiene la vitamina-agente de formación de imágenes dirigido se administra al animal, y tras un período de tiempo que permita la administración y la concentración del conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes en la población de células diana, al animal se somete al procedimiento de formación de imágenes, siendo la formación de imágenes posibilitada por el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes. Cuando se usan para monitorizar la progresión de una enfermedad o un diagnóstico, los procedimientos de formación de imágenes normalmente se llevan a cabo de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas después de la administración de la composición de formación de imágenes de diagnóstico que contiene el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes.

Como se ha mencionado anteriormente, la invención proporciona un procedimiento de formación de imágenes de una población de células tumorales en un animal, en el que las células se caracterizan por un receptor de vitamina en la superficie de las células. El procedimiento comprende las etapas de administrar al animal una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula:



El procedimiento se puede usar para la formación de imágenes de una población de células *in vitro*, por ejemplo, en cultivo celular, o *in vivo*, cuando las células forman parte de o existen de otra manera en tejido animal. Así pues, las células diana pueden incluir, por ejemplo, las células que revisten el tubo digestivo, tal como la mucosa oral o faríngea, las células que forman las vellosidades del intestino delgado o las células que revisten el intestino grueso. Dichas células del tubo digestivo pueden servir de diana de acuerdo con la presente invención mediante la administración oral de una composición de formación de imágenes de diagnóstico que comprenda el conjugado de vitamina-agente de formación de imágenes. De igual manera, las células que revisten el sistema respiratorio (fosas nasales, pulmones) de un animal pueden servir de diana mediante la inhalación de los presente complejos, y las células de órganos internos, incluyendo las células de los ovarios y del cerebro, pueden servir de diana, particularmente, mediante la administración parenteral de la composición de formación de imágenes de diagnóstico.

La solicitud también desvela:

1. Un compuesto de fórmula:



en la que V es una vitamina que es un sustrato para el transporte transmembrana mediado por el receptor *in vivo*, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo;

L es un engarce divalente;

R es una cadena lateral de un aminoácido de fórmula $H_2NCHR\text{COOH}$;

M es un catión de un radionúclido;

n o 1 o 0; y

k es 1 o 0.

2. El compuesto de 1, en el que V es una vitamina seleccionada del grupo que consiste en folato, riboflavina, tiamina, vitamina B12 y biotina, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo.

3. El compuesto de 1, en el que el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en isótopos de galio, indio, cobre, tecnecio y renio.

4. El compuesto de 3, en el que el radionúclido es un isótopo de tecnecio.

5. El compuesto de 1, en el que V es folato, o un derivado de unión al receptor de folato o análogo del mismo.

6. Una composición para la formación de imágenes de diagnóstico que comprende un compuesto de fórmula:



en la que V es una vitamina que es un sustrato para el transporte transmembrana mediado por el receptor *in vivo*, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo;

L es un engarce divalente;

R es una cadena lateral de un aminoácido de fórmula $H_2NCHR\text{COOH}$;

M es un catión de un radionúclido;

n o 1 o 0; y

un vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo.

7. La composición de 6, en la que V del compuesto es una vitamina seleccionada del grupo que consiste en folato, riboflavina, tiamina, vitamina B12 y biotina, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo.

8. La composición de 6, la que el radionúclido del compuesto se selecciona del grupo que consiste en isótopos de galio, indio, cobre, tecnecio y renio.

9. La composición de 8, en la que el radionúclido del compuesto es un isótopo de tecnecio.

10. La composición de 6 adaptada a la administración parenteral.

11. El compuesto de 6, en el que V es folato, o un derivado de unión al receptor de folato o análogo del mismo.

12. Un procedimiento de formación de imágenes de una población de células en un animal, en el que dichas células se caracterizan por un receptor de vitaminas en la superficie de dichas células, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

administrar al animal una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula:



en la que V es la vitamina, o un derivado de unión al receptor de la vitamina o un análogo del mismo, específica de dicho receptor de vitaminas de la superficie celular;

L es un engarce divalente;

y un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo;
 en la que V es un folato, siendo el folato un sustrato para el transporte transmembrana mediado por el receptor *in vivo*, o un derivado de unión al receptor de folato o un análogo del mismo;

L es un engarce divalente;

R es una cadena lateral de un aminoácido;

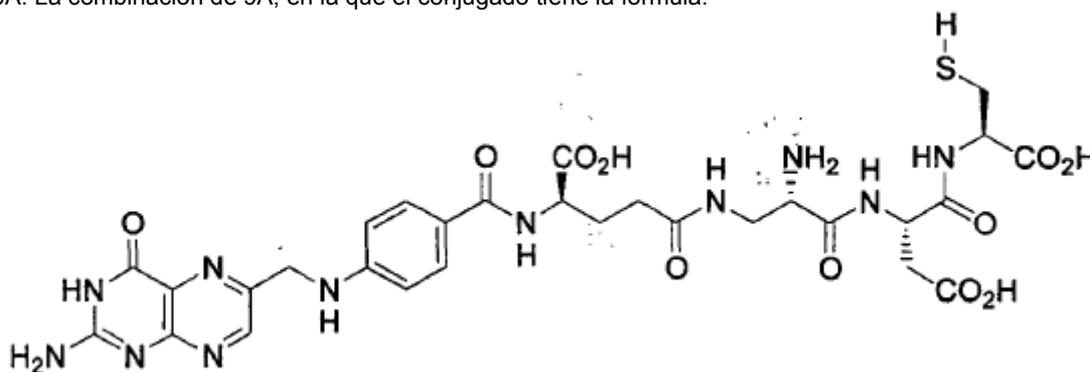
M es un catión de un radionúclido;

n es 1 o 0; y

k es 1 o 0;

en combinación con un folato sin marcar.

10A. La combinación de 9A, en la que el conjugado tiene la fórmula:



11A. La combinación de 9A o 10A, en la que un catión de un radionúclido está unido al conjugado, donde el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en isótopos de galio, indio, cobre, tecnecio y renio.

12A. La combinación de uno cualquiera de 9A a 11A, en la que el radionúclido es un isótopo de tecnecio.

13A. La combinación de uno cualquiera de 9A a 12A, en la que el conjugado es una forma de dosificación adaptada a la administración parenteral.

14A. La combinación de 13A, en la que la forma de dosificación se selecciona del grupo que consiste en una forma de dosificación intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e intratecal.

15A. La combinación de uno cualquiera de 9A a 14A, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es un líquido.

16A. La combinación de 15A, en la que el vehículo líquido se selecciona del grupo que consiste en solución salina, glucosa al 5 %, alcoholes, glicoles, ésteres, amidas y una combinación de los mismos.

Ejemplo 1

Materiales

Se adquirió ácido N¹⁰-trifluoroacetilpterico de Eprova AG, Schaffhausen, Suiza. Se adquirieron los reactivos para la síntesis de péptidos de NovaBiochem y Bachem. Syncor suministró el ^{99m}Tc-pertecnetato de sodio. Se preparó [ReO₂(en)₂]Cl de acuerdo con Rouschias (Rouschias, G., *Chem. Rev.*, 74:531 (1974)). Se adquirieron placas de celulosa y placas de intercambio iónico de DEAE de J. T. Baker.

Ejemplo 2

Síntesis, purificación y caracterización analítica de EC20

Se preparó EC20 mediante un enfoque secuencial de soporte polimérico usando la estrategia de Fmoc (véase el Esquema 1 que se presenta a continuación; Fmoc = 9-fluorenilmetiloxycarbonilo; Boc = *tert*-butiloxycarbonilo; Dap = ácido diaminopropiónico; DMF = dimetilformamida; DIPEA = diisopropiletamina). Se sintetizó EC20 en una resina de Wang sensible a ácido cargada con Fmoc-L-Cys(Trt)-OH. Se aplicó hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-trispirrolidin-fosfonio (PyBOP) como reactivo activador para garantizar un acoplamiento eficaz usando equivalentes bajos de aminoácidos. Se eliminaron los grupos protectores de Fmoc tras cada etapa de acoplamiento en condiciones convencionales (piperidina al 20 % en DMF). Tras la última etapa de ensamblaje, se escindió el péptido del soporte polimérico mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 92,5 % que contenía etanoditiol al 2,5 %, triisopropilsilano al 2,5 % y agua desionizada al 2,5 %. Esta reacción también dio como resultado la eliminación simultánea de los grupos protectores de tritilo, Boc y *t*-Bu. Por último, se eliminó el resto de trifluoroacetilo en hidróxido de amonio acuoso, dando EC20.

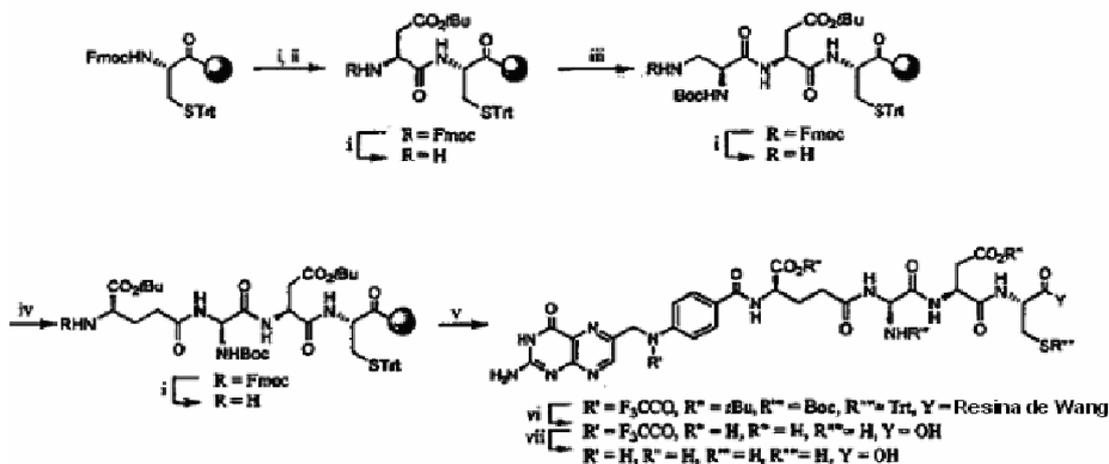
Se purificó el producto EC20 bruto mediante HPLC usando una columna de 7 μm, 30 x 300 mm, Xterra RP 18 (Waters); fase móvil de HCl 32 mM (A), MeOH (B); condiciones de gradiente que parten con A al 99 % y B al 1 %, llegando a A al 89 % y B al 11 % en 37 min mediante un caudal de 20 ml/min. En estas condiciones, el monómero de EC20 normalmente eluyó a 14,38 min, mientras que el dímero de disulfuro de EC20 (contaminante minoritario) eluyó a 16,83 min. Todos los demás componentes mostrados en la Fig. 10 se pueden preparar usando un esquema

de síntesis similar, a excepción de EC15, que se sintetiza como se muestra en el Esquema 2 que se presenta a continuación.

Se disolvieron dos miligramos de EC20 purificado mediante HPLC en 0,62 ml de D₂O, y se recogió un espectro de RMN de ¹H a 500 MHz. La Tabla 1 (véase a continuación) enumera los desplazamientos químicos, las formas de señal y los valores J para todos los protones no intercambiables en la molécula de EC20.

También se analizó EC20 mediante espectrometría de masas por electronebulización. Picos del ión positivo principal (m/z, intensidad relativa): 746,1, 100; 747,1, 44; 556,8, 32; 570,8, 16.

Esquema 1^a



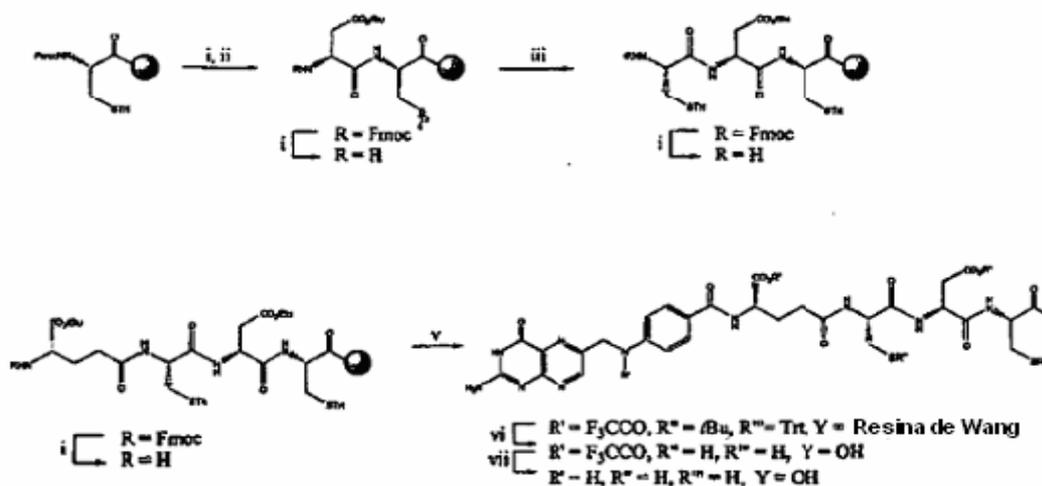
^aReactivos y condiciones: i) Piperidina al 20 %, DMF; ii) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iii) Boc-Dap(Fmoc)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iv) Fmoc-D-Glu-OtBu, PyBop, DIPEA, DMF; v) N^m-TFA-Pte-OH, DIPEA, DMSO; vi) F₃CCO₂H, HSCH₂CH₂SH, iPr₃SiH; vii) H₂NOH, pH = 10,3.

10 **Tabla 1 Datos de RMN de ¹H para EC20.** Se disolvió EC20 en D₂O y se recogió un espectro a 500 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm. La señal para HOD a δ = 4,80 ppm se usó como referencia, pD = 4,78; s = singlete; d = doblete; m = multiplete.

Residuo	Protones observados	Desplazamiento químico (δ)	Señales	Valores J
Ple	H-7 2 x H-9 H-12 a. H-16 H-13 a. H-15	8,76 4,64 7,68 6,8	s s d d	³ J _{12,13} = ³ J _{15,16} = 8,8 Hz
D-Glu	H-2 H-3a H-3B 2 x H-4	4,41 2,08 2,27 2,44	dd m m dd	³ J _{2,3} = ³ J _{9,1} = 9,1 Hz; ³ J _{2,3b} = 4,5 Hz ² J _{3a,3b} = 14,2 Hz; ³ J _{3a,4} = ³ J _{4b,4} = 5,6 Hz

(Continuación)

Residuo	Protones observados	Desplazamiento químico (δ)	Señales	Valores J
Dpr	H-2 H-3A H-3B	4,1 3,52 3,72	dd; X del sistema ABX dd; A del sistema ABX dd; B del sistema ABX	$^3J_{2,3A} = 6,6$ Hz; $^3J_{2,3B} = 4,7$ Hz $^2J_{A,B} = 14,7$ Hz
Asp	H-2 2,81 H-3B	4,71 2,62 2,81	dd; X del sistema ABX dd; A del sistema ABX dd; B del sistema ABX	$^3J_{2,3A} = 9,5$ Hz; $^3J_{2,3B} = 4,3$ Hz $^2J_{A,B} = 16,1$ Hz
Cys	H-2 H-3A H-3B	4,3 2,85 2,89	dd; X del sistema ABX dd; A del sistema ABX dd; B del sistema ABX	$^3J_{2,3A} = 55$ Hz; $^3J_{2,3B} = 4,4$ Hz $^2J_{A,B} = 14,1$ Hz

Esquema 2^a

^aReactivos y condiciones: i) Piperidina al 20 %, DMF; ii) Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iii) Fmoc-Cys(Trt)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iv) Fmoc-D-Glu-O^tBu, PyBop, DIPEA, DMF; v) N¹⁰-TFA-Pte-OH, DIPEA, DMSO; vi) TFAA, HSCH₂CH₂SH, iPr₃SiH; vii) H₂NOH, pH = 10,3.

5 Ejemplo 3

Preparación del vial de reactivo no radiactivo y de ^{99m}Tc-EC20

Se usaron kits de EC20 para la preparación de la sustancia farmacológica radiactiva de ^{99m}Tc-EC20. Cada kit contenía una mezcla liofilizada no pirógena, estéril, de 0,1 mg de EC20, 80 mg de α -D-glucoheptonato de sodio, 80 mg de cloruro de estaño (II) dihidratado, y suficiente hidróxido de sodio o ácido clorhídrico para ajustar el pH a 6,8

± 0,2 antes de la liofilización. Se selló el polvo liofilizado en un vial de 5 ml bajo una atmósfera de argón. A continuación, se almacenaron los kits en congelación a -20 °C hasta su uso o caducidad (la vida útil de almacenamiento actual es > 2 años). Es importante destacar que el componente cloruro de estaño (II) se requiere para reducir el ^{99m}Tc -pertechnetato añadido, mientras que el componente α -D-glucoheptonato de sodio es necesario para estabilizar el ^{99m}Tc reducido recientemente antes de su quelación final para dar el compuesto EC20,

Se preparó ^{99m}Tc -EC20 de la siguiente manera (es decir, quelación de ^{99m}Tc , dando EC20). En primer lugar, se preparó un baño de agua en ebullición que contenía un protector de vial de plomo parcialmente sumergido. Se limpió con hisopo la parte superior del vial de EC20 con etanol al 70 % para desinfectar la superficie y se colocó el vial en un recipiente de protección adecuado. Usando una jeringa protegida con aguja de calibre 27, se inyectó 1 ml de la inyección de ^{99m}Tc -pertechnetato de sodio estéril (de 15 a 20 mCi) en cloruro de sodio al 0,9 %, en el vial protegido. Antes de retirar la jeringa del vial, se extrajo un volumen de gas del vial igual al volumen de pertechnetato añadido con el fin de normalizar la presión en el interior del vial. Se agitó suavemente el vial durante 30 segundos para garantizar la completa disolución del polvo liofilizado. Luego, se colocó el vial en protector de plomo que estaba situado en el baño de agua en ebullición. Se calentó la disolución durante ~18 minutos y, a continuación, se enfrió hasta la temperatura ambiente durante un mínimo de 15 min. Esta disolución se puede almacenar a temperatura ambiente (15-25 °C) protegida de la luz, pero se debe usar en un plazo de 6 horas de su preparación.

Se determinó la estabilidad radioquímica de la sustancia farmacológica radiactiva mediante HPLC tras su almacenamiento a temperatura ambiente protegida de la luz durante hasta 24 horas. Se analizaron muestras de la solución de ^{99m}Tc -EC20 (20 μl) usando un sistema de HPLC que consistía en un sistema de administración de múltiples disolventes 600E de Waters y un detector UV 490, un radiodetector EC-3200 de Bioscan, un programa informático de radiocromatograma Laura v1.5 y una columna C18 (3,9 x 150 mm) Nova-Pak de Waters. Se eluyeron isocráticamente las muestras inyectadas usando una fase móvil acuosa que contenía metanol al 20% y ácido trifluoroacético al 0,1 % a un caudal de 1 ml/min. Se monitorizó el análisis por HPLC tanto con el detector UV (280 nm) como con el radiodetector de rayos gamma. En particular, la pureza radioquímica de ^{99m}Tc -EC20 se mantuvo superior al 90 % durante al menos 24 horas en todos los casos.

Ejemplo 4

Determinación de la pureza radioquímica de ^{99m}Tc -EC20 mediante CCF

Las impurezas radioquímicas principales en la preparación de ^{99m}Tc -EC20 serán 1) ^{99m}Tc -pertechnetato, 2) ^{99m}Tc -glucoheptonato (precursor de intercambio de ligando), 3) ^{99m}Tc de unión inespecífica (^{99m}Tc unido a un sitio diferente del resto quelante Dap-Asp-Cys esperado de la molécula EC20) y 4) ^{99m}Tc hidrolizado. Dado que se estaba analizando el ^{99m}Tc -EC20 para determinar su posible uso clínico, se desarrolló un procedimiento a base de tres CCF para determinar las cantidades de cada impureza y estimar la pureza radioquímica global de ^{99m}Tc -EC20.

En el primer sistema, se reveló una placa de celulosa con agua desionizada. ^{99m}Tc -EC20, ^{99m}Tc -glucoheptonato, ^{99m}Tc de unión inespecífica y ^{99m}Tc -pertechnetato se mueven hacia el frente de disolvente ($R_f = 1,0$), mientras que ^{99m}Tc hidrolizado permanece en el origen ($R_f = 0,0$). Se cortó la placa de celulosa en dos fragmentos a $R_f = 0,3$ (1,5 cm del origen) y se realizó el recuento en cada fragmento usando un calibrador de dosis. Se calculó el porcentaje de ^{99m}Tc hidrolizado de la siguiente manera: $A = \% \text{ de hidrolizado; } ^{99m}\text{Tc} = (\mu\text{Ci en el fragmento inferior} / \mu\text{Ci en ambos fragmentos}) \times 100$.

En el segundo sistema, se reveló una placa de celulosa con acetona y NaCl al 0,9 % (7:3, v/v). El ^{99m}Tc -pertechnetato se mueve con $R_f = 0,9$, mientras que ^{99m}Tc -EC20, ^{99m}Tc -glucoheptonato, ^{99m}Tc de unión inespecífica y ^{99m}Tc hidrolizado permanecen en el origen ($R_f = 0,0$). Se cortó la placa de celulosa/acetona-solución salina en dos fragmentos a $R_f = 0,6$ (3,0 cm del origen) y se realizó el recuento en cada fragmento usando un calibrador de dosis. Se calculó el porcentaje de ^{99m}Tc -pertechnetato de la siguiente manera: $B = \% \text{ de } ^{99m}\text{Tc}\text{-pertechnetato} = (\mu\text{Ci en el fragmento superior} / \mu\text{Ci en ambos fragmentos}) \times 100$.

Por último, en el tercer sistema, se reveló una placa de intercambio iónico de DEAE con Na_2SO_4 0,3 M. El ^{99m}Tc -glucoheptonato se mueve hacia el frente de disolvente ($R_f = 1,0$), ^{99m}Tc de unión inespecífica se mueve con $R_f = 0,6$ y ^{99m}Tc -EC20, ^{99m}Tc hidrolizado y ^{99m}Tc -pertechnetato permanecen cerca del origen (^{99m}Tc -EC20, $R_f = 0,1$; ^{99m}Tc hidrolizado: $R_f = 0,0$; ^{99m}Tc -pertechnetato: $R_f = 0,3$). Se cortó la placa de celulosa/ Na_2SO_4 en dos fragmentos a 2,5 cm del origen y se realizó el recuento en cada fragmento usando un calibrador de dosis. Se calculó el porcentaje de ^{99m}Tc -glucoheptonato y ^{99m}Tc de unión inespecífica de la siguiente manera: $C = \% \text{ de } (^{99m}\text{Tc}\text{-glucoheptonato} + ^{99m}\text{Tc} \text{ de unión inespecífica}) = (\mu\text{Ci en el fragmento superior} / \mu\text{Ci en ambos fragmentos}) \times 100$. Se calculó entonces la pureza radioquímica global de ^{99m}Tc -EC20 de la siguiente manera: pureza radioquímica = $100 - (A+B+C)$.

Como se muestra en la Fig. 2, el análisis por HPLC de la formulación ^{99m}Tc -EC20 muestra cuatro componentes radioquímicos, denominados picos A a D. Se confirmó que el pico A era ^{99m}Tc libre y este subproducto está presente de manera reproducible a < 2 %. El pico B, que era diferente del de ^{99m}Tc -glucoheptonato (no se muestran los datos), eluyó con un tiempo de retención de 2,8 min. Este componente representó aproximadamente el 3 % de la mezcla y se creía que resultaba de la quelación de ^{99m}Tc en algún otro sitio de la molécula de EC20, además del resto Dap-Asp-Cys esperado. Los picos C y D (tiempos de retención de 4,8 minutos y 13,2 minutos,

respectivamente), representan la mayoría de la actividad radioquímica formulada.

Ejemplo 5

Síntesis de Re-EC20

5 Se disolvieron cincuenta y dos mg (0,010 mmol) de EC20 y $[\text{ReO}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$ (52 mg, 0,14 mmol) en 6 ml y 1 ml de tampón fosfato purgado con argón (0,05 M, pH 5,8), respectivamente. Se combinaron las dos soluciones y se calentaron bajo una atmósfera de argón en un baño de agua en ebullición durante 2 horas. Se congeló y se liofilizó durante una noche la mezcla de reacción. Se purificó el producto bruto mediante HPLC (columna Xterra RP18, 19 x 150 mm, NH_4OAc 10 mM/ CH_3CN , caudal de 10 ml/mm; gradiente del 1 % al 8 %). Se recogieron las fracciones, se liofilizaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

10 Debido a la falta de instalaciones para espectros de masas para el análisis de materiales radiactivos, se analizó el análogo de renio no radiactivo, Re-EC20. Tanto el renio como el tecnecio son metales del grupo VIIA que tienen una similitud significativa en cuanto a las propiedades químicas y físicas. También forman complejos similares con ligandos orgánicos. Este comportamiento químico análogo, con frecuencia, se ha usado en el esclarecimiento de las estructuras de nuevas clases de productos radiofarmacéuticos de tecnecio basados en análogos de renio no radiactivos. De manera interesante, el análisis por HPLC de Re-EC20 también mostró dos picos principales que eluyeron a 5 y 14,2 minutos, respectivamente, similares a los picos C y D para $^{99\text{m}}\text{Tc-EC20}$ (cromatograma no mostrado). El análisis de espectros de masas confirmó que estos dos componentes eran isómeros correspondientes al complejo Re-EC20 ($m/z = 945$). De hecho, es probable que estas especies fueran diastereómeros que poseían una configuración bien *syn* o *anti* del enlace de oxígeno del tecnecio en el anillo quelante Dap-Asp-Cys, como se representa en la Fig. 3. Debido a que i) los dos picos del cromatograma de Re-EC20 representan complejos isoméricos, y ii) existen informes sobre el isomerismo similar en complejos de tecnecio, es probable que los componentes C y D del radiocromatograma de $^{99\text{m}}\text{Tc-EC20}$ también sean isómeros.

Ejemplo 6

Cultivo celular

25 Se cultivaron células de manera continua en forma de una monocapa usando medio RPMI libre de folato (FFRPMI) que contenía suero de ternero fetal inactivado por calor (HIFCS) al 10 % a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5 %/humidificada con aire al 95 % sin antibióticos. El HIFCS contenía su complemento normal de folatos endógenos que permitió que las células crecieran de manera sostenida en este medio más fisiológicamente apropiado. Todos los experimentos celulares se realizaron usando FFRPMI que contenía HIFCS al 10 % (FFRPMI/HIFCS) como medio de crecimiento, excepto cuando se indica lo contrario.

Ejemplo 7

Ensayo de afinidad relativa

35 Se determinó la afinidad relativa de diversos derivados de folato de acuerdo con el procedimiento descrito por Westerhoff *et al.* (*Mol. Pharm.*, 48:459-471 (1995)) con una ligera modificación. En resumen, se tripsinizaron ligeramente células KB positivas en RF en tripsina al 0,25 %/PBS a temperatura ambiente durante 3 minutos, y se diluyeron después en FFRPMI/HIFCS. Tras una centrifugación de 800 x g durante 5 minutos y un lavado con PBS, se suspendió el sedimento de células final en FFRPMI 1640 (sin suero). Se incubaron las células durante 15 min en hielo con 100 nM de ^3H -ácido fólico en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de artículos de ensayo que contenían folato. Se centrifugaron las células a 10.000 x g durante 5 min, se suspendieron los sedimentos de células en tampón, se transfirieron a viales individuales que contenían 5 ml del cóctel de centelleo y, a continuación, se realizó el recuento para determinar la radiactividad. Los tubos de control negativo solo contenían el ^3H -ácido fólico en FFRPMI (sin competidor). Los tubos de control positivo contenían una concentración final de ácido fólico 1 mM, y las CPM medidas en estas muestras (que representan la unión inespecífica del marcador) se restaron de todas las muestras. En particular, las afinidades relativas se definieron como la proporción molar inversa del compuesto requerido para desplazar el 50 % de ^3H -ácido fólico unido a RF de KB, y la afinidad relativa del ácido fólico por el RF se estableció en 1.

50 La capacidad de EC20 para competir de manera directa con el ácido fólico para unirse a los RF de superficie celular se midió usando este ensayo. Es importante destacar que un valor de afinidad relativa de 1,0 implica que el ligando del artículo de ensayo tiene una afinidad por el RF igual al ácido fólico. Así mismo, los valores inferiores a la unidad reflejan una afinidad más débil y los valores superiores a la unidad reflejan una afinidad más fuerte.

55 Se incubaron células KB cultivadas con ^3H -ácido fólico 100 nM en presencia de concentraciones crecientes de ácido fólico no radiactivo, EC20, renio-EC20 (isómero A; pico C), renio-EC20 (isómero B; pico 0) o un producto radiofarmacéutico a base de folato relacionado, DTPA-folato. Tras una incubación durante 15 minutos a 4°C , se enjuagaron las células libres de material sin unir y se realizó el recuento para determinar la radiactividad asociada a las células residuales. La cantidad de radiactividad unida se representó frente a la concentración del ligando sin marcar, y se estimaron los valores de CI_{50} (concentración de ligando necesaria para bloquear el 50 % de unión del

³H-ácido fólico). Como se muestra en la Fig. 4 y la Tabla 2 (que se presenta a continuación), se determinó que EC20 tenía una afinidad de 0,92 con respecto a la del ácido fólico por los RF humanos. Ambos isómeros de reno-EC20 mostraron valores de afinidad relativa que eran muy similares a, si no mejores que, la molécula de EC20 precursora (1,42 y 1,37 para el isómero A e isómero B de Re-EC20, respectivamente). El DTPA-folato, un agente radiofarmacéutico de folato que quela a ¹¹¹In, mostró una afinidad relativa de 0,87 por el receptor de folato. Por lo tanto, la modificación química de folato con diversos motivos quelantes de metal no alteró la afinidad intrínseca de la vitamina por el RF.

Tabla 2. Estimaciones de la afinidad relativa. Las afinidades relativas (AR) se definieron como la proporción molar inversa de compuesto requerido para desplazar el 50 % del ³H-ácido fólico unido a células KB positivas en RF. La afinidad relativa del ácido fólico se estableció en 1. Se evaluó cada artículo de ensayo por triplicado.

Artículo de ensayo	Cl ₅₀ (nM)	D.E.	AR	D.E.
Ácido fólico	118	± 19	1,00	
EC20	128	± 25	0,92	± 0,23
Isómero 1 de EC20:Re	83	± 16	1,42	± 0,36
Isómero 2 de EC20:Re	86	± 3	1,37	± 0,23
DTPA-folato	136	± 12	0,87	± 0,16

Ejemplo 8

Captación celular dependiente del tiempo

Se sembraron células KB en placas Falcon de 12 pocillos y se permitió la formación de monocapas subconfluentes durante una noche. Tras un enjuague con 1 ml de FFRPMI/HIFCS recién preparado, cada pocillo recibió 1 ml de FFRPMI/HIFCS que contenía ^{99m}Tc-EC20 10 nM. Se incubaron las células durante tiempos predeterminados a 37 °C y, a continuación, se enjuagaron cuatro veces con 1 ml de PBS enfriado con hielo, pH 7,4. Se disolvieron las monocapas de células en 0,5 ml de PBS, pH 7,4 que contenían dodecilsulfato de sodio al 1 % durante 15 min a temperatura ambiente y luego se realizó el recuento para determinar la radiactividad usando un contador de rayos gamma de Packard. Se cuantificó la proteína en cada muestra usando un kit de ensayo de proteínas DC de BioRad, y los valores de proteína celular se convirtieron en número de células usando el factor de conversión de 2,23 x 10⁻⁷ mg de proteína por célula. Se expresaron los valores tabulados finales en términos de moléculas de EC20 por célula.

Usando este protocolo, se midió la cinética de captación de ^{99m}Tc-EC20 en células KB positivas en RF. Como se muestra en la Fig. 5, se alcanzó la captación en estado estacionario en el plazo de dos horas a 37 °C, en el que aproximadamente 3,2 millones de moléculas de EC20 estaban asociadas a células, mientras que la mitad de la asociación celular máxima se produjo 9 minutos después de mezclar 10 nM de este producto radiofarmacéutico con las células. Lo interesante es que la mitad del punto de saturación máximo se alcanzó en solo 37 segundos cuando se incubaron las células con una concentración 10 veces superior de ^{99m}Tc-EC20 (100 nM; datos no mostrados).

Ejemplo 9

Captación celular dependiente de la concentración

Se sembraron células KB en placas Falcon de 12 pocillos y se permitió la formación de monocapas subconfluentes durante una noche. Tras un enjuague con 1 ml de FFRPMI/HIFCS fresco, cada pocillo recibió 1 ml de FFRPMI/HIFCS que contenía concentraciones crecientes de ^{99m}Tc-EC20. Se incubaron las células durante 2 horas a 37 °C y luego se enjuagaron cuatro veces con 1 ml de PBS enfriado con hielo, pH 7,4. Se disolvieron las monocapas en 0,5 ml de PBS, pH 7,4 que contenían dodecilsulfato de sodio al 1 % durante 15 min a temperatura ambiente y, a continuación, se realizó el recuento para determinar la radiactividad usando un contador de rayos gamma de Packard. Se determinó el contenido de proteína como se ha descrito anteriormente, y se expresaron los valores tabulados finales en términos de moléculas de EC20 por célula.

Como se muestra en la Fig. 6, se descubrió que la captación celular de ^{99m}Tc -EC20 dependía de la concentración extracelular. Se determinó que las células KB usadas en particular se unían a un máximo de cuatro millones de moléculas del producto radiofarmacéutico de folato por célula. El análisis de Scatchard de los datos estimó que la K_D de unión era 3,2 nM, un valor comparable con la K_D observada para la unión de la vitamina folato con estas mismas células.

Aunque no se estableció la identidad completa del componente del pico B, el análisis de absorción UV indicó que contenía un resto de folato (es decir, el espectro de absorción contenía el pico de absorción secundario característico del folato a 363 nm). Se recogió este material radiomarcado purificado mediante HPLC (material del pico B) y luego se añadió a células KB cultivadas. Como se muestra en la Fig. 7, también se descubrió que la captación celular del componente del pico B marcado con ^{99m}Tc dependía de la concentración extracelular. El análisis de Scatchard de los datos estimó que la K_D de unión era 1,1 nM. Lo interesante es que la asociación celular del pico B se bloqueó completamente en presencia de ácido fólico en exceso, indicando que este subproducto de formulación minoritario también se puede dirigir a células positivas en RF con fines radiodiagnósticos.

Ejemplo 10

Aclaramiento de la sangre

Se mantuvieron los animales usados para el presente estudio con una dieta libre de folato (Harlan N° TD-90261) durante aproximadamente tres semanas antes de la administración de la dosis. La aclimatación a esta dieta especial es esencial, porque las dietas para roedores habituales contienen grandes cantidades de ácido fólico (6 mg/kg de comida) y promueven altos niveles de folato sérico en ratones. Además, estudios anteriores han demostrado que los ratones sometidos a una dieta libre de folato durante 3 semanas mantuvieron un nivel de folato sérico seguro de 25 ± 7 nM, que es ligeramente superior a la concentración de 9-14 nM medible en el suero humano.

Se preparó la solución de ^{99m}Tc -EC20 el día de su uso que contenía inicialmente 100 μg de EC20 por mililitro. Se diluyó adicionalmente la solución con solución salina estéril para preparar las soluciones madre de trabajo. Se estimó mediante CCF que la pureza radioquímica del producto era del ~ 94 %. Cada animal recibió una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de EC20 (67 nmol/kg) en un volumen i.v. de aproximadamente 0,1 ml a través de la vena de la cola durante una breve anestesia con éter dietílico. A los tiempos designados (véase la Fig. 8) posteriores a la inyección, se sacrificó cada animal mediante asfixia con CO_2 , y se extrajo inmediatamente sangre mediante punción cardíaca.

Como se muestra en la Fig. 8, el ^{99m}Tc -EC20 se eliminó rápidamente de la circulación en el ratón Balb/c. Se estimó que la semivida plasmática de este producto radiofarmacéutico fue de ~ 4 minutos, y menos del 0,2 % de la dosis de ^{99m}Tc -EC20 inyectada permaneció en circulación después de cuatro horas (suponiendo que la sangre representa el 5,5 % de la masa corporal total). Estos datos indican que los conjugados de folato se eliminan rápidamente de la circulación tras la administración intravenosa, y que se pueden obtener datos de biodistribución tisular valiosos transcurridas solo unas cuantas horas de la inyección sin la preocupación de que se produzca una captación tisular inespecífica debido a la radiactividad transmitida por la sangre.

Ejemplo 11

Estudios de distribución tisular

Se evaluó la capacidad de ^{99m}Tc -EC20 para dirigirse a tumores *in vivo* usando un modelo M109 positivo en RF. Estas células tumorales son singénicas para el ratón Balb/c y forman de manera reproducible tumores sólidos subcutáneos en el plazo de dos semanas tras la inoculación. También se evaluaron en este bioensayo ^{99m}Tc -EC14, que es estructuralmente similar a ^{99m}Tc -EC20, a excepción de que contiene un residuo de D-Glu adicional (es decir, Pte-D-Glu-D-Glu- β Dpr-Asp-Cys), ^{99m}Tc -EC28 (un control que no contiene pterato que consiste en benzoil-D-Glu-n-Glu- β Dpr-Asp-Cys) y el producto radiofarmacéutico de ^{111}In -DTPA-folato previamente publicado. Es importante destacar que el agente de control ^{99m}Tc -EC28 no se unirá a los RF de la superficie celular, porque carece de un resto de anillo de pteridina esencial.

Se adquirieron ratones (raza Balb/c) de cuatro a cinco semanas de edad de Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianápolis, IN) y se mantuvieron con una dieta libre de folato durante un total de tres semanas antes del experimento. Se inocularon células tumorales M109 positivas en RF, singénicas (1×10^6 por animal) en el tejido subcutáneo de la axila derecha dos semanas antes del experimento. Todos los ratones eran hembras, y los pesos de los tumores eran de $54,2 \pm 29,8$ mg el día del experimento. Se preparó una solución madre de ^{99m}Tc -EC20 que contenía 100 μg del agente por mililitro el día de su uso, y tenía una pureza radioquímica era de > 96 %. También se prepararon los dos agentes quelantes de ^{99m}Tc adicionales, ^{99m}Tc -EC14 y ^{99m}Tc -EC28, así como ^{111}In -DTPA-folato hasta una pureza radioquímica > 90 %. Se diluyeron todas las soluciones bien solo con solución salina o con una solución salina que contenía 100 equivalentes de ácido fólico (para competencia) de manera que la concentración del producto radiofarmacéutico final resultó ser de 10 $\mu\text{mol}/\text{ml}$.

Los animales recibieron una dosis i.v. de aproximadamente 40 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ del artículo de ensayo en un volumen de 100 μl a través de una vena lateral de la cola durante una breve anestesia con éter dietílico. Cuatro horas después

de la inyección, se sacrificaron los animales mediante asfixia con CO₂ y se diseccionaron. Se extirparon los tejidos seleccionados, se pesaron y se realizó el recuento para determinar la distribución de ^{99m}Tc. Se corrigieron los valores de CPM por la degradación y se tabularon los resultados como el % de dosis inyectada por gramo de peso húmedo de tejido.

- 5 Como se muestra en la Tabla 3 (que figura a continuación), los tres productos radiofarmacéuticos que contenían "folato", ^{99m}Tc-EC14, ^{99m}Tc-EC20 y ¹¹¹In-DTPA-folato, se acumularon predominantemente en los riñones y el tumor positivo en RF; sin embargo, los riñones concentraron un porcentaje superior de dosis inyectada por gramo de tejido (% de DI/g) que el tumor. Lo interesante es que la acumulación neta del tumor de ¹¹¹In-DTPA-folato y ^{99m}Tc-EC20 fue casi la misma (19 y 17 % de DI/g, respectivamente), mientras que la captación del tumor de ^{99m}Tc-EC14 fue algo inferior al ~10 % de DI/g. No obstante, los tres agentes mostraron altas proporciones de tumor con respecto a la sangre (de > 30 a 1).
- 10

Tabla 3. Biodistribución de productos radiofarmacéuticos de folato en ratones Balb/c que tienen tumores M109 subcutáneos

% de dosis inyectada por gramo de tejido (4 h después de la inyección intravenosa)*							
	^{99m} Tc- EC14	^{99m} Tc-EC14 + Ácido fólico	^{99m} Tc-EC20	^{99m} Tc- EC20 + Ácido fólico	¹¹¹ In-DTPA- Folato	¹¹¹ In-DTPA- Folato + Ácido fólico	^{99m} Tc-EC28
Sangre	0,31 ± 0,14	0,19 ± 0,07	0,34 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,231 ± 0,10	0,09 ± 0,04	0,06 ± 0,04
Corazón	2,39 ± 0,64	0,08 ± 0,01	1,57 ± 0,26	0,08 ± 0,01	2,57 ± 0,82	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Pulmón	2,08 ± 0,40	0,15 ± 0,04	2,22 ± 0,63	0,31 ± 0,26	1,72 ± 0,61	0,09 ± 0,2	0,05 ± 0,01
Hígado	3,44 ± 2,19	1,37 ± 0,98	3,56 ± 0,25	1,15 ± 0,22	5,21 ± 2,63	0,81 ± 0,03	0,50 ± 0,26
Bazo	2,68 ± 2,49	2,99 ± 1,43	0,95 ± 0,15	0,38 ± 0,33	3,30 ± 2,33	1,46 ± 0,73	0,60 ± 0,38
Intestino	1,70 ± 0,55	0,32 ± 0,11	2,56 ± 0,61	2,93 ± 1,49	1,87 ± 0,69	0,82 ± 0,14	0,47 ± 0,19
Riñón	98,0 ± 40,7	5,94 ± 0,52	1,38 ± 12,4	5,64 ± 2,13	1,91 ± 79,2	3,14 ± 1,96	0,62 ± 0,14
Músculo	0,99 ± 0,28	0,09 ± 0,11	0,67 ± 0,20	0,06 ± 0,02	1,19 ± 0,48	0,05 ± 0,04	0,02 ± 0,01
Estómago	1,47 ± 0,58	0,10 ± 0,03	1,45 ± 0,55	3,35 ± 5,19	1,62 ± 0,65	0,25 ± 0,20	0,21 ± 0,19
Tumor	9,83 ± 2,77	0,43 ± 0,52	17,2 ± 1,02	0,45 ± 0,18	19,3 ± 5,86	0,46 ± 0,42	0,11 ± 0,06
Tumor/ Sangre	34,1 ± 7,41	2,00 ± 2,00	51,0 ± 8,20	4,70 ± 1,30	102 ± 43,4	5,00 ± 4,60	2,00 ± 0,50

* Los valores mostrados representan la media ± la D.E. de los datos de 3 animales.

Se demostró además la dirección específica hacia el folato mediante dos procedimientos distintos. En primer lugar, se bloqueó de manera eficaz (> 94 %) la acumulación de $^{99m}\text{Tc-EC14}$, $^{99m}\text{Tc-EC20}$ y $^{111}\text{In-DTPA-folato}$ en el tumor positivo en RF y en los riñones al administrar conjuntamente estos agentes con un exceso de 100 veces de ácido fólico. En segundo lugar, el agente de control $^{99m}\text{Tc-EC28}$ no se acumuló de manera apreciable en los riñones ni en el tumor. Ambas observaciones muestran que se requiere un resto "de tipo folato" (o pterato) intacto para proporcionar la captación dirigida y la retención de estos agentes radiofarmacéuticos en los tejidos positivos en RF.

Ejemplo 12

Gammagrafía

Se inocularon células tumorales M109 (1×10^6 por animal) en el tejido subcutáneo de la axila derecha de ratones Balb/c dos semanas antes del experimento. Los animales recibieron una dosis i.v. de aproximadamente $50 \mu\text{mol/kg}$ del artículo de ensayo en un volumen de $100 \mu\text{l}$ a través de una vena lateral de la cola durante una breve anestesia con éter dietílico. Cuatro horas después de la inyección, se sacrificaron los animales mediante asfixia con CO_2 y se colocaron después en la parte superior de una superficie de adquisición de imágenes. Se realizó la adquisición de imágenes de todo el cuerpo durante 1 minuto y a una velocidad de recuento de 50-75.000 recuentos por minuto usando una cámara para rayos gamma radioisótopos Sigma 410 Omega 500 de Technicare. Se analizaron todos los datos usando un ordenador basado en MS-DOS de Medasys dotado del programa informático Pinnacle de Medasys.

Usando este protocolo de gammagrafía, se demostró la captación de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ por los tumores M109 positivos en RF y los riñones. Como se muestra en la Fig. 9, una imagen ventral de un ratón al que se inyectó $^{99m}\text{Tc-EC20}$ como se ha descrito anteriormente localiza la radiación gamma en los dos riñones (K) y la masa tumoral M109 (T; zona del hombro). No se observó ningún radiotrazador apreciable en otros tejidos corporales. Se ha informado de un perfil de imagen similar para el producto radiofarmacéutico $^{111}\text{In-DTPA-folato}$.

Ejemplo 13

Excreción urinaria y metabolismo

Se obtuvo el perfil de especiación por HPLC urinario de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ usando ratones Balb/c. Se inyectó a los ratones (cada uno de $\sim 20 \text{ g}$) 1 mCi ($6,7 \text{ nmol}$) de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ a través de una vena lateral de la cola. Tras un período de tiempo de 1, 4 o 6 horas, se sacrificaron grupos de dos ratones mediante asfixia con CO_2 y se recogió la orina. Tras la filtración a través de un filtro Millex GV13, se evaluó la especiación radioquímica usando un sistema de HPLC dotado de una columna C18, de $3,9 \times 150 \text{ mm}$, Nova-Pak y un detector radioquímico. Se eluyó isocráticamente el sistema con metanol al 20 % que contenía TFA al 0,1 % a un caudal de 1 ml/minuto .

Se determinó previamente que la vía de eliminación principal del $^{111}\text{In-DTPA-folato}$ era a través de la orina. De manera similar al perfil de HPLC mostrado en la Fig. 2, tanto el patrón de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ como las muestras de orina presentaron cuatro picos radiactivos. Como se muestra en la Tabla 4 (que figura a continuación), la pureza radioquímica del patrón (suma de los picos C y D presumiblemente correspondientes a $^{99m}\text{Tc-EC20 syn}$ y *anti*) permaneció constante al $\sim 93 \%$ durante las 6 horas que duró el presente experimento. La cantidad de ^{99m}Tc libre en el patrón (pico A) fue del $\sim 2 \%$. Es importante destacar que se cree que el pico B de este perfil radioquímico es EC20 quelado con ^{99m}Tc en una posición menos estable, no convencional; sin embargo, no se incluyó la radiactividad medida en esta fracción en la estimación de la pureza radioquímica global para $^{99m}\text{Tc-EC20}$. Estos datos indican, en conjunto, que la formulación permaneció estable en solución salina a largo de estas 6 horas de investigación.

Después de 1 y 4 horas posteriores a la inyección en ratones Balb/C, el perfil de especiación radioquímica de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ en la orina del ratón permaneció invariable. Sin embargo, la radiactividad presente en la orina a las 6 horas de la inyección fue demasiado baja para someterse a ensayo de manera precisa mediante HPLC. La proporción de fármaco original entre las especies radiactivas recuperadas en la orina permaneció relativamente constante al aproximadamente 90 % a lo largo de las cuatro horas durante las cuales se pudo cuantificar. Este valor es muy similar a la pureza del 93 % del patrón que indica que el $^{99m}\text{Tc-EC20}$ se excreta predominantemente en la orina en una forma no modificada.

Tabla 4. Excreción y metabolismo de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ de los ratones Balb/c. Se inyectó a los ratones 1 mCi (6,7 nmol) de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ a través de una vena lateral de la cola. En los puntos temporales indicados, se sacrificaron grupos de dos ratones y se extrajo la orina. A continuación, se determinó la especiación radioquímica mediante HPLC. La suma de los picos C y D (isómeros *syn* y *anti*) en porcentaje de superficie se usa para calcular la pureza global de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ intacto.

Pico	t.a. (min)	Porcentaje de superficie						
		Patrón de $^{99m}\text{Tc-EC20}$			Muestras de orina (dos ratones/punto temporal)			
		0 h	1 h	6 h	1 h		4 h	
A (pertechnetato)	1,4	2	2,1	1,8	8,3	6,3	9,4	10,2
B (desconocido)	3,4	4,5	4,5	4,8	2,5	2,6	5,4	0
C (isómero 1)	5,5	15,5	15,7	15,9	20,4	18,1	7,3	11,1
D (isómero 2)	18,5	78	77,7	77,5	68,8	73	77,9	78,7
Suma de C y D		93,5	93,4	93,4	89,2	91,1	85,2	89,8

Ejemplo 14

Unión de proteína sérica

Se usaron suero de rata recién preparado y suero comercial de ser humano varón (donantes de tipo AB, Sigma Chemical Co.) para evaluar la unión *in vitro* de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ con proteínas séricas. Un minuto después de mezclar el $^{99m}\text{Tc-EC20}$ con 1 ml de suero a temperatura ambiente, se transfirieron 0,3 ml de la solución de suero a un dispositivo de ultrafiltración limpio Centrifree® de Amicon (30.000 NMWL) por triplicado. Durante un minuto de carga de la centrifugadora con la solución de suero, se centrifugó el dispositivo a 1.000 x g durante 20 minutos a 20 °C. Se transfirieron 50 µl de muestras de la solución original, y del filtrado de cada dispositivo, a un tubo limpio y se realizó el recuento en un contador gamma automático. Se ultrafiltró una solución de control de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ mezclada con 1 ml de solución salina normal de una manera idéntica. Se calculó el porcentaje de ^{99m}Tc libre para cada una de las tres muestras.

Aunque el $^{99m}\text{Tc-EC20}$ solo presentó un nivel menor de unión inespecífica con el dispositivo de ultrafiltración (~50), se descubrió que aproximadamente el 70 % del mismo se asoció predominantemente con la fracción de proteína sérica de > 30 kDa en soluciones suero de rata o humano (69 % y 72 %, respectivamente). Es importante destacar que, como el $^{99m}\text{Tc-EC20}$ se acumula eficaz y preferentemente dentro de los tejidos positivos en RF (véase la Tabla 2 y la Fig. 8), su evidente afinidad por las proteínas séricas no parece afectar a la capacidad de este radiotrazador para dirigirse a los RF *in vivo*.

Ejemplo 15

Estudios de distribución tisular

Los protocolos usados en el presente ejemplo son similares a los descritos en el Ejemplo 11. Se evaluó además la capacidad de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ para dirigirse a tumores *in vivo* usando un modelo M109 positivo en RF y un modelo de tumor 4T1 negativo en RF. Se adquirieron ratones Balb/c hembra de seis semanas de edad (n = 3/grupo de dosis) de Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianápolis, IN) y se mantuvieron con una dieta libre de folato (Harlan TEKLAD) durante un total de siete días antes de la inoculación de las células tumorales.

Se inocularon células tumorales M109 positivas en RF, singénicas (2×10^6 P₀ por animal) o células 4T1 negativas en RF (5×10^5 P₀ por animal) subcutáneamente en 100 µl de RPMI-1640 libre de folato que contenía suero murino singénico. Se preparó una solución madre de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ que contenía 100 µg de agente por mililitro el día que se usó como se ha descrito anteriormente.

Dieciséis días después de la inoculación de las células tumorales, se inyectaron a los animales por vía intravenosa 500 o 1.800 nmol/kg de EC20 para los animales portadores de tumores M109 y 500 nmol/kg de EC20 para los animales portadores de tumores 4T1 (3 ratones por grupo de dosis). Todas las inyecciones fueron en volúmenes de 100 µl. Cuatro horas después de la inyección, se sacrificaron los animales por asfixia con CO₂, se extrajo la sangre

por punción cardiaca y se diseccionaron los animales. Se extirparon los tejidos seleccionados (corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones, intestinos, estómago, musculares y tumorales), se pesaron y se realizó el recuento en un contador gamma automático para determinar la distribución de ^{99m}Tc. La captación del producto radiofarmacéutico en términos de porcentaje de dosis inyectada de peso húmedo de tejido (% DI/g) se calculó por referencia a patrones preparados a partir de diluciones de la preparación inyectada.

Como se muestra en la Fig. 11, se demostró la dirección específica al receptor de folato, porque el ^{99m}Tc-EC20 se acumuló predominantemente en los tumores M109 positivos en RF y en los riñones, y no en los tumores 4T1 negativos en RF. La captación en los tumores 4T1 negativos en RF fue 7,6 veces inferior que en los tumores M109 positivos en RF. La captación de ^{99m}Tc-EC20 en los tejidos normales, a excepción, como era de esperar, del riñón, fue baja. Estos resultados muestran que la dirección de ^{99m}Tc-EC20 es específica de los RF.

Ejemplo 16

Estudios de distribución tisular

Los protocolos usados en el presente ejemplo son similares a los descritos en el Ejemplo 11. Se evaluó la capacidad de ^{99m}Tc-EC11 (péptido A₁), ^{99m}Tc-EC13 (péptido A₃) y ^{99m}Tc-EC14 (péptido A₂) para dirigirse a tumores *in vivo* usando un modelo de tumor KB positivo en RF. Se mantuvieron ratones atímicos macho de cuatro semanas de edad (n = 4/grupo) a una dieta libre de folato durante un total de diez días antes de la inoculación de las células tumorales.

Se inocularon células tumorales KB positivas en RF (0,25 x 10⁶ por animal) subcutáneamente en la región intracapsular. Catorce días después de la inoculación de las células tumorales, se inyectaron a los animales (n = 4/grupo) por vía intravenosa ^{99m}Tc-EC11, ^{99m}Tc-EC13 y ^{99m}Tc-EC14 a las dosis (aproximadamente 12 µg/kg) de los conjugados mostrados en la Tabla 5 que figura a continuación. Las soluciones madre de ^{99m}Tc-EC11, ^{99m}Tc-EC13 y ^{99m}Tc-EC14 se prepararon el día de su uso como se ha descrito anteriormente. Se administró conjuntamente un exceso de aproximadamente 20 veces de folato libre (unos 200 µg/kg) a los animales de control (n = 4/grupo). Cuatro horas después de la inyección, se sacrificaron los animales por asfixia con CO₂, se extrajo la sangre por punción cardiaca y se diseccionaron los animales. Se extirparon los tejidos seleccionados, se pesaron y se realizó el recuento en un contador gamma automático para determinar la distribución de ^{99m}Tc. La captación del producto radiofarmacéutico en términos de porcentaje de dosis inyectada de peso húmedo de tejido (% DI/g) se calculó por referencia a patrones preparados a partir de diluciones de la preparación inyectada.

Como se muestra en la Tabla 5, se demostró la dirección específica al receptor de folato porque ^{99m}Tc-EC11, ^{99m}Tc-EC13 y ^{99m}Tc-EC14 se acumularon predominantemente en los tumores KB positivos en RF y en los riñones. La acumulación fue bloqueada por la administración de ácido fólico libre. Estos resultados muestran que ^{99m}Tc-EC11, ^{99m}Tc-EC13 y ^{99m}Tc-EC14 se pueden dirigir a tumores *in vivo* de manera específica de los RF.

Se obtuvieron resultados similares (véase la Tabla 6 que figura más adelante) con ^{99m}Tc-EC53 (el enantiómero D completo de EC20) usando protocolos similares, a excepción de que la dosis de ^{99m}Tc-EC53 fue de aproximadamente 50 µg, y que se usó un exceso 100 superior de folato libre o EC53 frío. Como se muestra en la Tabla 6, se demostró la dirección específica del receptor de folato, porque el ^{99m}Tc-EC53 se acumula predominantemente en los tumores KB positivos en RF y en los riñones. La acumulación fue bloqueada por la administración de ácido fólico libre. Estos resultados muestran que ^{99m}Tc-EC53 se puede dirigir a tumores *in vivo* de manera específica del RF.

TABLA 5

	Porcentaje de dosis de ^{99m} Tc inyectada por gramo (Masa húmeda de tejido)							
	Péptido A ₁ -Folato (EC 11)		Péptido A ₂ -Folato (EC14)		Péptido A ₃ -Folato (EC13)		HYNIC-Folato	
Masa tumoral (g):	0,112 ± 0,027	0,125 ± 0,032	0,160 ± 0,037	0,171 ± 0,044	0,213 ± 0,067	0,0773 ± 0,041	0,179 ± 0,060	0,150 ± 0,068
Masa del animal (g):	28,9 ± 1,3	27,1 ± 1,6	27,6 ± 0,6	27,3 ± 2,7	30,0 ± 1,3	27,5 ± 1,4	27,5 ± 1,4	29,0 ± 2,0
Cantidad de animales y género:	4M	4M	4M	4M	4M	4M	4M	4M
Dosis de conjugado de folato (µg/kg):	11,9 ± 0,5	13,04 ± 1,12	12,6 ± 0,4	12,87 ± 1,53	11,7 ± 0,9	13,03 ± 1,05	1,58 ± 0,03	1,46 ± 0,08
Dosis de ácido fólico dihidratado t (µg/kg):	0	195,1 ± 17,9	0	192,6 ± 22,9	0	191,7 ± 15,5	0	169,6 ± 9,4
(µmol/kg):	0	0,41 ± 0,04	0	0,40 ± 0,05	0	0,40 ± 0,03	0	0,36 ± 0,02

(Continuación)

	Porcentaje de dosis de ^{99m} Tc inyectada por gramo (Masa húmeda de tejido)							
	Péptido A ₁ -Folato (EC 11)		Péptido A ₂ -Folato (EC14)		Péptido A ₃ -Folato (EC13)		HYNIC-Folato	
Sangre:	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,31 ± 0,06	0,25 ± 0,01
Corazón:	2,5 ± 0,3	0,36 ± 0,03	3,0 ± 0,5	0,24 ± 0,01	1,6 ± 0,1	0,20 ± 0,03	3,4 ± 0,3	0,28 ± 0,02
Pulmones:	1,2 ± 0,2	0,35 ± 0,03	1,6 ± 0,3	0,24 ± 0,02	1,1 ± 0,1	0,23 ± 0,02	1,2 ± 0,2	0,29 ± 0,03
Hígado y vesícula:	5,4 ± 1,4	1,6 ± 0,1	4,5 ± 1,0	0,66 ± 0,07	3,5 ± 0,7	0,65 ± 0,04	3,9 ± 0,9	0,62 ± 0,02
Bazo:	0,38 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,41 ± 0,06	0,15 ± 0,01	0,39 ± 0,06	0,15 ± 0,02	0,39 ± 0,12	0,17 ± 0,02
Riñón (uno):	67,8 ± 6,9	55,5 ± 2,3	44,2 ± 6,4	20,6 ± 2,4	54,5 ± 2,4	29,1 ± 2,2	41,2 ± 8,4	38,4 ± 2,6
Estómago, intestinos y contenido:	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,1	0,50 ± 0,10	2,5 ± 0,2	3,7 ± 0,7	1,5 ± 0,2	1,2 ± 1,0
Músculo:	1,8 ± 0,1	0,38 ± 0,06	2,4 ± 0,4	0,26 ± 0,02	1,7 ± 0,2	0,21 ± 0,03	2,2 ± 0,3	0,36 ± 0,06
Tumor:	2,95 ± 0,57	1,47 ± 0,24	5,57 ± 0,76	2,0 ± 0,5	5,46 ± 0,45	1,67 ± 0,24	4,64 ± 0,67	2,31 ± 0,27
<i>Tumor/Sangre:</i>	13,7 ± 2,1	5,9 ± 0,9	29,3 ± 5,2	17,0 ± 4,5	22,5 ± 1,4	10,2 ± 1,5	15,1 ± 2,1	9,1 ± 1,0
<i>Tumor/Hígado:</i>	0,57 ± 0,14	0,94 ± 0,09	1,3 ± 0,3	3,0 ± 0,6	1,6 ± 0,2	2,6 ± 0,3	1,3 ± 0,3	3,7 ± 0,5
<i>Tumor/Riñón:</i>	0,043 ± 0,005	0,027 ± 0,005	0,13 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,058 ± 0,010	0,11 ± 0,01	0,069 ± 0,003
<i>Tumor/Músculo:</i>	1,6 ± 0,3	3,9 ± 0,08	2,4 ± 0,6	7,7 ± 1,7	3,3 ± 0,3	8,2 ± 2,0	2,1 ± 0,4	6,5 ± 1,3

Los valores mostrados representan la media ± la desviación típica. Se supuso que la sangre representaba el 5,5 % de la masa corporal total.
 Las proporciones de tumor/tejido de fondo se basaron en los correspondientes datos de % de dosis inyectada por gramo.
 † Dosis de ácido fólico inyectada junto con la dosis de conjugado de ^{99m}Tc-Folato.
 n = 3

TABLA 6

	^{99m} Tc-EC53		^{99m} Tc-EC53 más ácido fólico		^{99m} Tc-EC53 más EC53	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Dosis del artículo de ensayo (ug/kg)	50,0		50,0		50,0	
(nmol/kg)	67,0		67,0		67,0	
Competidor coadministrado (nmol/kg)			6700,0		6700,0	
Masa tumoral (g)	0,2	0,17	0,20	0,14	0,19	0,15
Animales	3H		3H		3H	
Sangre	0,38	0,03	0,244	0,028	0,24	0,06
Corazón	1,09	0,28	0,15	0,03	0,19	0,03
Pulmón	0,89	0,30	0,23	0,04	0,26	0,07
Hígado	3,86	0,96	4,49	1,15	3,77	0,48
Intestino	3,53	0,86	4,33	3,67	3,96	1,86

(Continuación)

	^{99m} Tc-EC53		^{99m} Tc-EC53 más ácido fólico		^{99m} Tc-EC53 más EC53	
Riñón	77,99	6,19	10,12	6,91	7,97	1,52
Músculo	0,76	0,31	0,11	0,04	0,12	0,06
Bazo	0,67	0,22	0,27	0,06	0,41	0,11
Estómago	1,04	0,36	0,30	0,15	0,18	0,01
Tumor	11,77	4,26	0,53	0,11	1,88	1,56
Tumor/Sangre	31,4	13,7	2,2	0,6	4,5	4,8
Tumor/Hígado	3,4	2,2	0,1	0,0	0,3	0,4
Tumor/Músculo	17,1	7,0	5,2	1,4	8,5	8,0
Tumor/Riñón	0,2	0,07	0,07	0,05	0,14	0,16

DISCUSIÓN

La invención proporciona un procedimiento que incluye un conjugado de un folato y un quelante de radionúclido para el desarrollo clínico como agente de formación de imágenes. Los ejemplos de dicho agente de formación de imágenes es el quelante de radionúclido a base de folato recientemente diseñado, sintetizado y caracterizado radioquímicamente, ^{99m}Tc-EC20.

^{99m}Tc-EC20, un derivado peptídico de bajo peso molecular de folato que contiene un enlace peptídico D-γ-Glu (véase la Fig. 1), se sintetizó usando un procedimiento sintético eficaz en fase sólida. En su forma natural, el folato (o pteroil-glutamato) tiene un solo residuo de glutamilo presente en una configuración L. Sin embargo, se incorporó un residuo de enantiómero D-Glu en la molécula de EC20. Es importante destacar que, al igual que en EC20, la sustitución del residuo de L-Glu en el ácido fólico con un residuo de D-Glu no modifica la capacidad del ácido fólico para unirse al RF de alta afinidad.

Se descubrió que EC20 quela eficazmente ^{99m}Tc cuando está en presencia de α-D-glucoheptonato y cloruro de estaño (II). Cuando se analizó mediante HPLC radioquímica, > 95 % de la formulación de ^{99m}Tc-EC20 resultante consistía en una mezcla de estereoisómeros *syn* y *anti*, cada uno igualmente capaz de unirse a RF con alta afinidad (véase la Fig. 3). Aproximadamente el 3 % del ^{99m}Tc de la formulación estaba quelado a EC20 en algún otro sitio de la molécula de EC20 diferente del resto de Dap-Asp-Cys esperado. Aunque este componente no se aisló en cantidad suficiente para realizar una caracterización óptima, se demostró que se une a RF con alta afinidad (véase la Fig. 6). Finalmente, el 2 % restante de la radiactividad de la formulación de ^{99m}Tc-EC20 se atribuyó al ^{99m}Tc libre.

^{99m}Tc-EC20 demostró una asociación dependiente tanto del tiempo como de la concentración con células positivas en RF. ^{99m}Tc-EC20 se aclaró rápidamente de la sangre (T_{1/2} ~4 min), lo cual es importante para los agentes de formación de imágenes de diagnóstico, y ^{99m}Tc-EC20 se acumuló preferentemente en grandes cantidades dentro de los tumores positivos en RF.

El rendimiento de ^{99m}Tc-EC20 se comparó directamente con el de un agente de dirección a RF similar, ¹¹¹In-DTPA-folato, usando dos procedimientos diferentes. En primer lugar, se descubrió que ambos productos radiofarmacéuticos a base de folato compiten por igual con el ácido fólico para unirse a los RF de KB (véase la Fig. 3 y la Tabla 1). En segundo lugar, la biodistribución de cada agente en ratones portadores del tumor fue casi idéntica (véase la Tabla 2). Se midieron la alta captación de los tumores y las altas proporciones de tumor con respecto a la sangre para ^{99m}Tc-EC20. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que al igual que el ¹¹¹In-DTPA-folato, el ^{99m}Tc-EC20 se localizará eficazmente en los tumores positivos en RF cuando se administra clínicamente a los pacientes.

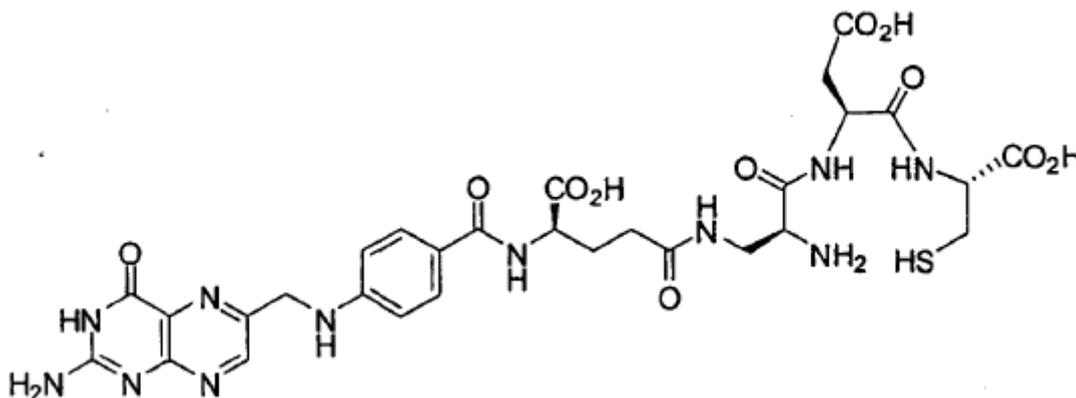
Son varios los conjugados de ^{99m}Tc a base de folato ya descritos. Hay datos de biodistribución limitada disponibles sobre un conjugado de ^{99m}Tc-12-amino-3,3,9,9-tetrametil-5-oxa-4,8, diaza-2,10-dodecanodiona-dioxima (OXA)-folato; sin embargo, se ha informado sobre niveles moderados (~7 % DI/g) de captación de trazador en un tumor KB. También se han publicado estudios que incluyen la biodistribución de un conjugado de ^{99m}Tc-etilendicisteína-folato en ratas portadoras de tumores de mama. Las ratas de aquel estudio se alimentaron con una dieta rica en folato. De este modo, se obtuvieron una baja captación tumoral y bajas proporciones de tumor con respecto a la sangre. Por último, se observó la acumulación de un derivado de ^{99m}Tc-6-hidrazinonicotinamido-hidrazido (HYNIC)-folato (HYNIC-folato) en grandes cantidades dentro de tumores 24JK-FBP. Curiosamente, el ^{99m}Tc-EC20 se acumuló dentro de tumores M109 a niveles casi idénticos a los de HYNIC-folato en tumores 241K-FBP (~17 % de DI/g) (Tabla 2). Estos dos agentes también presentaron unas proporciones de tumor con respecto a la sangre de 50:1 a las 4

horas de la inyección intravenosa.

- 5 En resumen, se creó un nuevo derivado de péptido de folato para quelar eficazmente ^{99m}Tc . Este nuevo compuesto, el ^{99m}Tc -EC20, se une con avidez a las células tumorales positivas en RF *in vitro* e *in vivo*. Se descubrió que EC20 se une a células tumorales positivas en el receptor de folato (RF) cultivadas de una manera dependiente tanto del tiempo como de la concentración con muy alta afinidad ($K_D \sim 3$ nM). Usando un ensayo de afinidad relativa *in vitro*, también se descubrió que EC20 compite eficazmente con ^3H -ácido fólico por la unión celular cuando se presenta bien solo o en forma de un quelato de metal formulado. Tras la inyección intravenosa en ratones Balb/c, el ^{99m}Tc -EC20 se retiró rápidamente de la circulación ($t_{1/2}$ en plasma ~ 4 min) y se excretó en la orina en forma no metabolizada. Los datos de gammagrafía y los estudios cuantitativos de biodistribución realizados en los ratones
- 10 Balb/c portadores de tumores M109 confirmaron que ^{99m}Tc -EC20 se acumula predominantemente en los tejidos tumorales positivos en RF y renales. Estos resultados muestran que ^{99m}Tc -EC20 es un agente de formación de imágenes de radiodiagnóstico eficaz y no invasivo para la detección de tumores positivos en RF. Otros agentes de formación de imágenes relacionados con EC20 también demostraron ser eficaces, incluyendo EC11, EC13, EC14 y EC53.
- 15 Cada año, en Estados Unidos, a ~ 26.000 mujeres se les diagnostica cáncer de ovario, y menos del 50 % de las mujeres sobrevive más de cinco años. Una de las razones de la baja tasa de supervivencia es la dificultad de diagnosticar este tipo de cáncer. Debido al temor de romper una masa abdominal no identificada y al potencial de propagación del cáncer a lo largo de la cavidad abdominal, no se suele realizar la biopsia con aguja fina. En su lugar, el diagnóstico y la estadificación de las masas ováricas sospechosas normalmente se realizan a través de una
- 20 laparotomía quirúrgica, que es un procedimiento invasivo y costoso. Como el ^{99m}Tc -EC20 se une estrechamente con el RF presente en grandes cantidades en los cánceres de ovario (entre otros), este producto radiofarmacéutico proporciona un procedimiento barato y no invasivo, pero fiable para el diagnóstico precoz del cáncer de ovario maligno. Es importante destacar que el ^{99m}Tc -EC20 también puede ayudar a guiar el procedimiento de toma de decisiones clínicas, haciendo posible un diagnóstico más definitivo y más precoz de la enfermedad recurrente o
- 25 residual.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de formación de imágenes de una población de células tumorales en un animal que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula:



- 5 quelado a un catión de un radionúclido.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células tumorales son células tumorales positivas en el receptor de folato.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las células tumorales son seleccionadas del grupo que consiste en células de carcinoma, células de carcinoma nasofaríngeo, células de sarcoma, células de linfoma, células de linfoma de Burkitt, células de la enfermedad de Hodgekin, células de melanoma, células de mesotelioma y células de mieloma.
- 10 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las células tumorales son seleccionadas del grupo que consiste en células de cáncer oral, células de cáncer nasofaríngeo, células de cáncer de tiroides, células de cáncer endocrino, células de cáncer de piel, células de cáncer gástrico, células de cáncer de esófago, células de cáncer de laringe, células de cáncer de garganta, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de colon, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de hueso, células de cáncer de ovario, células de cáncer de cuello uterino, células de cáncer de útero, células de cáncer de mama, células de cáncer de testículo, células de cáncer de próstata, células de cáncer rectal, células de cáncer renal, células de cáncer hepático, células de cáncer pulmonar y células de cáncer cerebral.
- 15 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el radionúclido es un radioisótopo de galio, indio, cobre, tecnecio y renio.
- 20 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el radionúclido es seleccionado de entre ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga y ^{68}Ga .
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el radionúclido es ^{99m}Tc .

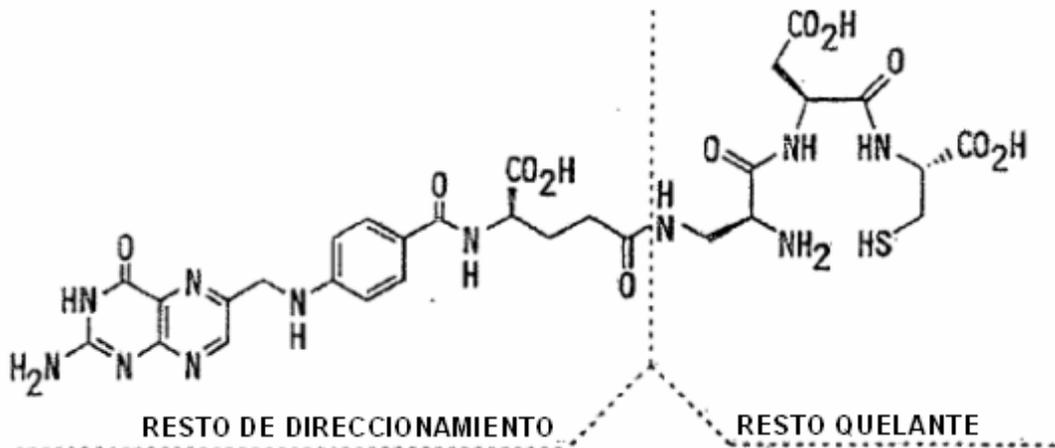


FIG. 1

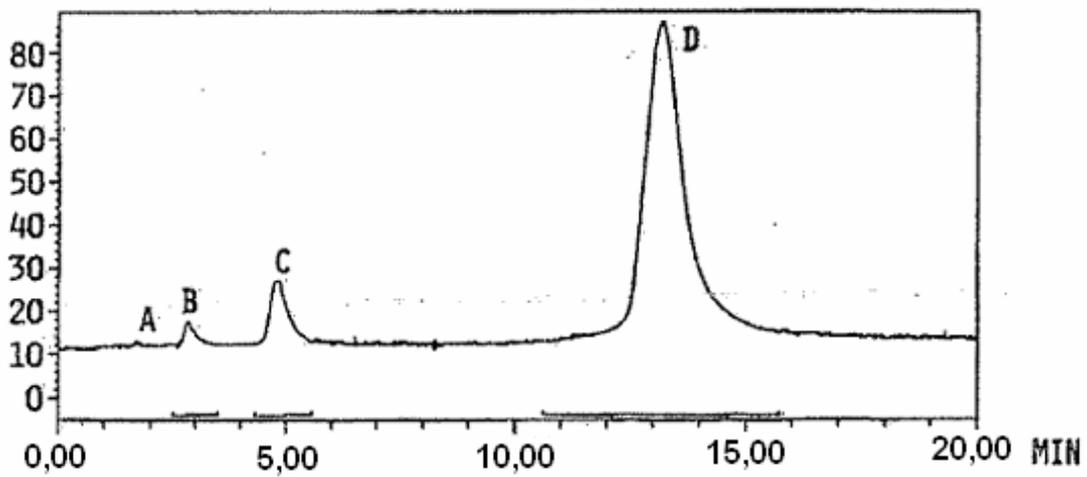


FIG. 2

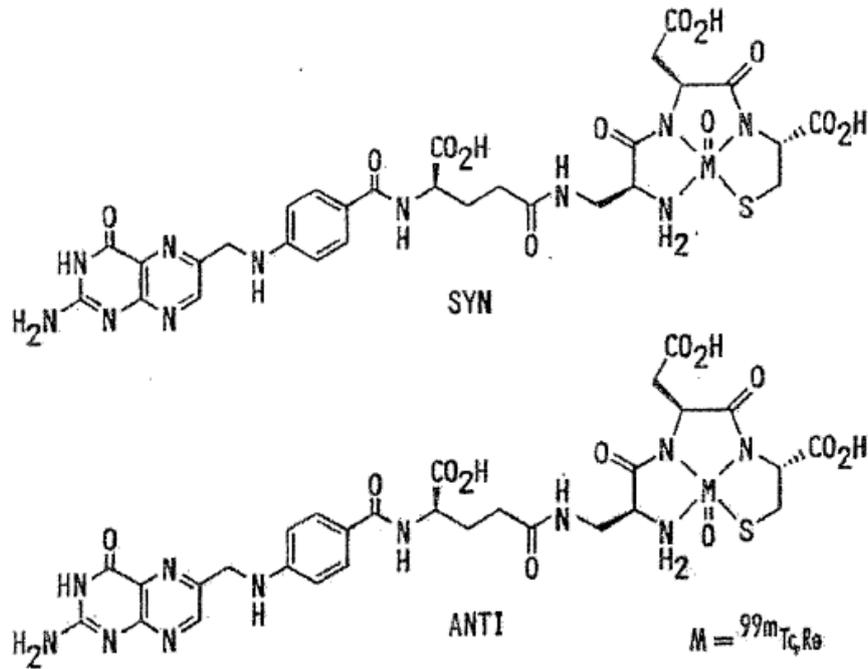


FIG. 3

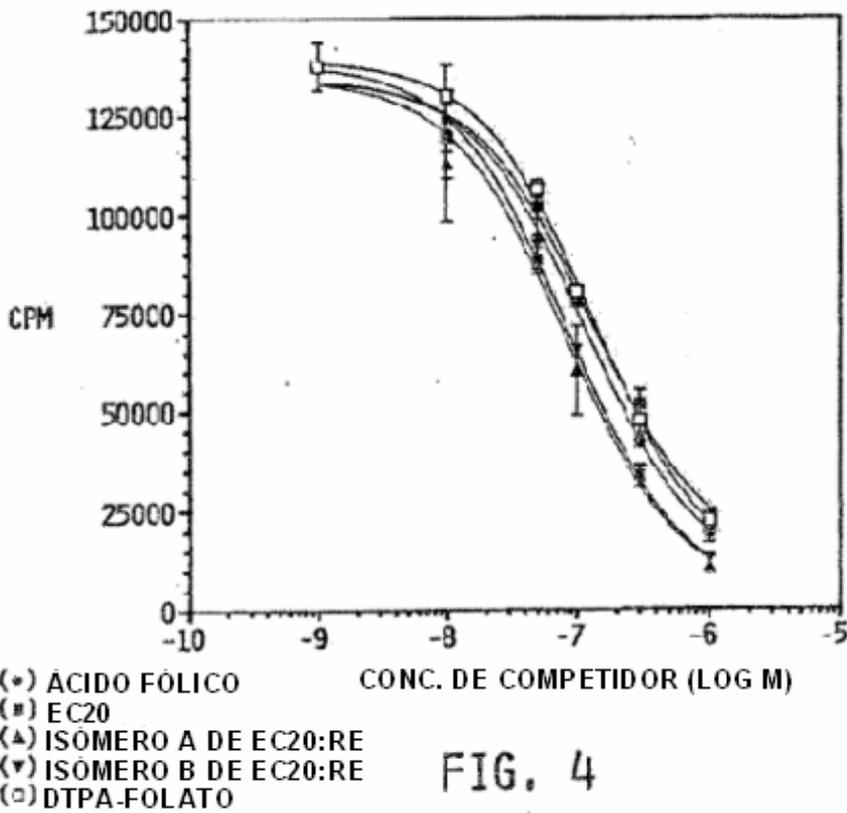


FIG. 4

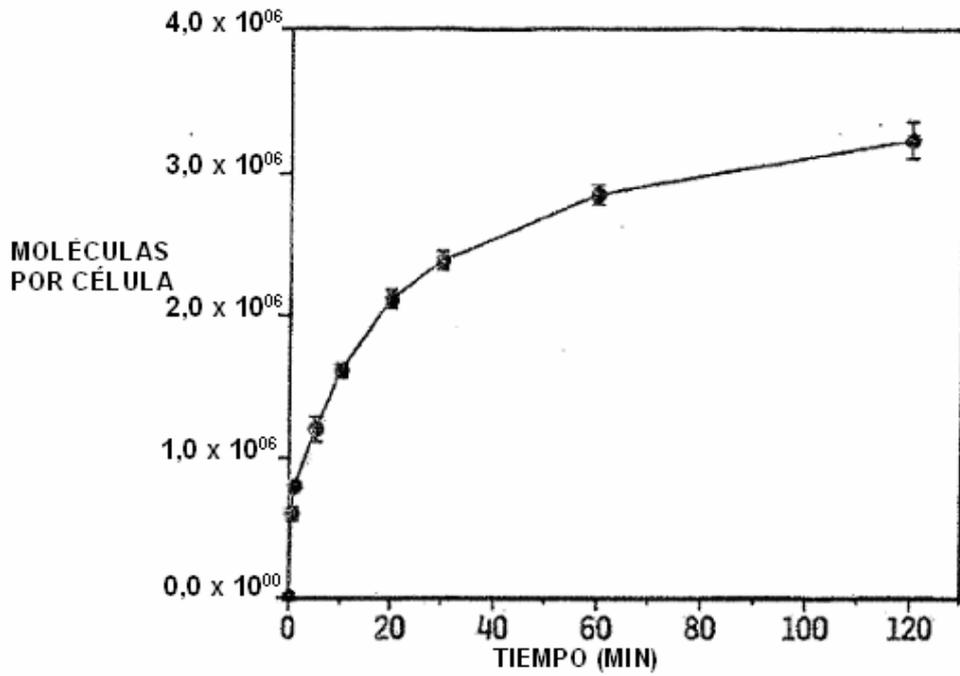


FIG. 5

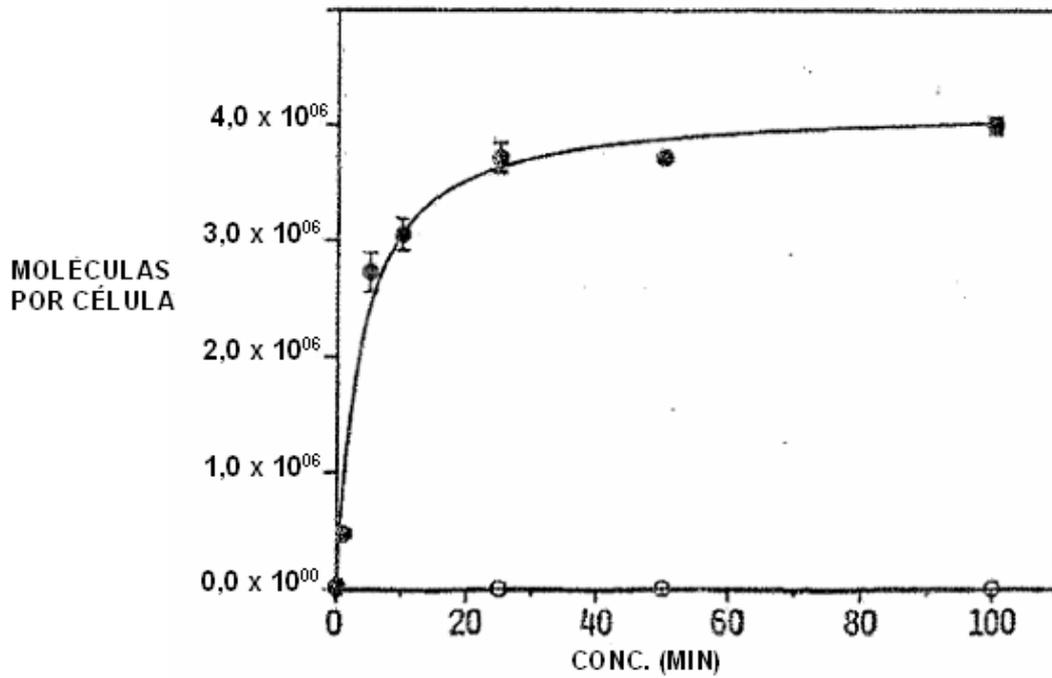


FIG. 6

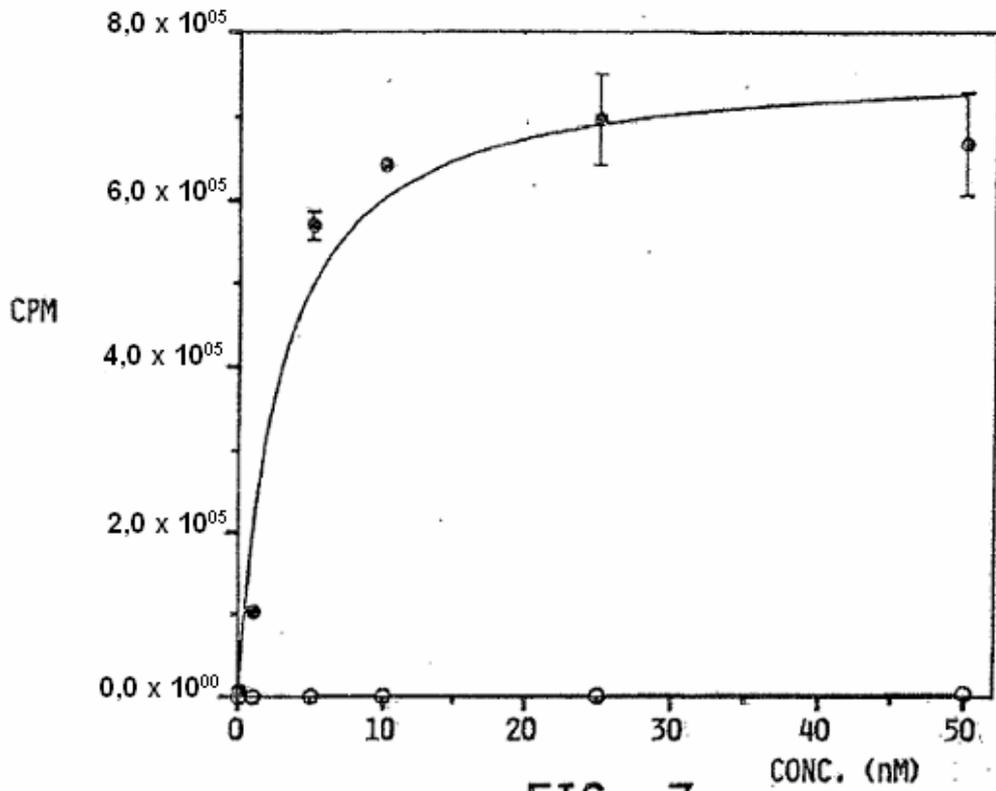


FIG. 7

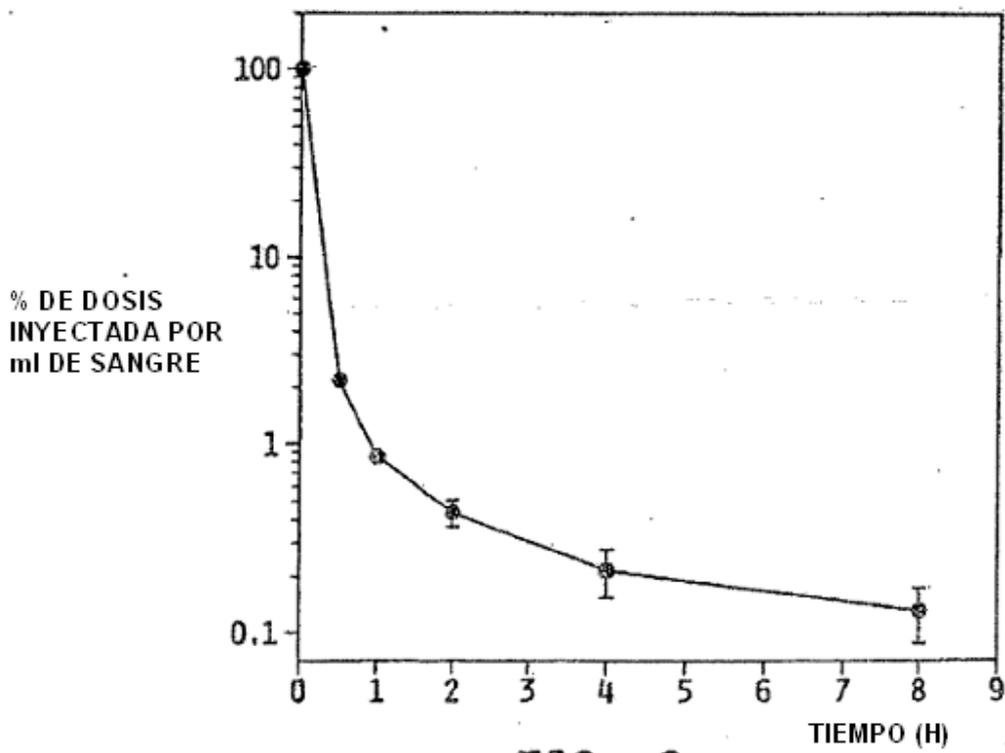


FIG. 8

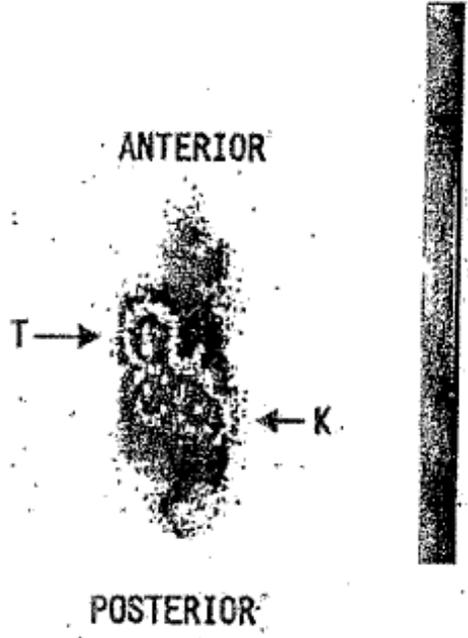


FIG. 9

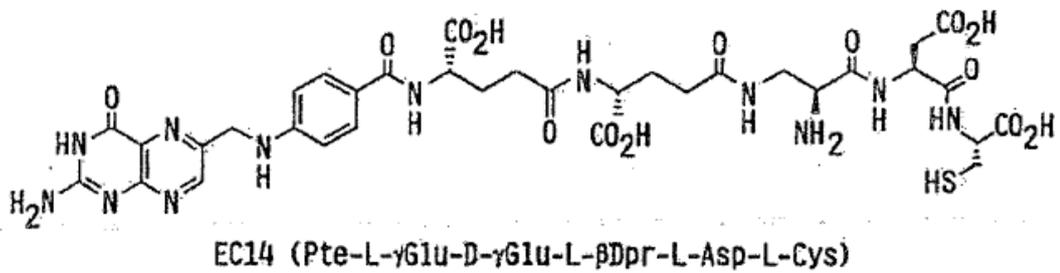
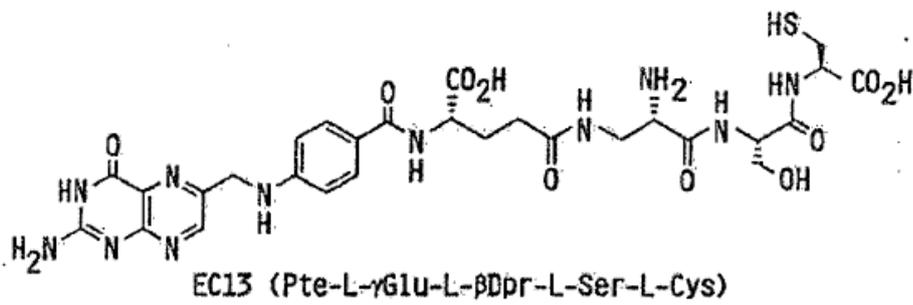
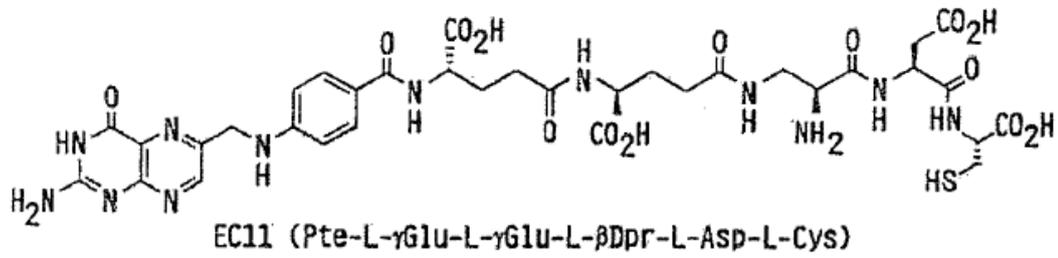


FIG. 10A

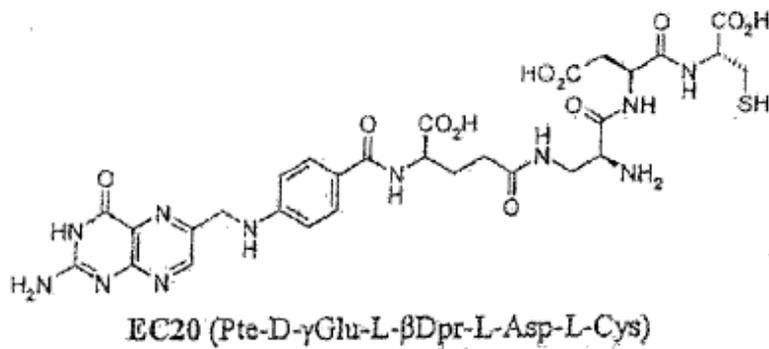
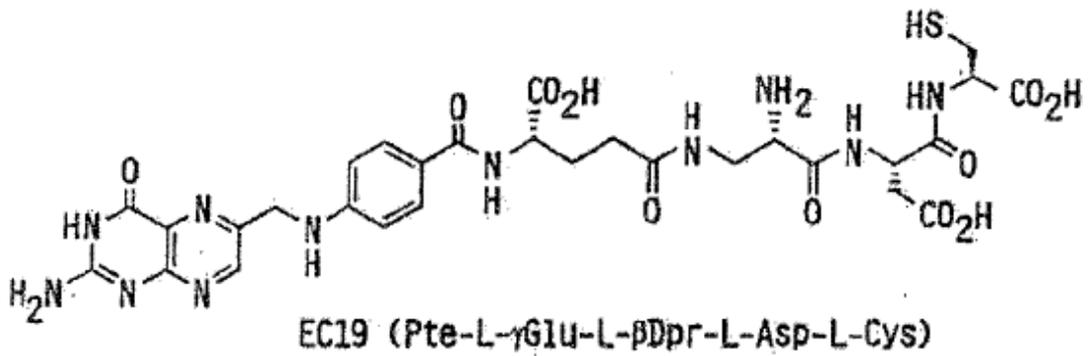
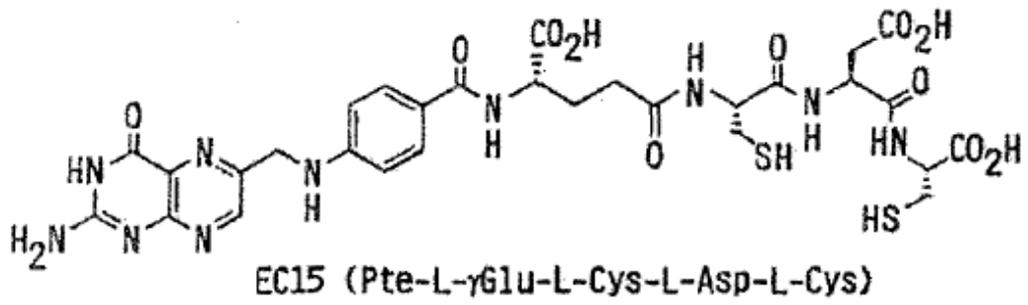
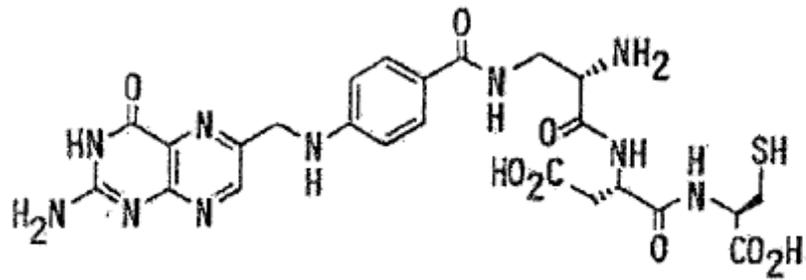
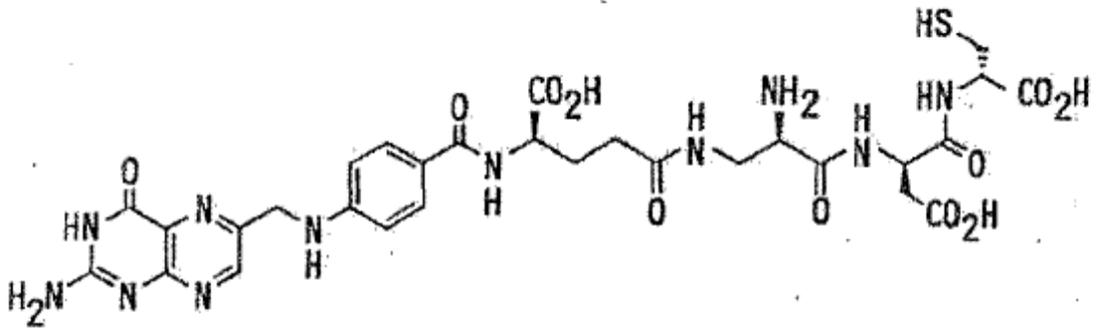


FIG. 10B



EC31 (Pte-L-βDpr-L-Asp-L-Cys)



EC53 (Pte-D-γGlu-D-βDpr-D-Asp-D-Cys)

FIG. 10C

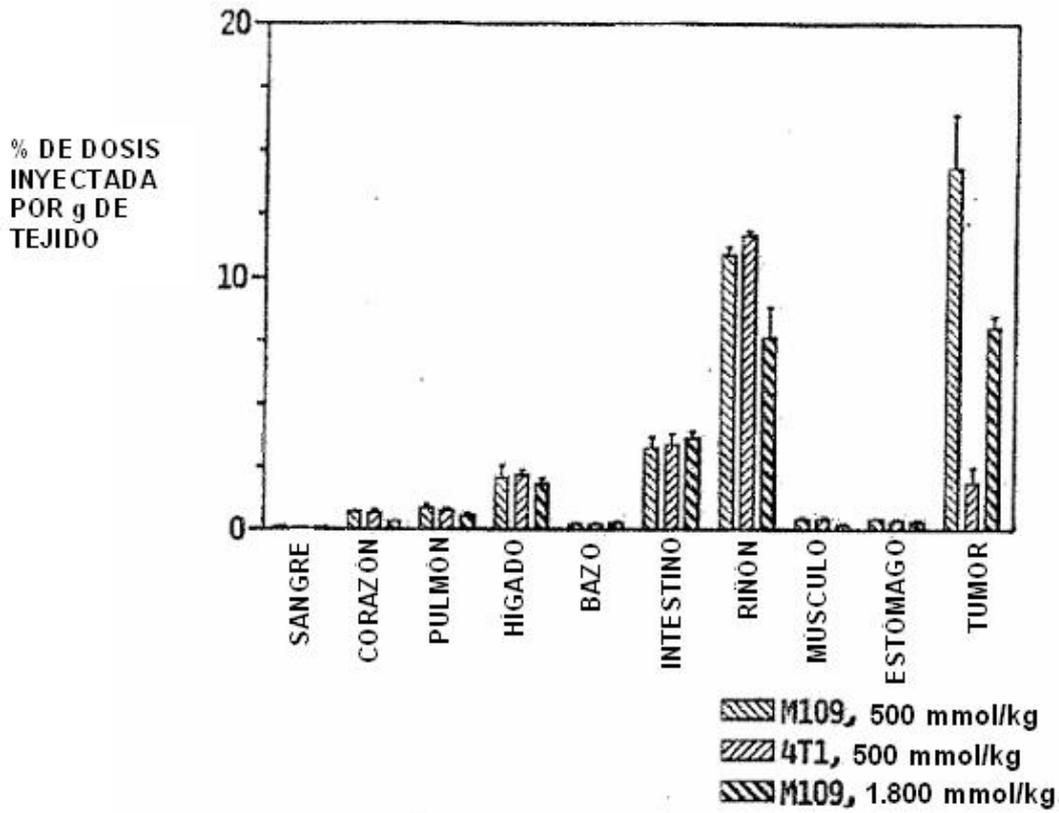


FIG. 11

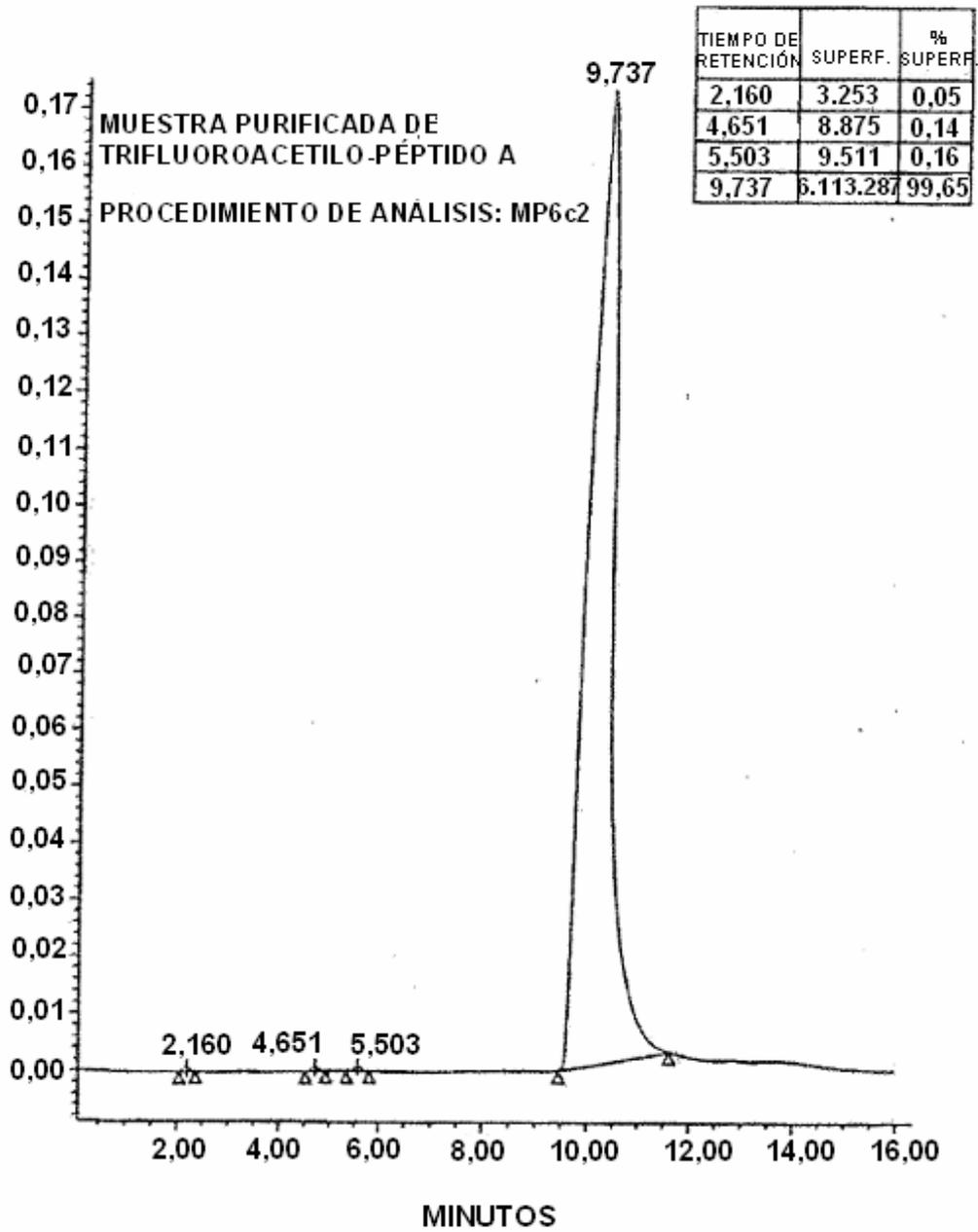


FIG. 12

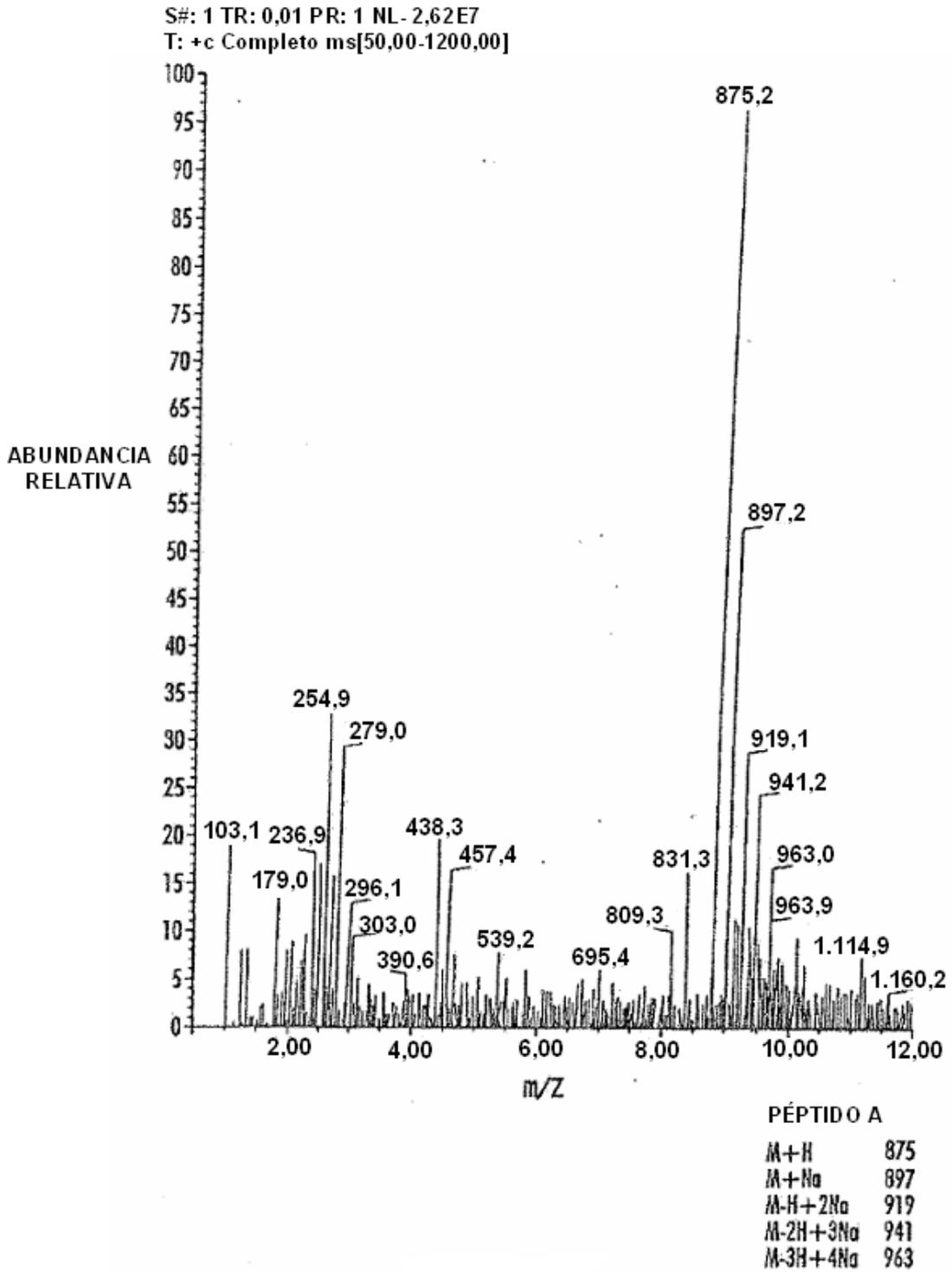


FIG. 13

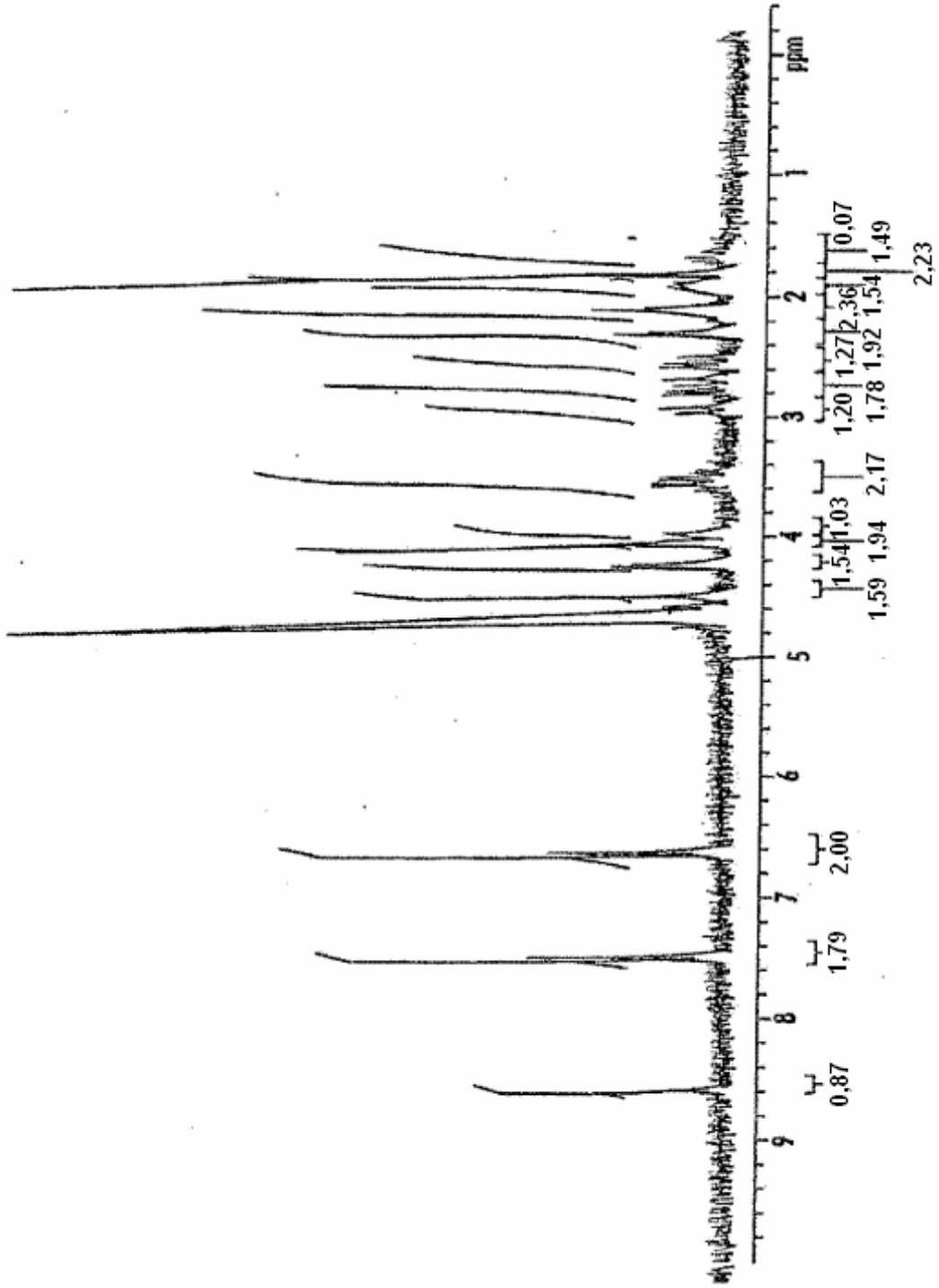


FIG. 14

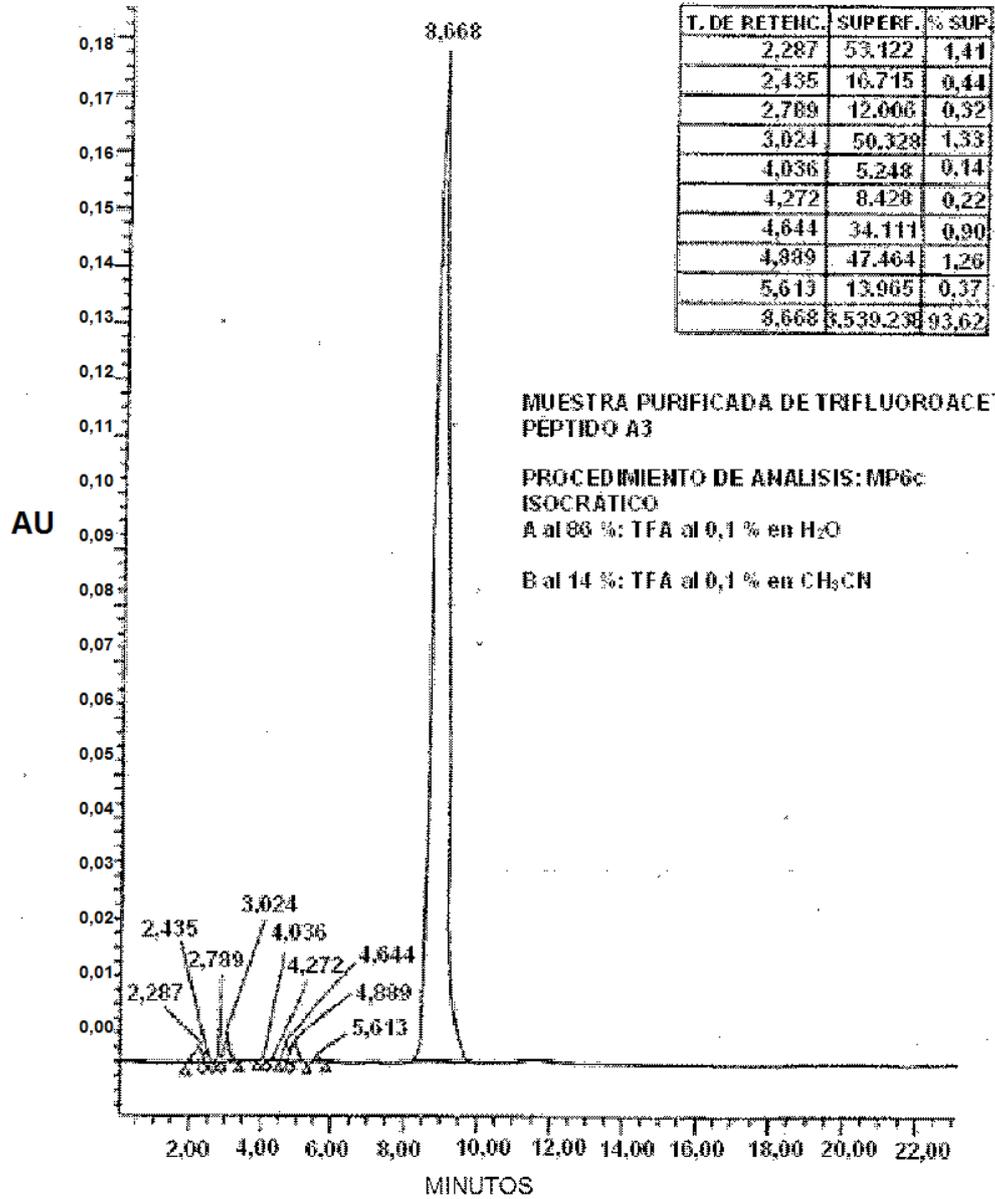


FIG. 15

MUESTRA PARKER ???
REFERENCIA CON RESPECTO A HOD 4,67 ppm A 25 °C (SIN CORREGIR)

VXR500
SONDA DE 5 mm DE DI
SECUENCIA DE IMPULSOS: s2pul

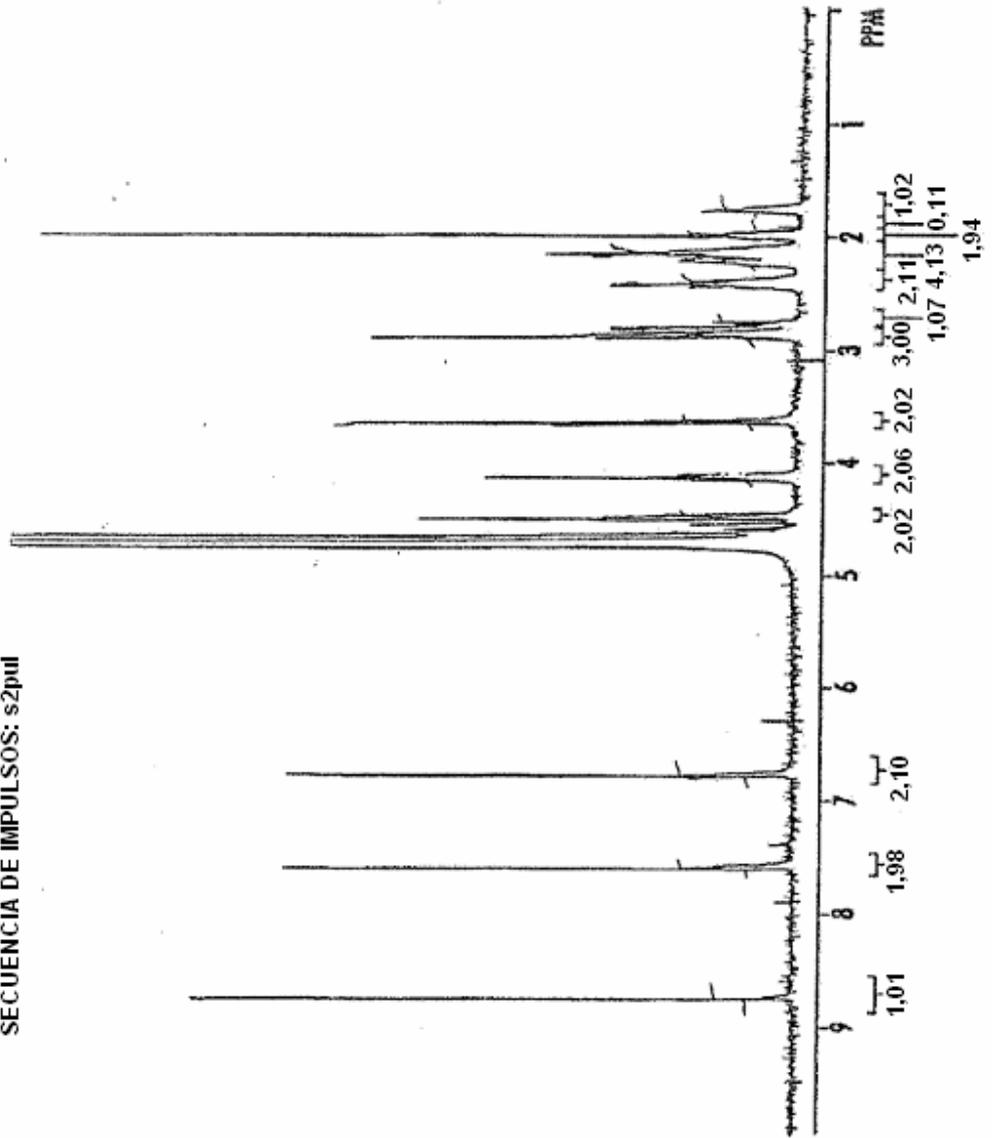


FIG. 16

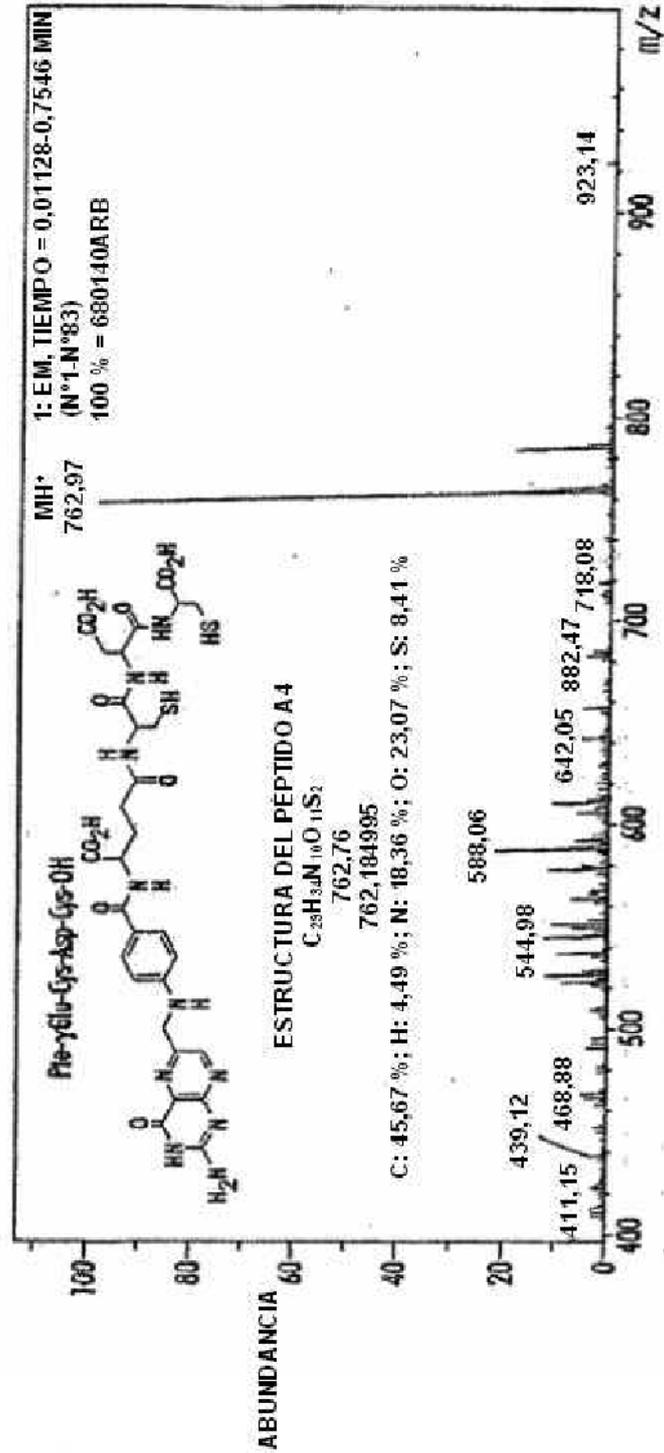
INSTRUMENTO: ESQUIRE-LC
TAREA: ADAM
PROCEDIMIENTO: OPTTUN.MS
DESCRIPCION: a4

PARAMETRO DE ADQUISICION
FUENTE: ESI
MODO: CONVENCIONAL/NORMAL
SALIDA: 60,0 V
INTERVALO DE EXPLORACION: 400,00-1.000,00 m/z
TIEMPO DE ACUM: 1152 µs

OPERADOR: ADAM
MUESTRA:

POLARIDAD: POSITIVA
SKIMMER 1: 29,0 V
CORTE: 75 m/z
SUMA TOTAL: 5 ESPECTROS

INFO DE LA MUESTRA:
NOMBRE DE LA MUESTRA:
OBSERVACIONES:

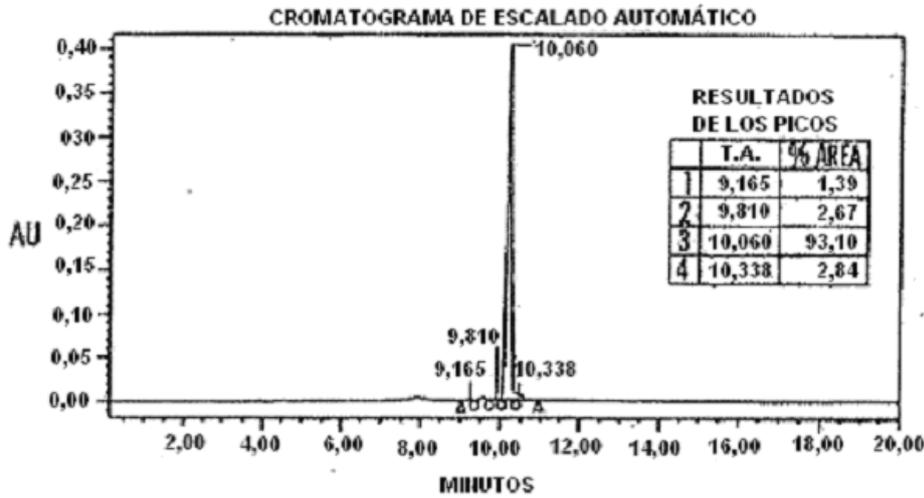


BRUKER DATAANALYSIS ESQUIRE-LC 1,4g BRUKER-FRANZEN ANALYTIK GmbH

FIG. 17

FASE MOVIL: A = TFA al 0,1 % en H₂O
 B = TFA al 0,1 % en CH₂CH
 COLUMNA: C18 SIMETRICA (4,6 X 150 mm). INYECCION: 20 µl
 GRADIENTE: B al 0 %-B al 100 %, 30 MIN. CAUDAL: 1 ml/min
 CROMATOGRAMA A 280 nm
 REALIZADO POR LE-CUI XU, Ph. D. ENDOCYTE, IIC.

HOMBRE DE LA MUESTRA	A5 (MUESTRA ANTIGUA)	TIPO DE LA MUESTRA	DESCONOCIDO
VIAL	1	FECHA ADQUIRIDA	
INYECCION	1	CONF. PROCED. ADQ	B al 60 %-B30MIN1MLMIN al 100 %
VOLUMEN DE INYECCION	20,00 µl	PROCED. DE PROCESAM.	PROCES. CL POR DEFECTO
CAÑAL	996	FECHA PROCESADA	
TIEMPO DE EJECUCION	20,0 MINUTOS		



HOMBRE DE LA MUESTRA	A5 (MUESTRA REPURIFICADA)	TIPO DE LA MUESTRA	DESCONOCIDO
VIAL	1	FECHA ADQUIRIDA	
INYECCION	1	CONF. PROCED. ADQ	B al 60 %-B30MIN1MLMIN al 100 %
VOLUMEN DE INYECCION	20,00 µl	PROCED. DE PROCESAM.	PROCES. CL POR DEFECTO
CAÑAL	996	FECHA PROCESADA	
TIEMPO DE EJECUCION	30,0 MINUTOS		

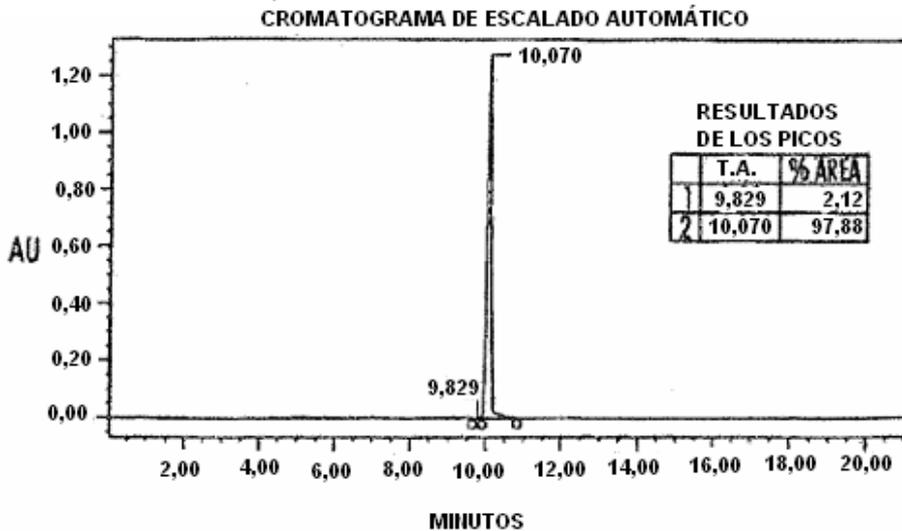


FIG. 18

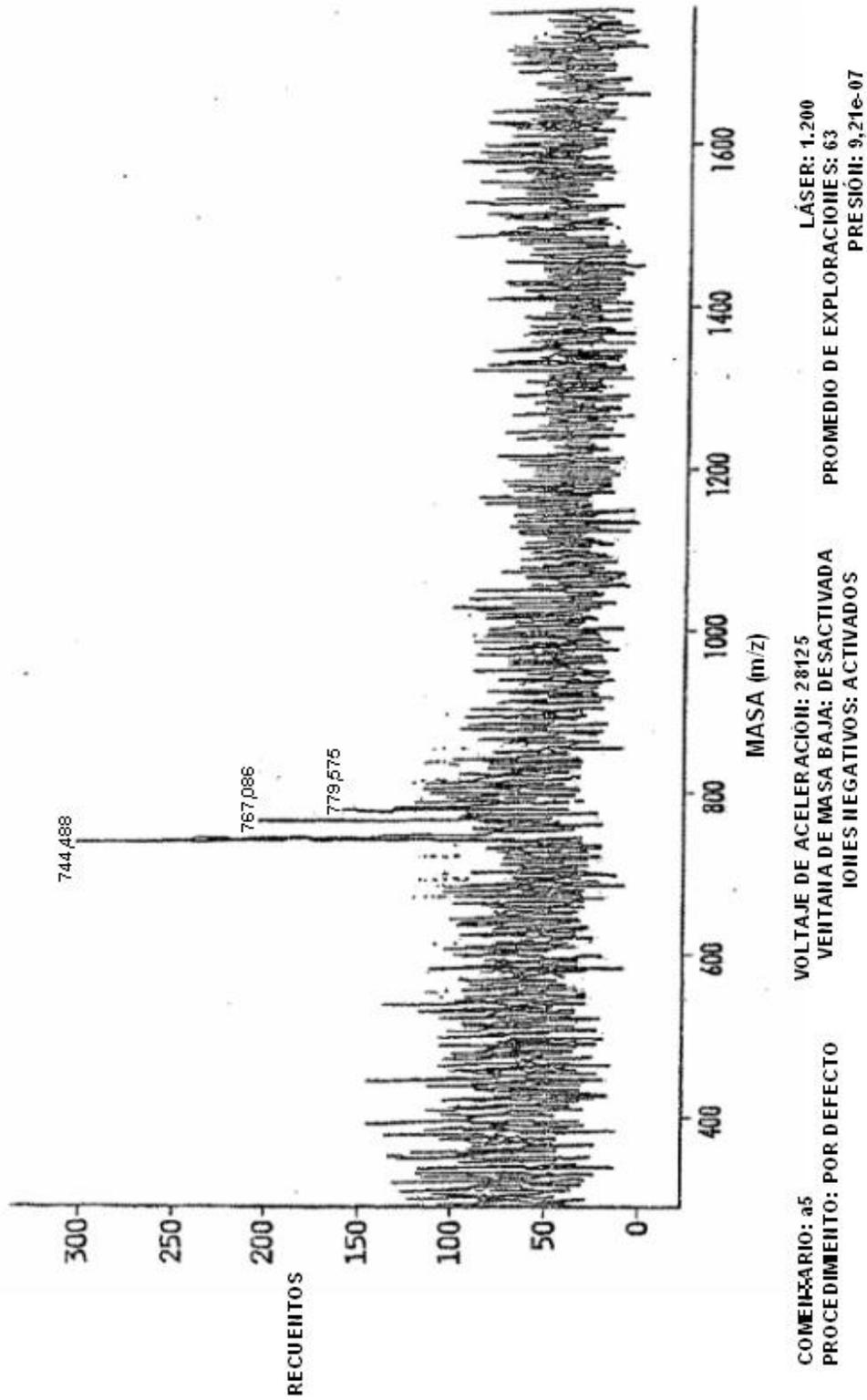
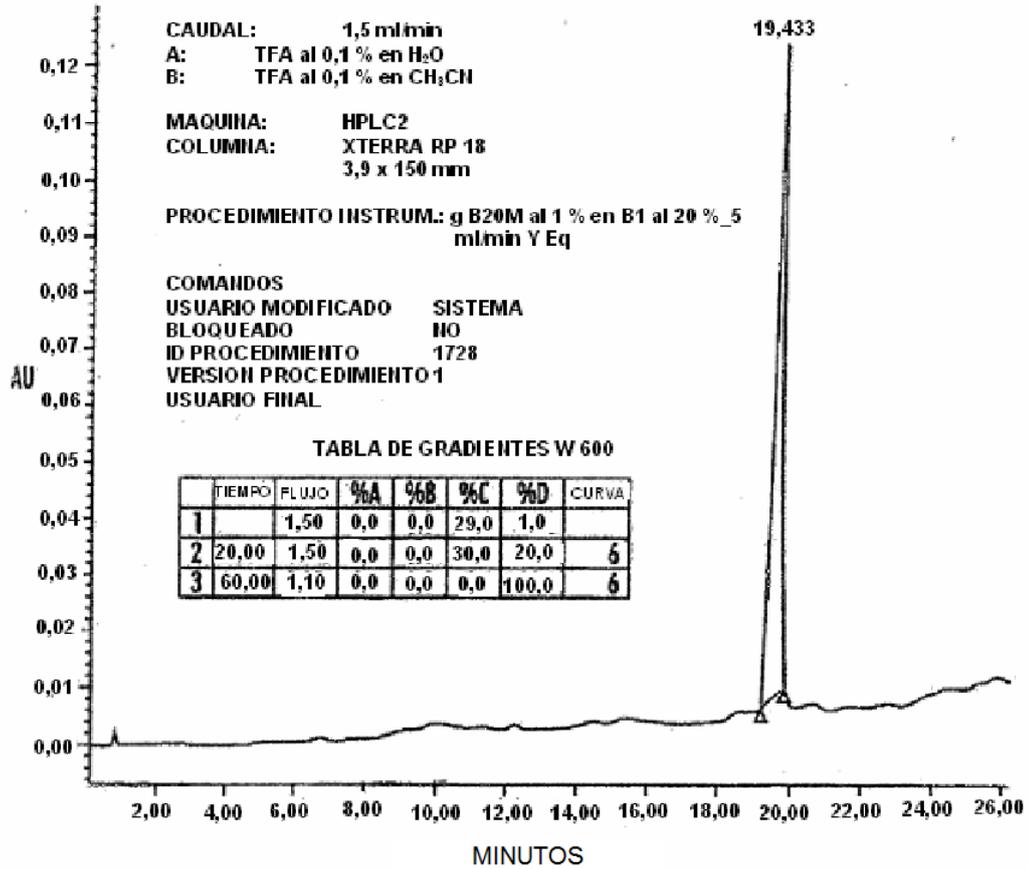


FIG. 19

HOMBRE DEL PROYECTO: EC20
 HOMBRE DE LA MUESTRA: Pte-βDap-Asp-Cys FRACCIÓN N° 2
 VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20,00 ul
 FECHA ADQUIRIDA:
 CONF. DE PROCEDIM. ADO: g B20M al 1 % en B1 al 20 %_5 ml/min Y Eq
 PROCEDIMIENTO DE PROCESAM.: 15
 FECHA ACTUAL FECHA PROCESADA:

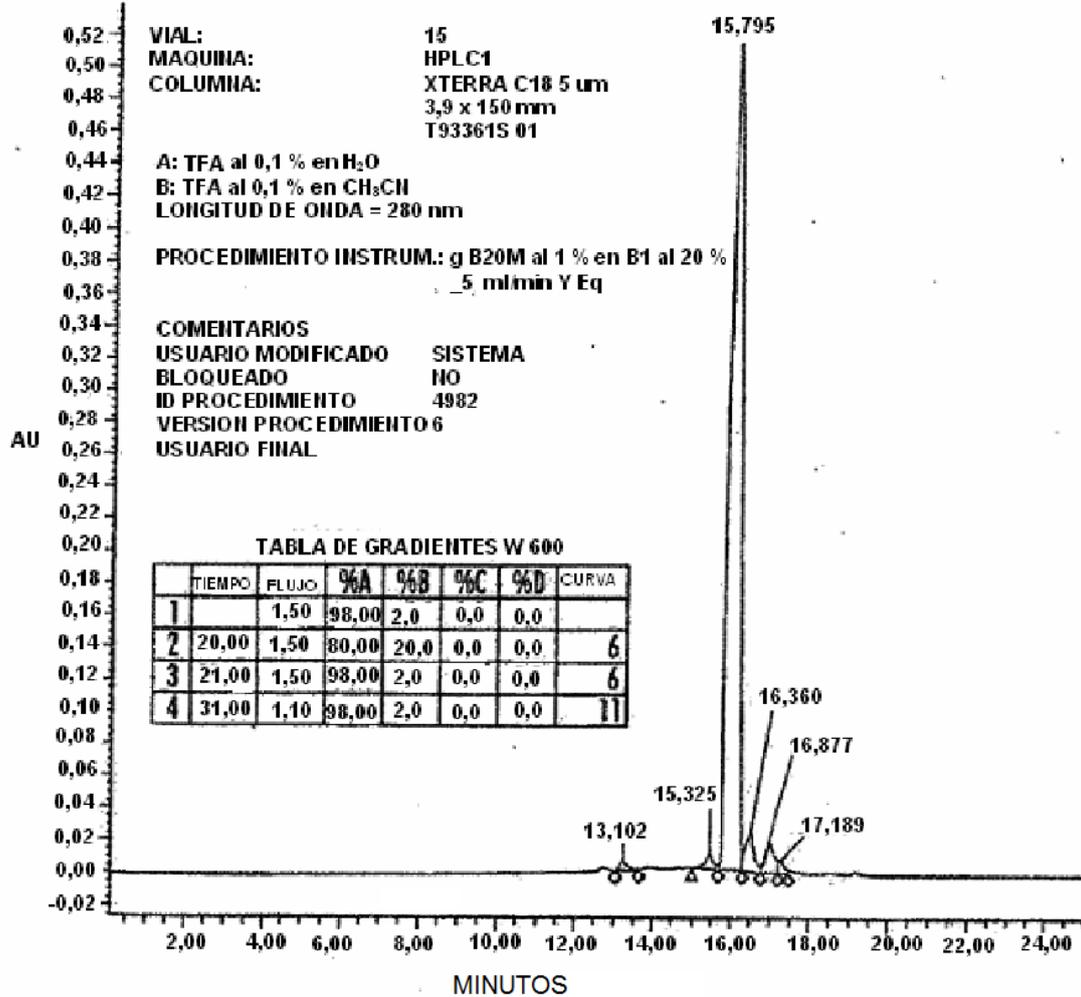


RESULTADOS DE LOS PICOS

NOMBRE	T.R.	SUPERF.	ALTURA	% SUP.
1	19,433	96,094	7,436	1,37

FIG. 20

NOMBRE DEL PROYECTO: EC20
 NOMBRE DE LA MUESTRA: EC53 TRAS LIOFILIZACION
 FECHA ADQUIRIDA:
 CONF. DE PROCEDIM. ADO: g B20M al 1 % en B1 al 20 %_5 ml/min Y Eq
 VOLUMEN DE INYECCION: 20,00 ul



NUMERO	TIEMPO	SUPERF.	ALTURA	% SUP.
1	13,102	96094	7436	1,37
2	15,325	131550	9546	1,88
3	15,795	5974085	505938	85,48
4	16,360	390992	26982	5,59
5	16,877	322515	21694	4,61
6	17,189	73995	7670	1,06

FIG. 21

TIEMPO LOG DE ESTADO N° 1: 0,01

FUENTE DE API
 VOLTAJE DE LA FUENTE (kV): 3,52
 CORRIENTE DE LA FUENTE (uA): 0,24
 OK TERMOPAR DE VAPORIZADOR: NO
 TEMP. DE VAPORIZADOR (°C): -0,00
 CAUDAL DE GAS DEL PROTECTOR: 58,98
 CAUDAL DE GAS AUX.: 3,17
 OK RTD CAPILAR: SI
 VOLTAJE CAPILAR (V): 20,64
 TEMP. CAPILAR (°C): 224,60
 SUMINISTRO DE 8 kV EN EL LÍMITE: NO

VACIO

OK VACIO: SI
 OK PRESION DEL INDICADOR IONICO: SI
 ESTADO DEL INDICADOR IONICO: ENCENDIDO
 INDICADOR IONICO (x10e-5 TORR): 1,52
 OK PRESION DE CONVECCION: SI
 INDICADOR DE CONVECCION (TOR): 0,84

TURBO-BOMBA

ESTADO: EN FUNCIONAMIENTO
 VIDA (HORAS): 16359,00
 VELOCIDAD (RPM): 60000,00
 POTENCIA (VATIOS): 39,20
 TEMPERATURA (°C): 40,00

ÓPTICA IÓNICA

LT: 0,00-0,45

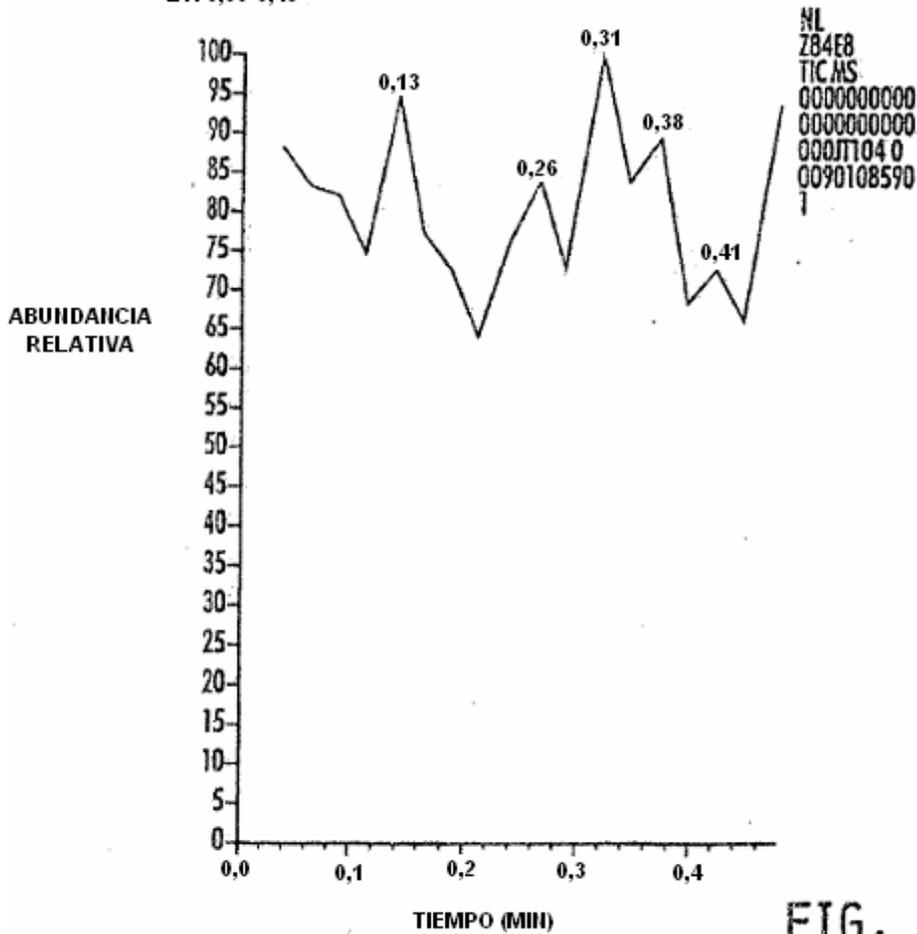


FIG. 22A

TIEMPO LOG DE ESTADO N° 1: 0,03
 FUENTE DE API
 VOLTAJE DE LA FUENTE (kV): 4,52
 CORRIENTE DE LA FUENTE (uA): 19,48
 OK TERMOPAR DE VAPORIZADOR: NO
 TEMP. DE VAPORIZADOR (°C): -0,00
 CAUDAL DE GAS DEL PROTECTOR: 58,93
 CAUDAL DE GAS AUX.: 3,06
 OK RTD CAPILAR: SI
 VOLTAJE CAPILAR (V): -10,10
 TEMP. CAPILAR (°C): 225,60
 SUMINISTRO DE 8 kV EN EL LÍMITE: NO

VACIO
 OK VACIO: SI
 OK PRESION DEL INDICADOR IONICO: SI
 ESTADO DEL INDICADOR IONICO: ENCENDIDO
 INDICADOR IONICO (x10e-5 TORR): 1,52
 OK PRESION DE CONVECCION: SI
 INDICADOR DE CONVECCION (TOR): 0,84
 TURBO-BOMBA
 ESTADO: EN FUNCIONAMIENTO
 VIDA (HORAS): 16359,00
 VELOCIDAD (RPM): 60000,00
 POTENCIA (VATIOS): 39,20
 TEMPERATURA (°C): 40,00

ÓPTICA IÓNICA

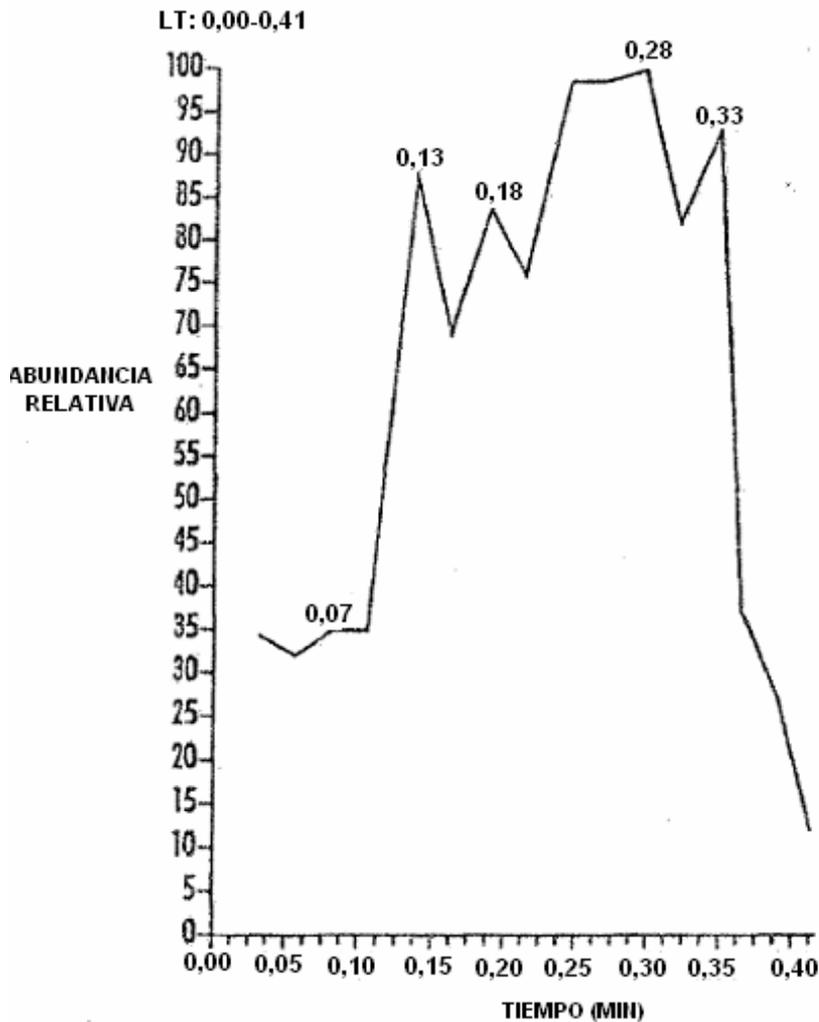


FIG. 23A

