

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 615 805**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2009 PCT/EP2009/001403**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2009 WO2009109332**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009 E 09717301 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2252628**

(54) Título: **Conjugados de antagonista de péptido análogo de la bombesina**

(30) Prioridad:

07.03.2008 EP 08075180

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

08.06.2017

(73) Titular/es:

**UNIVERSITÄTSSPITAL BASEL (50.0%)
Hebelstrasse 32
4031 Basel, CH y
UNIVERSITÄT BERN (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**MAECKE, HELMUT;
REUBI, JEAN CLAUDE y
MANSI, ROSALBA**

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 615 805 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

Conjugados de antagonista de péptido análogo de la bombesina.

5 Introducción

La invención se refiere a productos radiofarmacéuticos terapéuticos o diagnósticos/de formación de imágenes ("imaging"), a la preparación y utilización de los mismos, en la que los productos radiofarmacéuticos terapéuticos o diagnósticos se definen como fracciones de unión que presentan una afinidad y son capaces de unión a receptores de bombesina y más particularmente a un receptor de péptido liberador de gastrina (PLG). Las fracciones de unión se marcan con un grupo acompañante de metal para isótopos emisores de partículas alfa, beta, gamma y positrones. La utilización incluye tratar un sujeto que presenta una enfermedad neoplásica, comprendiendo la etapa de administrar en el sujeto una cantidad eficaz de un producto radiofarmacéutico terapéutico que presenta un metal quelado con un grupo quelante unido a una fracción capaz de unirse a receptores de la bombesina y más particularmente a receptor de péptido liberador de gastrina (PLG) que se sobreexpresa sobre las células tumorales. La utilización incluye el diagnóstico o formación de imágenes de un sujeto que presenta una enfermedad neoplásica utilizando un producto radiofarmacéutico diagnóstico/de formación de imágenes que presenta un metal quelado con un grupo quelante unido a una fracción capaz de unión a receptores de bombesina y más particularmente a receptor de péptido liberador de gastrina (PLG) sobreexpresado sobre células tumorales. El procedimiento consiste en formar un compuesto terapéutico o diagnóstico a partir de un compuesto precursor que consiste en un grupo quelante de metales unido covalentemente a una fracción capaz de unirse a receptores de bombesina y más particularmente a receptores del péptido liberador de gastrina (PLG).

Antecedentes

Durante el diseño de un trazador radiofarmacéutico eficaz para la utilización como agente diagnóstico resulta imperativo que los fármacos presenten propiedades farmacocinéticas y de reconocimiento *in vivo* apropiadas. Fritzberg et al. (*J. Nucl. Med.* 33:394, 1992) indican además que la química de los radionúclidos y los enlaces asociados subrayan la necesidad de optimizar la unión y modificaciones químicas de marcaje de la biomolécula portadora. Por lo tanto, el tipo de radionúclido, el tipo de molécula biológica y el método utilizado para unirlos entre sí pueden presentar un efecto crucial sobre las propiedades del radiotrazador.

Los péptidos son moléculas biológicas que desempeñan un papel crucial en muchos procesos fisiológicos, incluyendo las actividades como neurotransmisores, hormonas y antibióticos. La investigación ha demostrado su importancia en campos tales como la neurociencia, la inmunología, la farmacología y la biología celular. Algunos péptidos actúan como mensajeros químicos. Se unen a receptores sobre la superficie de la célula diana y el efecto biológico del ligando se transmite al tejido diana. Por lo tanto, la propiedad de unión a receptores específicos del ligando puede explotarse mediante el marcaje del ligando con un radionúclido. En teoría, la elevada afinidad del ligando para el receptor facilita la retención del ligando radiomarcado en los tejidos que expresan el receptor. Sin embargo, todavía se investiga qué péptidos pueden marcarse con eficiencia y bajo qué condiciones debe producirse el marcaje. Es bien conocido que la especificidad de receptor del péptido ligando puede alterarse durante la reacción química. Por lo tanto, debe determinarse un constructo peptídico óptimo.

Los tumores sobreexpresan diversos tipos de receptor a los que se unen específicamente los péptidos. Las publicaciones siguientes de Boerman et al., *Seminar in Nuclear Medicine* 30(3):195, 2000; Reubi et al., *J. Nucl. Med.* 46(supl. 1):67S, 2005; Reubi J.C., *Endocrine Reviews* 24(4):389, 2003, proporcionan una lista no exhaustiva de péptidos que se unen específicamente a receptores de superficie celular en los neoplasmas, es decir, la somatostatina, el péptido intestinal vasoactivo (PIV), la unión de la bombesina al receptor del péptido liberador de gastrina (PLG), la gastrina, la colecistocinina (CCK) y la calcitonina.

La utilidad potencial de los péptidos específicos de receptor marcados con metal para la formación de imágenes escintigráficas y la radioterapia se ejemplifica con análogos de somatostatina, por ejemplo octreótido conjugado con ¹¹¹In-DTPA, un agente de formación de imágenes diagnósticas autorizado por la FDA, Octreoscan®, comercializado por Coviden en los Estados Unidos (Lowertz et al., *Seminars in Oncology*, 1994, 1) y Reubi et al., *J. Nucl. Med.* 46:67S-75S, 2005, y referencias en las mismas, respectivamente. El octreótido y análogos del mismo han sido unidos covalentemente a varios isótopos metálicos para la formación de imágenes (^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁶⁸Ga) y a isótopos metálicos terapéuticos (¹⁰⁵Rh, ^{186/188}Re, ¹⁵³Sm, ⁹⁰Y, ¹⁶⁶Ho y ¹⁷⁷Lu). Los conjugados marcados con metales se unen específicamente al receptor y tras la unión al receptor, el constructo es internalizado por el receptor y los péptidos específicos de receptor marcados con metal o los metabolitos de los mismos resultan atrapados en las células diana.

El principio anteriormente indicado se extiende adicionalmente a péptidos ávidos de receptores de PLG (péptidos que presentan una afinidad elevada para el receptor) en los que se utilizan agonistas de bombesina conjugados con metal para la formación de imágenes escintigráficas y la radioterapia (Smith et al., *Anticancer Res.* 23:63-70, 2003; Baidoo et al., *Bioconjug. Chem.* 9:218-225, 1998; Gali et al., *Bioconjug. Chem.* 12:354-363, 2001; Smith et al., *Bioconjug. Chem.* 14:93-102, 2003; Cancer Res. 63:4082-4088, 2003; Rogers et al., en: M. Nicolini y U. Mazzi,

editores, Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine, SGE Editoriali, Italia, 519-525, 1999; Zhang et al., Cancer Res. 64:6707-6715, 2004, Lantry et al., EANM, Helsinki (Finlandia), 2004; Linder et al., J. Nucl. Med. 45(5):169P, 2004 [resumen nº 482]. Chen et al., J. Nucl. Med. 45:1390-1397, 2004; Johnson et al., Cancer Biother. Radiopharm. 21(2):155-66, 2006; Smith et al., Nucl. Med. Biol. 32:733-40, 2005).

5 En Chen et al. (Appl. Radiat. Isot., 2003 (en prensa)), Waser et al. (Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 34:95-100, 2007) y Lantry et al. (J. Nucl. Med. 47:1144-52, 2006) se ha descrito la formación de imágenes y la radioterapia de un agonista de la bombesina, ^{177}Lu -DOTA acoplado con -NH-CH₂-CO-[4-aminobenzoil]-QWAVGHLM-NH₂(^{177}Lu -AMBA).

10 Varias patentes y solicitudes de patente se refieren a agonistas de bombesina marcados con metal. Volkert et al. (documento US 2007/0065362 A) reivindican agonistas de bombesina marcados con metal de la estructura general Fracción de marcaje de metal-Grupo espaciador-Agonista de bombesina para la utilización en la formación de imágenes y terapéutica. Entre otras patentes y solicitudes de patente por los mismos inventores se incluyen US 15 6.921.526 B (2005), 7.060.247 B y 7.147.838 B (2006) y WO 2002/087631 A1.

Estado de la técnica

20 El principio subyacente a la selección de los agonistas como productos radiofarmacéuticos en la totalidad de las publicaciones anteriormente indicadas es que producen o inducen una respuesta de los receptores de GPR con la interacción, en la que el producto radiofarmacéutico a continuación resulta internalizado en la célula mediante endocitosis. Los antagonistas de PLG contrarrestan el efecto de un agonista y no resultan internalizados en la célula y, por lo tanto, se cree que los antagonistas no resultan muy adecuados para la formación de imágenes radioescintigráficas y la radioterapia. Hasta ahora el consenso ha sido en desarrollar compuestos con buenas 25 propiedades de internalización de radioligandos que conduzcan a una elevada acumulación *in vivo* de los radioligandos en los tumores, que aparentemente resulta necesaria para la visualización óptima y la terapia de radionúclidos *in vivo*. Es bien conocido a partir de investigaciones moleculares-farmacológicas que habitualmente son los agonistas que predominantemente proporcionan una internalización eficiente (Bodei et al., J. Nucl. Med. 47:375-377, 2006; Koenig et al., Trends Pharmacol. Sci. 18:276-287, 1997; Cescato et al., J. Nucl. Med. 47:502-511, 30 2006; Ginj et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:16436-16441, 2006), y recientemente se ha demostrado que, en el caso de los receptores de la somatostatina, los antagonistas de receptores de la somatostatina marcados con metales de alta afinidad se internalizan pobremente en las células tumorales y que funcionan igual o incluso mejor en términos de incorporación tumoral *in vivo* en modelos tumorales animales que los agonistas correspondientes, los cuales se internalizan masivamente. Los receptores de PLG se sobreexpresan en varios neoplasmas (Cornelio et 35 35 al., Ann. Onco. 18:1457-1466, 2007 y referencias en la misma), tal como el cáncer y metástasis de próstata, el cáncer y metástasis de mama, tumores estromales gastrointestinales, carcinomas pulmonares de células pequeñas, carcinomas de células renales, tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos, cánceres de cabeza y cuello de células escamosas, neuroblastomas y carcinomas esofágicos de células escamosas. Los receptores de PLG también se expresan en vasos sanguíneos asociados a tumor de cánceres ováricos, endometriales y pancreáticos 40 40 humanos (Fleischmann et al., Cell Onc. 29:421-33, 2007). Por lo tanto, resulta altamente deseable diseñar productos radiofarmacéuticos potentes con propiedades antagonistas para la formación de imágenes y radioterapia.

Jensen et al. (Pharma. Reviews, 2008 (en prensa)) recientemente han revisado la farmacología de tres subtipos diferentes de receptor de bombesina de entre los que el receptor de PLG pertenece al subtipo 2.

45 En una publicación reciente, Cescato et al. (J. Nucl. Med. 49:318-26, 2008) han demostrado que el antagonista de bombesina marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N₄ podría resultar preferente frente a los agonistas para el reconocimiento tumoral.

50 Las invenciones anteriores en el campo de los compuestos dirigidos con receptor de PLG se describen en los documentos nº WO 2007/109475 A2, nº WO 2007/095443 A2, nº US 2008/0008649 A1 y nº US 7.226.577 B2, con el esquema general que se muestra a continuación:

Quelante de metales-Conector-Análogo de bombesina

55 Según el documento nº WO 2007/095443 A2, la muestra L70, con la secuencia particular ^{177}Lu -DOTA-Gly-4-aminobenzoil-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂ se comportó como un agonista, en el que se midió la incorporación a las 1 y 24 horas. La incorporación no es óptima para fines terapéuticos y debe mejorarse.

60 Aparte de dichas patentes y solicitudes, se incluyen estudios preclínicos y clínicos en las publicaciones (Waser et al., Eur. J. Nucl. Medicine 34:95-100, 2007; J. Nucl. Med. 47:1144-52, 2006).

65 En virtud de la selección de un antagonista con diana en el receptor de GPR en un sitio diferente con alta afinidad, se muestra en la presente invención que una combinación de estrategia de espaciadores resulta en una incorporación tumoral inesperadamente elevada y persistente en combinación con una baja incorporación y rápida eliminación en órganos no diana. En un estudio comparativo, se observó una notable incorporación más alta (>2X) al utilizar un conector similar. Partiendo de ensayos *in vitro* que validaban las propiedades antagonistas de los

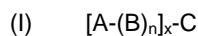
análogos de bombesina se encontró que incluso tras la adición N-terminal de un espaciador, un quelante y un metal se retenían dichos efectos antagonistas y se traducían en un excelente comportamiento in vivo de las proporciones de tumor-nivel de fondo.

- 5 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevos conjugados de antagonista de péptido bombesina que muestran una elevada incorporación y una elevada estabilidad in vivo (suero y tejido humanos).

Sumario

10 Descripción de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a conjugados de antagonista de péptido análogo de bombesina que se unen selectivamente a los receptores de bombesina y más particularmente al receptor de PLG, sin inducir la internalización en la célula y sin señalizar mediante movilización del calcio, antagonizando simultáneamente los efectos inducidos por agonistas en dichos dos sistemas, en el que el conjugado antagonista de péptido análogo de la bombesina presenta la fórmula general (I):



- 20 en la que:

x es un número entero entre 1 y 3,

n es un número entero entre 1 y 6,

25 A es un quelante de metal que comprende por lo menos un metal radionúclido, preferentemente adecuado para la utilización diagnóstica o terapéutica, más preferentemente para la formación de imágenes o la radioterapia,

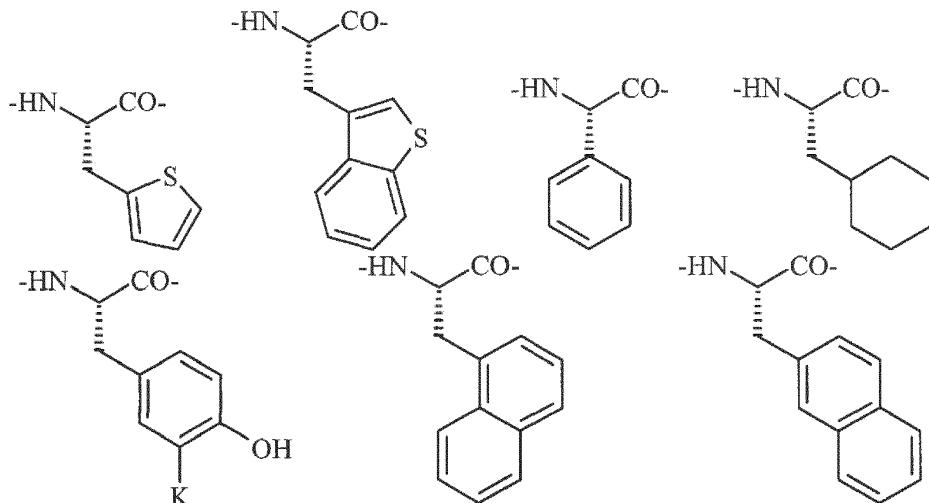
30 B es un espaciador unido al extremo N-terminal de C o un enlace covalente,

C es un antagonista de péptido análogo de bombesina de secuencia C-1 a C-3, en el que:

C-1: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-ZH,

- 35 en la que:

Xaa₁ es D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo que presenta cualquiera de las fórmulas indicadas a continuación:



K es F, Cl, I o NO₂,

- 45 Xaa₂ es Gly o β-Ala,

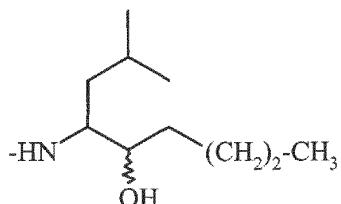
Xaa₃ es estatina, análogos de estatina e isómeros, 4-Am, 5-MeHpA o 4-Am, 5-MeHxA,

Xaa₄ es Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle o iso-Bu-Gly y Z es NH o O,

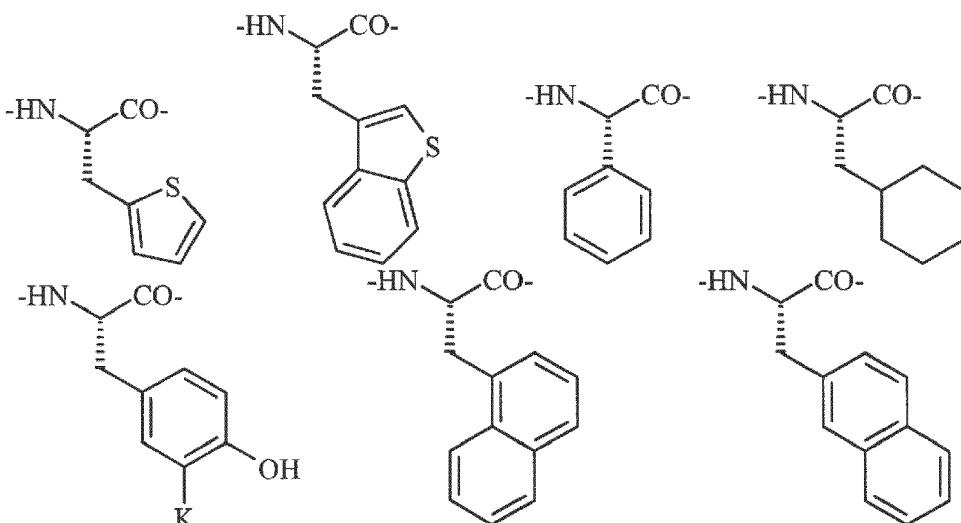
C-2: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

en la que:

- 5 Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃ es:



10 Xaa₁ es D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo que presenta cualquiera de las fórmulas indicadas a continuación:



15 y

K es F, Cl, I o NO₂,

Xaa₂ es Gly o β-Ala,

C-3: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₅¹³-Xaa₆¹⁴-ZH,

20

en la que:

Xaa₁ es D-Phe,

Xaa₂ es Gly,

25 Xaa₅ es Leuψ-CH₂NH-,

Xaa₆ es Cys o Phe,

y

30 Z es NH.

La invención se refiere además a sales farmacéuticamente aceptables de dichos conjugados de antagonista de péptido análogo de bombesina con un ácido inorgánico u orgánico de los mismos y además a hidratos, complejos, ésteres, amidas y solvatos de dichos compuestos que presentan la fórmula química general (I).

35

Descripción A (quelante de metal):

En una forma de realización preferida de la presente invención, el quelante de metal (A) es un quelante de metal para metales trivalentes o para metales pentavalentes y los análogos próximos de los mismos.

40

Preferentemente, el quelante de metales (A) para metales trivalentes se seleccionó de entre el grupo que comprende: quelantes basados en DOTA-, NODASA-, NODAGA-, NOTA-, DTPA-, EDTA-, TETA- y TRITA- y los análogos próximos de los mismos,

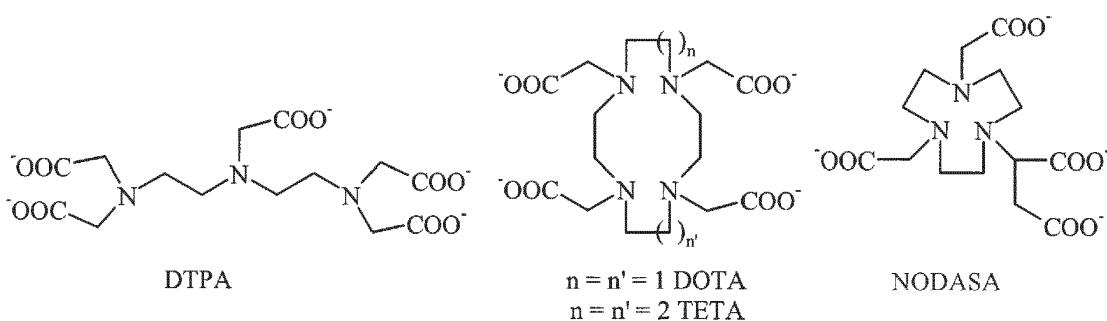
en el que:

- 5 DOTA se refiere a ácido 1,4,7,10-tetrazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético,
DTPA se refiere a ácido dietilentriaminapenta-acético,
EDTA se refiere a ácido etilendiamina-N,N'-tetraacético,
TETA se refiere a ácido 1,4,8,11-tetraazaciclododecano-1,4,8,11-tetraacético y
NOTA se refiere a ácido 1,4,7-triazaciclononatriacético.

10 Más preferentemente, el quelante de metal (A) para metales trivalentes se selecciona de entre el grupo que comprende:

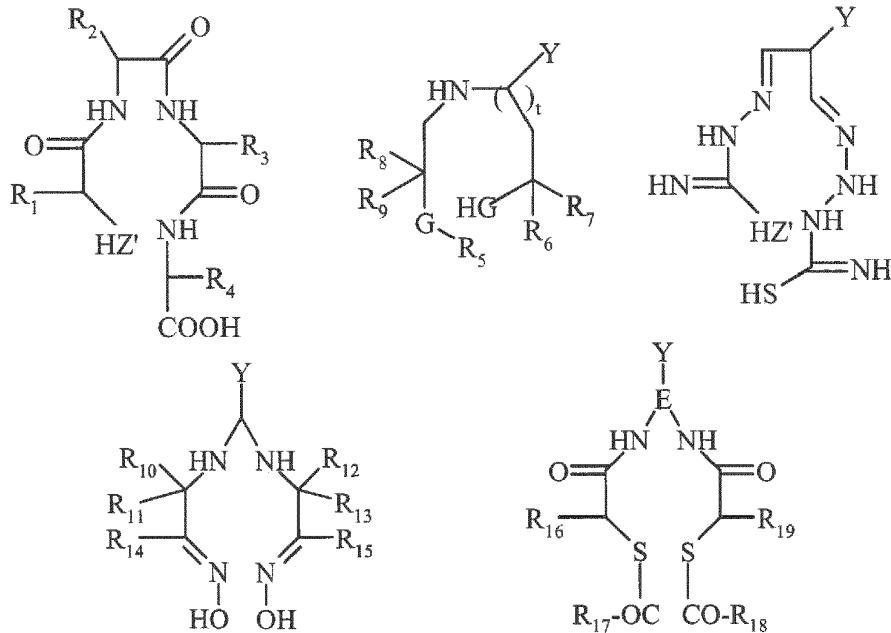
quelantes basados en DOTA-, NOTA-, DTPA- y TETA- y análogos próximos de los mismos.

15 Las estructuras de dichos ligandos quelantes en su forma totalmente desprotonada se muestran a continuación:



- 20 Todavía más preferentemente, el quelante de metal (A) para metales trivalentes se selecciona de entre el grupo que comprende DTPA (ácido dietilentriaminapentaacético) y macrociclos poliaza-policarboxilato, tal como DOTA (ácido 1,4,7,10-tetrazaciclododecano-N,N'',N'''-tetraacético).

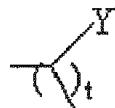
25 Preferentemente, el quelante de metal (A) para metales pentavalentes se selecciona de entre el grupo que comprende 2-hidrazino-nicotinamida (HYNIC), quelantes N₄, N₄-X (N₄ puede ser lineal o macrocíclico y X puede ser una azida amina, OH, halógeno, o-, m-, p-amino-bencil-metaparacarboxibencilo y carboxi (Nock B. et al., [^{99m}Tc]Demobesina 1, un nuevo análogo de bombesina para la formación de imágenes tumorales con diana en receptor de PLG, Eur. J. Nucl. Mol. Imaging 30:247-258, 2003), desferrioxamina (DFO) y quelantes N₄S_(4-r), y



en la que:

R₁ a R₁₅ son, independientemente uno de otro, otros átomos de hidrógeno o grupos alquilo C₁-C₄, en la que, en la

5



fracción de la fórmula anteriormente indicada, t es 1 o 2 o 3 y por lo menos uno de los átomos de carbono en dicha

10



fracción se encuentra sustituido por Y o no se encuentra sustituido por Y,

15

R₁₆ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo CO₂-alquilo C₁-C₄,

R₁₇ y R₁₈ son, independientemente uno de otro, grupos alquilo C₁-C₄ o grupos fenilo,

20

R₁₉ es CH₂-COOH o un derivado funcional del mismo,

25

E es alquileno C₁-C₄ o fenileno,

opcionalmente alquileno C₁-C₄ se sustituye con CO₂-alquilo, CH₂-CO-alquilo, CONH₂ o CONHCH₂-CO₂-alquilo,

opcionalmente fenileno se sustituye con CO₂-alquilo,

25

en el que los grupos alquilo presentan 1 a 4 átomos de carbono,

G es NH o S,

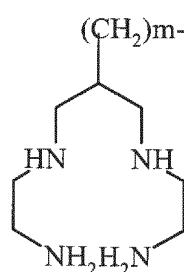
30

Y es un grupo funcional capaz de unión a un grupo amino libre del péptido (N-terminal) o con el espaciador, y

Z' es S o O.

35

El quelante N₄ preferentemente es:



en el que:

m se refiere a un número entero entre 1 y 4.

40

Se define el quelante N₄S_(4-r) en el que r es un número entero entre 1 y 4.

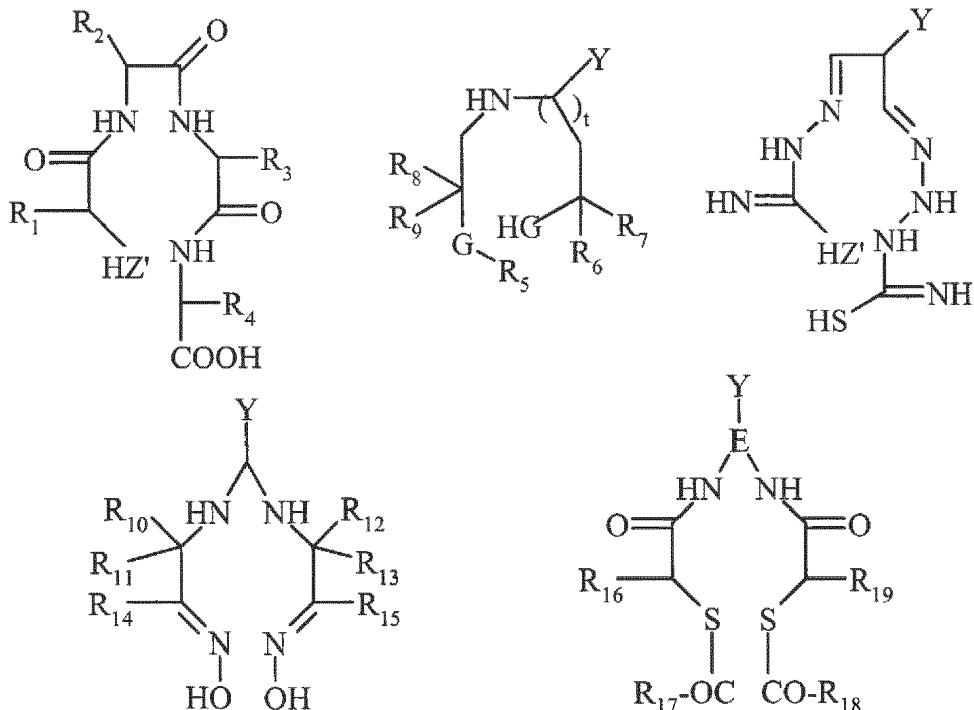
45

Dicho grupo funcional Y preferentemente comprende isocianato, isotiocianato, formilo, halonitrofenilo, diazonio, epoxi, tricloro-s-triazinilo, etilenimino, clorosulfonilo, alcoxycarbimidoilo, alquilcarboniloxicarbonilo (sustituido o no sustituido), alquilcarbonilimidazolilo, succinimido-oxicarbonilo, estando dicho grupo unido a un birradical hidrocarburo C₁-C₁₀. Son ejemplos adecuados de birradicales hidrocarburo los birradicales derivados de benceno, alcanos C₁-C₆, alquenos C₂-C₆ y alquilbencenos C₁-C₄.

50

Preferentemente los quelantes N₄S_(4-r) se seleccionan de entre el grupo que comprende quelantes basados en bisamino bistiol (BAT) para el metal radionúclido tecnecio, mercapto-acetil-glicil-glicina (MAG3) para el metal radionúclido tecnecio. Más preferentemente, el quelante de metal (A) para metales pentavalentes se selecciona de

entre el grupo que comprende:



- 5 en la que R¹-R¹⁹, Z', Y, G y t se definen tal como anteriormente.
- Preferentemente, r es un número entero entre 2 y 4, y más preferentemente r es 2 o 3.
- 10 Preferentemente, m se refiere a un número entero entre 1 y 2, más preferentemente m es 1.
- Se dan a conocer quelantes de metal bien conocidos, tales como quelantes lineales, macrocíclicas, tetrapiridina y N₃S, N₂S₂ o N₄, en los documentos US 5.367.080 A, US 5.364.613 A, US 5.021.556 A, US 5.075.099 A y US 5.886.142 A.
- 15 Se dan a conocer quelantes de metal, tales como los quelantes basados en HYNIC, DTPA, EDTA, DOTA, TETA, bisamino bistiol (BAT) en el documento US 5.720.934 A.
- 20 Se dan a conocer quelantes de metal bien conocidos, tales como desferrioxamina (DFO) en Doulias et al., Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest, Free Radic. Biol. Med. 35(7):719-28, 2003.
- 25 Se encuentra disponible una amplia diversidad de agentes quelantes que ha sido revisada por Banerjee et al. (Nucl. Med. and Biology 32:1-20, 2005, y referencias en la misma).
- 30 La 2-hidrazino-nicotinamida (HYNIC) es otra clase de grupo quelante (A) que en presencia de un coligando ha sido ampliamente utilizada para la incorporación de ^{99m}Tc y ^{186,188}Re (Schwartz et al., Bioconj. Chem. 2:333-6, 1991; Babich et al., J. Nucl. Med. 34:1964-70, 1993; Nucl. Med. Biol. 22:25-30, 1995; Nucl. Med. Biol. 22, 32, 1-10, 1995).
- 35 Se utiliza DTPA en Octreoscan® (comercializado por Covidian) para el acomplejamiento de ¹¹¹In y se describen varias modificaciones en la literatura (Brechbiel et al., Biocon. Chem. 2:187-194, 1991; Li et al., Nucl. Med. Biol. 28:145-154, 2001).
- 40 Los quelatos de tipo DOTA para aplicaciones de radioterapia se describen en Tweedle et al., patente US n° 4.885.363. Se describen otros macrociclos poliaza para quelar metales isótopos trivalentes en Macke et al., Bioconj. Chem. 13:530, 2002.
- Los quelantes N₄ y el quelante ^{99m}Tc-N₄ han sido utilizados para el marcaje peptídico en el caso de la minigastrina para el reconocimiento de receptores de CCK-2 (Nock et al., J. Nucl. Med. 46:1727-36, 2005).
- En una forma de realización preferida de la presente invención, el metal radionúclido resulta adecuado para el acomplejamiento del mismo con un quelante de metal y que conduce a producir un quelante de metal radioactivo

para la formación de imágenes. Preferentemente, el metal radionúclido se selecciona de entre el grupo que comprende 133m In, 99m Tc, 67 Ga, 52 Fe, 68 Ga, 72 As, 111 In, 97 Ru, 203 Pb, 62 Cu, 64 Cu, 51 Cr, 52m Mn, 157 Gd, 123 I, 124 I, 131 I, 75 Br, 76 Br, 77 Br, 64 Cu y 82 Br. Más preferentemente, el metal radionúclido se selecciona de entre el grupo que comprende 99m Tc, 67 Ga, 68 Ga, 111 In y 123 I. Todavía más preferentemente, el metal radionúclido es 68 Ga. Todavía más preferentemente el metal radionúclido es 99m Tc.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el metal radionúclido resulta adecuado para el complejamiento con un quelante de metal y conduce a un quelante de metal radioactivo para la radioterapia. Preferentemente, el metal radionúclido se selecciona de entre el grupo que comprende 186 Re, 90 Y, 67 Cu, 68 Ga, 69 Er, 121 Sn, 127 Te, 142 Pr, 143 Pr, 198 Au, 199 Au, 161 Tb, 109 Pd, 188 Rd, 186 Re, 188 Re, 77 As, 166 Dy, 166 Ho, 149 Pm, 151 Pm, 153 Sm, 159 Gd, 172 Tm, 90 Y, 111 In, 169 Yb, 175 Yb, 177 Lu, 105 Rh, 111 Ag, 125 I, 123 I, 213 Bi, 225 Ac, 129 I, 64 Cu y 177 mSn. Más preferentemente, el metal radionúclido se selecciona de entre el grupo que comprende 186 Re, 188 Re, 90 Y, 153 Sm, 68 Ga y 177 Lu.

En una alternativa adicional del primer aspecto, el metal radionúclido adecuado es un halógeno radioactivo (isótopos de yodo y bromo), el halógeno radioactivo se une directamente al péptido, tal como mediante reacción química a una fracción de Tyr o Trp dentro del péptido, u opcionalmente A puede ser Tyr o Trp.

Los agentes radiodiagnósticos preferentes (67 Ga, 111 In) y agentes radioterapéuticos (90 Y, 153 Sm, 177 Lu) opcionalmente contienen un ión metálico +3 quelado de la clase de elementos conocida como lantánidos. Entre los metales radioactivos típicos en esta clase se incluyen los isótopos 90 Itrio, 111 Indio, 149 Prometio, 153 Samario, 166 Disprosio, 166 Holmio, 175 Iterbio y 177 Lutecio. La totalidad de dichos metales (y otros en la serie de los lantánidos) presentan químicas muy similares, en el aspecto de que se mantienen en el estado de oxidación +3 y prefieren quelarse con ligandos que portan átomos donantes duros (oxígeno/nitrógeno).

25 Descripción B (espaciador):

B es un espaciador unido en el lado N-terminal de C o mediante un enlace covalente.

En una forma de realización preferida de la presente invención, B es un compuesto que presenta la fórmula (II):



en la que:

35 B_1 es un enlace covalente, un aminoácido natural, un aminoácido no natural, una diamina lineal o una diamina cíclica,

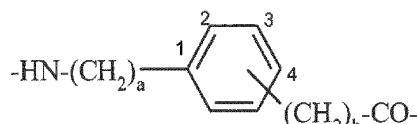
40 B_2 es un enlace covalente, un aminoácido natural, un aminoácido no natural, un ácido carboxílico lineal o un ácido carboxílico cíclico,

45 con la condición de que B_1 y B_2 no pueden ser enlaces covalentes simultáneamente y, en el caso de que B_1 es una diamina, B_2 es un ácido carboxílico (es decir, B_2 no puede ser un enlace o un aminoácido natural o no natural en este caso).

50 Preferentemente, el aminoácido no natural es un compuesto que presenta cualquiera de las fórmulas (III), (IV), (V) o (VI),

en las que:

(III)



50

en la que:

55 a es un número entero entre 0 y 3,

b es un número entero entre 0 y 3,

y patrones de sustitución relativos u opcionalmente 1,2-, 1,3- o 1,4-

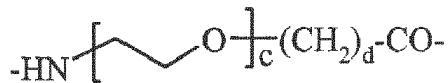
60 Preferentemente,

a es 0 o 1,

b es 0 o 1,

5

(IV)



en la que:

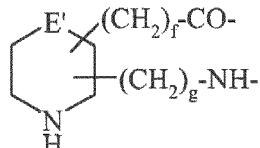
10 c es un número entero entre 1 y 24,

d es un número entero entre 1 y 6.

15 c es un número entero entre 1 y 15, más preferentemente c es entre 1 y 8,

d es un número entero entre 1 y 3, más preferentemente d es 1.

(V)



20

en la que:

E' es NH o CH₂,

25 f es un número entero entre 0 y 6,

q es un número entero entre 0 y 6.

en el caso de que E' sea CH₂, el anillo de 6 elementos se sustituye opcionalmente en cualquier posición de carbono del anillo de 6 elementos en el mismo carbono del anillo o en diferentes carbonos,

en el caso de que E' sea NH, el anillo de 6 elementos se sustituye opcionalmente en cualquier posición de carbono del anillo de 6 elementos en el mismo átomo de carbono del anillo o en diferentes átomos de carbono y/o en el átomo de nitrógeno con la condición de que f o q sea un número entero igual o superior a 1.

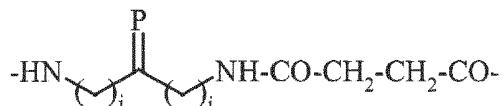
Preferentemente,

E' es NH,

f es un número entero entre 0 y 3,

q es un número entero de 0 y 3.

(VI)



en la que:

¡Es un número entero entre 1 y 6

50) Es un número entero entre 1 y 6.

P₂O₅ O₂H-

Preferentemente,

i es un número entero entre 1 y 3,

5 j es un número entero entre 1 y 3,

P es O.

10 Más preferentemente, el espaciador se selecciona de entre el grupo que comprende 4-amino-1-carboximetilpiperidina, ácido (R,S)-diaminoacético, PEG₁₋₂₄, Sar₅₋₁₀, ácido 8-aminoctanoico, ácido 6-aminocaproico, 4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazina, ácido diaminobutírico, ácido hipúrico, ácido 4-amino-1-Boc-piperidín-4-carboxílico, ácido Gly-aminobenzoico, ácido 5-amino-3-oxa-pentil-succinámico, Peg₁₋₂₄-4-amino-1-carboximetil-piperidina, Dab(ácido shikímico), (D-Gln)x, (D-Asn)x.

15 Descripción C (secuencia del antagonista de péptido análogo de bombesina)

En una forma de realización preferida de la presente invención, la secuencia del antagonista del péptido análogo de bombesina se selecciona de entre el grupo que comprende C-1 a C-3, preferentemente C-1 a C-2.

20 Preferentemente, la secuencia del antagonista del péptido análogo de bombesina se selecciona de entre el grupo que comprende:

Sec. del compuesto 1: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂,

25 Sec. del compuesto 9: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

Sec. del compuesto 12: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂,

30 Sec. del compuesto 13: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂.

35 Preferentemente, el conjugado de antagonista del péptido análogo de bombesina que presenta la fórmula (I) que comprende por lo menos un metal radionúclido se selecciona de entre el grupo que comprende:

compuesto 1: DOTA-Gly-aminobenzoil-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂,

40 compuesto 2: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂,

compuesto 3: ácido DOTA-4-amino-1-piperidín-4-carboxílico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂,

45 compuesto 4: ácido DOTA-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂,

compuesto 5: ácido DOTA-(15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico)-(4-amino-1-carboximetil-piperidín)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂,

50 compuesto 6: ácido DOTA-diaminobutírico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂,

compuesto 7: DOTA-4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂,

55 compuesto 8: ácido DOTA-(5-amino-3-oxa-pentil)-succinámico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂,

compuesto 9: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

60 compuesto 10: ácido DOTA-(15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

compuesto 11: ácido DOTA-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

65 compuesto 12: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂,

compuesto 13: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂,

compuesto 14: N₄-triazolas-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂.

Otras formas de realización preferidas:

En una forma de realización preferida de la presente invención, para el compuesto que presenta la fórmula (I), x es un número entero entre 1 y 2, preferentemente x es 1.

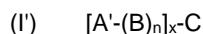
5 En el caso de que x sea igual o superior a 2, (B)_n es un espaciador lineal o un espaciador ramificado unido al extremo N-terminal del antagonista del péptido análogo de bombesina (C).

10 En una forma de realización preferida de la presente invención, para el compuesto que presenta la fórmula (I), n es un número entero entre 1 y 4, preferentemente n es 1 o 3, más preferentemente 1.

15 En una forma de realización preferida de la presente invención, para el compuesto que presenta la fórmula (I), A es adicionalmente un quelante de metal que comprende por lo menos un átomo de metal en frío correspondiente o equivalente al metal radionúclido listado anteriormente. Dichos compuestos resultan útiles para los ensayos de unión in vitro in vivo y como compuestos de referencia. Las formas de realización preferidas listadas anteriormente resultan de aplicación en este caso.

20 En una forma de realización preferida de la presente invención, para los compuestos que presentan la fórmula (I), K es adicionalmente H o preferentemente H.

25 En un segundo aspecto, la invención se refiere a precursores de conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina que se unen selectivamente a los receptores de bombesina y que más particularmente se unen al receptor de PLG sin inducir la internalización en la célula y sin señalizar mediante la movilización del calcio, antagonizando simultáneamente los efectos inducidos por agonista en dichos dos sistemas, en donde el conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina presenta la fórmula (I') a continuación:



en la que:

30 x es un número entero entre 1 y 3,

n es un número entero entre 1 y 6,

35 A' es un quelante de metal,

B es un espaciador unido al lado N-terminal de C o un enlace covalente,

C es un antagonista de péptido análogo de la bombesina de secuencia C-1 a C-3.

40 El quelante de metal A' es un quelante de metal libre de metal radionúclido tal como se define en el primer aspecto para A.

45 El espaciador B y el antagonista C de péptido análogo de la bombesina se definen tal como anteriormente, en el primer aspecto.

50 La invención se refiere además a sales farmacéuticamente aceptables de los conjugados de antagonista de péptido análogo de bombesina de un ácido inorgánico u orgánico del mismo y a hidratos, complejos, ésteres, amidas, solvatos y profármacos de dichos compuestos que presentan la fórmula química general (I').

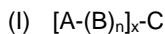
55 En una forma de realización preferida de la presente invención, x es un número entero entre 1 y 2, preferentemente x es 1. En el caso de que x sea igual o superior a 2, (B)_n es un espaciador lineal o un espaciador ramificado unido al lado N-terminal del antagonista del péptido análogo de la bombesina (C).

60 En una forma de realización preferida de la presente invención, en la fórmula (I'), n es un número entero entre 1 y 4, preferentemente n es 1 o 3, más preferentemente es 1.

65 En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende conjugados de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presentan la fórmula (I) o (I') y un portador farmacéuticamente aceptable.

65 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a la utilización de conjugados de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presentan la fórmula (I) o (I') para la unión a receptores de bombesina y más particularmente a receptor de péptido liberador de gastrina (PLG) y/o para la inhibición de receptores de la bombesina y más particularmente al receptor del péptido liberador de gastrina (PLG).

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método para la preparación de un conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presenta la fórmula general (I):



en la que n, x, A, B y C son tal como se ha definido anteriormente, que comprende la etapa de:

- 10 - radioquelación del conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presenta la fórmula general (I') tal como se ha definido anteriormente con un metal radionúclido o átomo de metal adecuado correspondiente a los metales radionúclidos listados anteriormente.

15 Preferentemente, el método para la preparación de un conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presenta la fórmula general (I) comprende la etapa de radioqueler con un metal radionúclido adecuado.

En una forma de realización adicional, el método para la preparación de un conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina presenta la fórmula general (I):



en la que n, x, A, A', B y C se han definido anteriormente, comprende adicionalmente las etapas siguientes:

- 25 a) acoplamiento de un espaciador B a un antagonista de péptido análogo de la bombesina C para la obtención de espaciador-antagonista de péptido análogo de la bombesina de secuencia C-1 a C-3, opcionalmente repitiendo la etapa a), y
- 30 b) acoplamiento de espaciador-antagonista de péptido análogo de la bombesina con un quelante de metal A' para la obtención de conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presenta la fórmula general (I'), opcionalmente repitiendo la etapa b),

35 produciéndose las etapas anteriormente indicadas antes del radioquelerado del conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presenta la fórmula general (I') con un metal radionúclido o átomo de metal adecuado correspondiente o equivalente a un metal radionúclido listado anteriormente.

En una forma de realización preferida de la presente invención, n, x, el quelante de metal A, el quelante de metal A', el espaciador B y el antagonista de péptido análogo de la bombesina C son tal como se ha definido anteriormente.

40 En un sexto aspecto, la invención se refiere a un método para la formación de imágenes de receptores de la bombesina y más particularmente a células tumorales y/o vasos tumorales y peritumorales que expresan receptor de PLG en un paciente, comprendiendo las etapas siguientes:

- 45 - administración en un paciente de una cantidad eficaz de producto radiofarmacéutico de un conjugado de antagonista de péptido análogo de bombesina que presenta la fórmula (I), y
- obtención de imágenes del metal radionúclido en el paciente.

50 Una forma de realización preferida del sexto aspecto se refiere a la utilización de una cantidad radiofarmacéuticamente eficaz de un conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presenta la fórmula (I) para la preparación de un agente de formación de imágenes para obtener imágenes de receptores de bombesina y más particularmente de células tumorales y/o vasos tumorales o peritumorales que expresan el receptor de PLG.

55 En una forma de realización preferida, las células tumorales se refieren a cánceres que se seleccionan de entre el grupo que comprende:

- 60 - cáncer de próstata, incluyendo metástasis,
- cáncer de mama, incluyendo metástasis,
- tumores estromales gastrointestinales,
- carcinomas pulmonares de células pequeñas,
- carcinomas de células renales,
- tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos,
- cánceres de cabeza y cuello de células escamosas,
- 65 - neuroblastomas y
- carcinomas esofágicos de células escamosas.

Todavía más preferentemente, células tumorales se refiere a cánceres seleccionados de entre:

- 5 - cáncer de próstata, incluyendo metástasis, y
- cáncer de mama, incluyendo metástasis.

En una forma de realización preferida adicional, vasos tumorales y peritumorales se refiere a cánceres seleccionados de entre:

- 10 - cánceres ováricos,
- cánceres endometriales y
- cánceres pancreáticos.

Preferentemente, los vasos tumorales y peritumorales se refieren a cánceres ováricos.

15 Una forma de realización preferida se refiere a la utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presenta la fórmula (I) para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con células tumorales y/o vasos tumorales y peritumorales.

20 En una forma de realización preferida, las enfermedades relacionadas con células tumorales se refieren a cánceres seleccionados de entre el grupo que comprende:

- 25 - cáncer de próstata, incluyendo metástasis,
- cáncer de mama, incluyendo metástasis,
- tumores estromales gastrointestinales,
- carcinomas pulmonares de células pequeñas,
- carcinomas de células renales,
- tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos,
30 - cánceres de cabeza y cuello de células escamosas,
- neuroblastomas y
- carcinomas esofágicos de células escamosas.

35 Todavía más preferentemente, las enfermedades relacionadas con células tumorales se refieren a cánceres seleccionados de entre el grupo que comprende:

- cáncer de próstata, incluyendo metástasis, y
- cáncer de mama, incluyendo metástasis.

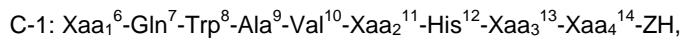
40 En una forma de realización preferida adicional, las enfermedades relacionadas con vasos tumorales y peritumorales se refieren a cánceres seleccionados de entre el grupo que comprende:

- 45 - cánceres ováricos,
- cánceres endometriales y
- cánceres pancreáticos.

Preferentemente, las enfermedades relacionadas con vasos tumorales y peritumorales se refieren a cánceres ováricos.

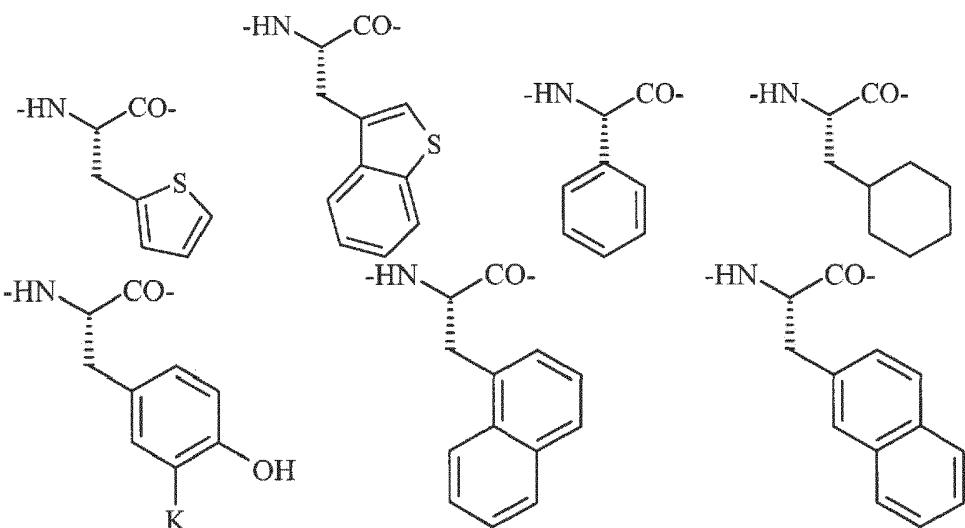
50 En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un kit para la preparación de un agente radioterapéutico o un agente radiofarmacéutico de formación de imágenes que presenta la fórmula (I), comprendiendo el kit un vial que contiene una cantidad predeterminada de conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina de fórmula (I') y un portador, diluyente, excipiente o adyuvante aceptable para el radiomarcaje de un quelante de metal.

55 En un octavo aspecto, la invención se refiere a un antagonista de péptido análogo de bombesina de secuencia C-1 a C-2, en el que:



60 en la que:

Xaa₁ es D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo que presenta cualquiera de las fórmulas indicadas a continuación:



5 K es F, Cl, I o NO₂,

Xaa₂ es Gly o β-Ala,

Xaa₃ es estatina, análogos e isómeros de la estatina, 4-Am,5-MeHpA o 4-Am,5-MeHxA,

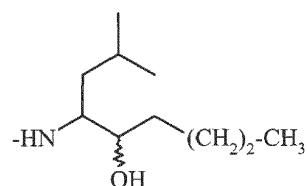
10 Xaa₄ es Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle o iso-Bu-Gly y

Z es NH o O,

C-2: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

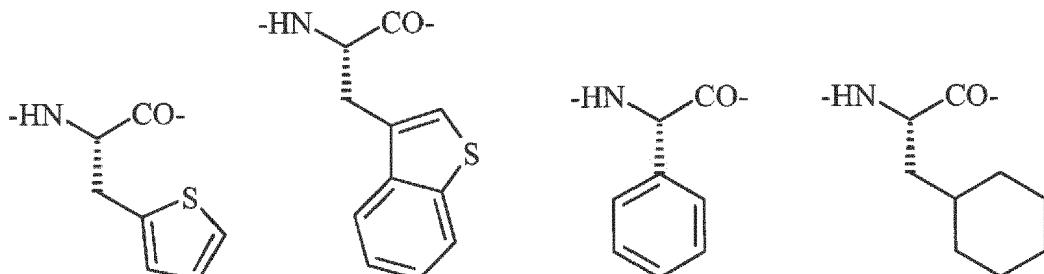
15 en la que:

Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃ es:

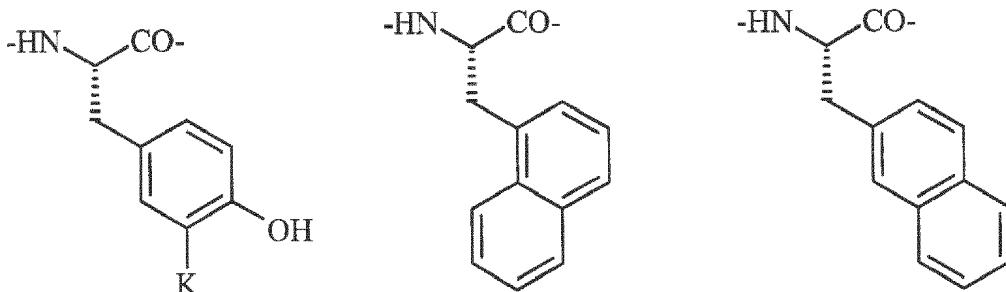


20

Xaa₁ es D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo que presenta cualquiera de las fórmulas indicadas a continuación:



25



y

5 K es F, Cl, I o NO₂,Xaa₂ es Gly o β-Ala,C-3: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₅¹³-Xaa₆¹⁴-XH,

10

en la que:

Xaa₁ es D-Phe,Xaa₂ es Gly,

15

Xaa₅ es Leuψ-CH₂NH-,Xaa₆ es Cys o Phe,

y

20 Z es NH.

Definiciones

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada con 1 a 20 átomos de carbono, tal como, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, heptilo, hexilo y decilo. Los grupos alquilo también pueden encontrarse sustituidos, tal como con átomos de halógeno, grupos hidroxilo, grupos alcoxi C₁-C₄ o grupos arilo C₆-C₁₂. Más preferentemente, el alquilo es alquilo C₁-C₁₀, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₄.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, la expresión "alquil(eno) inferior ramificado o no ramificado" presenta el significado siguiente: un radical monovalente, divalente o trivalente de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido que consiste en carbonos e hidrógenos, que no contiene ninguna insaturación y que presenta entre uno y ocho átomos de carbono, por ejemplo, aunque sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletilo (t-butilo), n-heptilo y similares. Dicha fracción puede encontrarse sustituida o no sustituida, tal como con átomos de halógeno, átomos de hidroxilo, grupos alcoxi C₁-C₄ o grupos arilo C₆-C₁₂.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "fenileno" se basa en un anillo de benceno disustituido u opcionalmente trisustituido. Por ejemplo, polí(p-fenileno) es un polímero construido a partir de unidades repetidas para-fenileno. El fenileno puede encontrarse sustituido o no sustituido. Puede encontrarse sustituido con halógeno, OH, alcoxi, preferentemente alcoxi C₁-C₄, carboxi, éster C₁-C₄, amida y nitro.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "alqueno" presenta el significado siguiente: un compuesto químico alifático o alicíclico insaturado que contiene por lo menos un doble enlace carbono-carbono. Los alquenos acíclicos más simples, con únicamente un doble enlace y ningún otro grupo funcional, forman una serie homóloga de hidrocarburos con la fórmula general C_nH_{2n}, por ejemplo etileno (C₂H₄) y propileno (C₃H₆). Los alquenos puede encontrarse sustituidos o no sustituidos. En el caso de que el alqueno se encuentre sustituido, puede encontrarse sustituido con átomos de halógeno, grupos hidroxilo, grupos alcoxi C₁-C₄, grupos arilo C₆-C₁₂ o similares.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "arilo" presenta el significado de sistema de anillos insaturado, preferentemente un sistema de anillos aromáticos, más preferentemente con 6 a 12 átomos de carbono en el esqueleto del anillo. Son ejemplos de lo anterior, fenilo y naftalenilo. Las fracciones arilo puede encontrarse sustituidas o no sustituidas, tal

como con átomos de halógeno, grupos hidroxilo, grupos alcoxi C₁-C₄ o grupos arilo C₆-C₁₂.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "benceno" presenta el significado siguiente: un compuesto químico orgánico con la fórmula C₆H₆. Un benceno es un hidrocarburo aromático y el segundo [n]-anuleno ([6]-anuleno), un hidrocarburo cíclico con un enlace pi continuo. El benceno puede encontrarse sustituido o no sustituido, tal como con átomos de halógeno, grupos hidroxilo, grupos alcoxi C₁-C₄ o grupos arilo C₆-C₁₂.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, los términos "alquenilo" y "alquinilo" se definen de manera similar al alquilo, aunque contienen por lo menos un doble o triple enlace carbono-carbono, respectivamente. El alquenilo puede ser más preferentemente alquenilo C₂-C₆ y el alquinilo puede ser más preferentemente alquinilo C₂-C₆.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "halógeno" presenta el significado de F, Cl, Br o I.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, las expresiones "sales de ácidos orgánicos o inorgánicos", "ácido inorgánico" y "ácido orgánico" se refieren a ácidos minerales, incluyendo, aunque sin limitación, ácidos tales como los ácidos carbónico, nítrico, fosfórico, clorhídrico, perclórico o sulfúrico o las sales ácidas de los mismos, tales como las sales de potasio, sodio, calcio o magnesio, por ejemplo hidrogenosulfato de potasio, o a ácidos orgánicos apropiados, entre los que se incluyen, aunque sin limitación, ácidos tales como los ácidos alifático, cicloalifático, aromático, aralifático, heterocíclico, carboxílico y sulfónico, ejemplos de los cuales son los ácidos fórmico, acético, trifluoroacético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, fumárico, pirúvico, benzoico, antranílico, mesílico, fumárico, salicílico, fenilacético, mandélico, embónico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, toluenosulfónico, trifluorometanosulfónico y sulfanílico, respectivamente. De manera similar, los ácidos orgánicos también pueden encontrarse presentes en forma de las sales de los mismos, tales como sales de potasio, sodio, calcio o magnesio.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como ácidos minerales, incluyendo, aunque sin limitación, ácidos tales como los ácidos carbónico, nítrico o sulfúrico, o ácidos orgánicos, incluyendo, aunque sin limitación, ácidos tales como los ácidos alifático, cicloalifático, aromático, aralifático, heterocíclico, carboxílico y sulfónico, ejemplos de los cuales son ácidos fórmico, acético, trifluoroacético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, fumárico, pirúvico, benzoico, antranílico, mesílico, salicílico, fenilacético, mandélico, embónico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, toluenosulfónico y sulfanílico.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, las expresiones "secuencia de aminoácidos" y "péptido" se definen en la presente memoria como una poliamida obtenible mediante (poli)condensación de por lo menos dos aminoácidos.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "aminoácido" se refiere a cualquier molécula que comprende por lo menos un grupo amino y por lo menos un grupo carboxilo, aunque sin ningún enlace peptídico dentro de la molécula. En otras palabras, un aminoácido es una molécula que presenta una funcionalidad ácido carboxílico y un nitrógeno de amina que presenta por lo menos un hidrógeno libre, preferentemente en posición alfa, pero ningún enlace amida en la estructura de la molécula. De esta manera, un dipéptido que presenta un grupo amino libre en el extremo N-terminal y un grupo carboxilo libre en el extremo C-terminal no debe considerarse una único "aminoácido" en la definición anteriormente proporcionada. El enlace amida entre dos residuos aminoácidos contiguos que se obtiene a partir de dicha condensación se denomina "enlace peptídico".

Un enlace amida tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier enlace covalente que presenta la estructura siguiente:



en la que una molécula proporciona el grupo carbonilo y la otra molécula que debe unirse proporciona el grupo NH. Un enlace amida entre dos residuos aminoácidos contiguos que se obtiene a partir de dicha policondensación se define como un "enlace peptídico". Opcionalmente, los átomos de nitrógeno del esqueleto poliamida (indicado como NH anteriormente) puede alquilarse independientemente, por ejemplo con -alquilo C₁-C₆, preferentemente con -CH₃.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, se deriva un residuo aminoácido del aminoácido correspondiente mediante la formación de un enlace peptídico con otro aminoácido.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, un aminoácido es un aminoácido natural o no natural, en el que los aminoácidos no naturales son residuos aminoácidos sintéticos/artificiales, o residuos aminoácidos proteinógenos y/o no proteinógenos. Los residuos aminoácidos no proteinógenos pueden clasificarse además como (a) homoanálogos de aminoácidos proteinógenos, (b) β-homoanálogos de residuos aminoácidos proteinógenos y (c) residuos aminoácidos no proteinógenos adicionales.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los residuos aminoácidos se obtienen a partir de los aminoácidos correspondientes, por ejemplo de aminoácidos proteinógenos, es decir, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val, o

aminoácidos no proteinógenos, tales como homoanálogos de aminoácidos proteinógenos, en los que la cadena lateral se ha extendido con un grupo metíleno, por ejemplo homoolanina (Hal), homoarginina (Har), homocisteína (Hcy), homoglutamina (Hgl), homohistidina (Hhi), homoisoleucina (Hil), homoleucina (Hle), homolisina (Hly), homometionina (Hme), homofenilalanina (Hph), homoprolina (Hpr), homoserina (Hse), homotreonina (Hth), homotriptófano (Htr), homotirosina (Hty) y homovalina (Hva),

Los β-homoanálogos de aminoácidos proteinógenos, en los que se ha insertado un grupo metíleno entre el carbono α y el grupo carboxilo, proporcionando β-aminoácidos, por ejemplo β-homoolanina (βHal), β-homoarginina (βHar), β-homoasparagina (βHas), β-homocisteína (βHcy), β-homoglutamina (βHgl), β-homocistidina (βHhi), β-homoisoleucina (βHil), β-homoleucina (βHle), β-homolisina (βHly), β-homometionina (βHme), β-homofenilalanina (βHph), β-homoprolina (βHpr), β-homoserina (βHse), β-homotreonina (βHth), β-homotriptófano (βHtr), β-homotirosina (βHty) y β-homovalina (βHva),

son aminoácidos no proteinógenos adicionales, por ejemplo, α-aminoadípico (Aad), ácido β-aminoadípico (β Aad), ácido α-aminobutírico (Abu), ácido α-aminoisobutírico (Aib), β-alanina (βAla), ácido 4-aminobutírico (4-Abu), ácido 5aminovalérico (5-Ava), ácido 6-aminohexanoico (6-Ahx), ácido 8-aminooctanoico (8-Aoc), ácido 9-aminononanoico (9-Anc), ácido 10-aminodecanoico (10-Adc), ácido 12-aminododecanoico (12-Ado), ácido α-aminosubérico (Asu), ácido azetidín-2-carboxílico (Aze), β-ciclohexilalanina (Cha), citrulina (Cit), deshidroalanina (Dha), ácido γ-carboxiglutámico, α-ciclohexilglicina (Chg), propargilglicina (Pra), ácido piroglutámico(Glp), α-terc-butilglicina (Tle), 4-benzoilfenilalanina (Bpa), δ-hidroxilisina (Hyl), 4-hidroxiprolina (Hyp), aloisoleucina (alle), lantionina (Lan), (1-naftil)alanina (1-Nal), (2-naftil)alanina (2-Nal), norleucina (Nle), norvalina (Nva), ornitina (Orn), fenilglicina (Phg), ácido pipecólico (Pip), sarcosina (Sar), selenocisteína (Sec), estatina (Sta), β-tienilanina (Thi), ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolín-3-carboxílico (Tic), alotreonina (aThr), ácido tiazolidín-4-carboxílico (Thz), ácido γ-aminobutírico (GABA), isocisteína (iso-Cys), ácido diaminopropiónico (Dpr), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab), ácido 3,4-diaminobutírico (γβDab), bifenilalanina (Bip), fenilanina sustituida en posición para con alquilo C₁-C₆, -haluro, -NH₂, -CO₂H o Phe(4-R) (en la que R=alquilo C₁-C₆, -haluro, -NH₂ o -CO₂H), ácidos péptido nucleicos (APN, ver P.E. Nielsen, Acc. Chem. Res. 32:624-30) o análogos N-alquilados de los mismos, tales como los análogos N-metilados de los mismos.

Los aminoácidos cíclicos pueden ser proteinógenos o no proteinógenos, tales como Pro, Aze, Glp, Hyp, Pip, Tic y Thz.

Para más ejemplos e información, puede hacerse referencia a, por ejemplo, J.H. Jones, J. Peptide Sci. 9:1-8, 2003, cuya exposición se incorpora como referencia en su totalidad a la presente memoria.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, las expresiones "aminoácido no proteinógeno" y "residuo aminoácido no proteinógeno" comprenden además derivados de aminoácidos proteinógenos. Por ejemplo, la cadena lateral de un residuo aminoácido proteinógeno puede derivatizarse, convirtiendo de esta manera el residuo aminoácido proteinógeno en "no proteinógeno". Lo mismo se aplica a los derivados del extremo C-terminal y/o N-terminal de un residuo aminoácido proteinógeno terminador de la secuencia de aminoácidos.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, un residuo aminoácido proteinógeno se obtiene de un aminoácido proteinógeno seleccionado de entre el grupo que consiste en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val, en configuración L o D; el segundo centro quiral en Thr e Ile puede presentar una configuración R o S. Por lo tanto, por ejemplo, cualquier modificación post-traduccional de una secuencia de aminoácidos, tal como la N-alquilación, que puede producirse naturalmente convierte al residuo aminoácido modificado correspondiente en "no proteinógeno", aunque en la naturaleza dicho residuo aminoácido se encuentra incorporado en una proteína. Preferentemente los aminoácidos modificados se seleccionan de entre los aminoácidos N-alquilados, los β-aminoácidos, los γ-aminoácidos, las lantioninas, los deshidroaminoácidos y los aminoácidos con fracciones de guanidina alquilada.

Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, la expresión "ácido carboxílico" o "ácido dicarboxílico" se refiere a compuestos orgánicos que

presentan una fracción COOH o dos fracciones COOH, respectivamente, tales como, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido ciclohexano carboxílico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido láctico (ácidos carboxílicos) o ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido adipico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico y ácido ftálico (ácidos dicarboxílicos), respectivamente.

5 Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "diamina" se refiere a compuestos orgánicos que presentan dos fracciones NR'R", en las que R' y R" pueden ser, independientemente uno de otro, alquilo, alquenilo, alquinilo y arilo. Las diaminas pueden ser, por ejemplo, etilendiamina, 1,4-ciclohexano-diamina y piperazina.

10 Respecto a los aminoácidos, ácidos carboxílicos, ácidos dicarboxílicos o diaminas anteriormente indicadas en la presente memoria, también se incluyen específicamente los radicales respectivos obtenidos en el caso de que dichos aminoácidos, ácidos carboxílicos, ácidos dicarboxílicos o diaminas, respectivamente, se encuentren comprendidos en los compuestos de la invención, es decir, -HN-...CO- (aminoácido), -OC-... (ácido carboxílico), -OC-...CO- (ácido dicarboxílico), -HN-...NH- (diamina), por ejemplo.

15 Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, la expresión "quelante de metal" se define como una molécula que acompleja un metal radionúclido para formar un complejo metálico que es estable bajo condiciones fisiológicas y que también puede conjugarse con un grupo de reconocimiento mediante un espaciador. El quelante de metal se acompleja o no con un metal radionúclido.

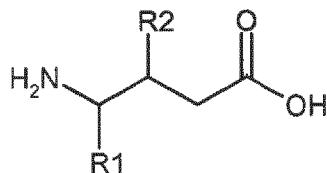
20 Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, la expresión "metal radionúclido" se define como un radionúclido que es un átomo con un núcleo inestable, estando caracterizado el número por un exceso de energía que se encuentra disponible para proporcionarlo a una partícula de radiación de nueva creación dentro del núcleo o a un electrón atómico (ver la conversión interna). Los metales radionúclidos utilizados en la presente memoria resultan especialmente adecuados para la utilización diagnóstico o terapéutica, más preferentemente para la formación de imágenes o la radioterapia. El radionúclido, en dicho procedimiento, experimenta desintegración radioactiva y emite (a) rayos gamma y/o partículas subatómicas. Estas partículas constituyen radiación ionizante. Los radionúclidos pueden encontrarse naturalmente aunque también pueden producirse artificialmente.

25 Entre estos metales radionúclidos se incluyen, aunque sin limitación, galio (por ejemplo ^{67}Ga y ^{68}Ga), cobre (por ejemplo ^{67}Cu y ^{64}Cu), tecnecio (por ejemplo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y $^{94\text{m}}\text{Tc}$), renio (por ejemplo ^{186}Re y ^{188}Re), plomo (por ejemplo ^{212}Pb), bismuto (por ejemplo ^{212}Bi) y paladio (por ejemplo ^{109}Pd). Los métodos para preparar dichos isótopos son conocidos. Los generadores de molibdeno/tecnecio para producir $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se encuentran disponibles comercialmente. Entre los procedimientos para producir ^{186}Re se incluyen los procedimientos descritos en Deutsch et al. (Nucl. Med. Biol. 13(4):465-477, 1986) y Vanderheyden et al. (Inorganic Chemistry 24:1666-1673, 1985) y métodos para la producción de ^{188}Re han sido descritos por Blachot et al. (Intl. J. of Applied Radiation and Isotopes 20:467-470, 1969) y por Klofutar et al. (J. of Radioanalytical Chem. 5:3-10, 1970). La producción de ^{212}Pd se describe en Fawwaz et al., J. Nucl. Med. 25:796, 1984. La producción de ^{212}Pb y ^{212}Bi se describe en Gansow et al., Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 241:215-217, 1984, y Kozah et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA (enero de 1986) 83:474-478. Resulta preferente $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para la utilización diagnóstica y los demás radionúclidos listados anteriormente presenta un uso terapéutico.

30 45 Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "espaciador" se define como un grupo de enlace entre el quelante de metal y los antagonistas de péptido bombesina. Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "agonista" se refiere a una sustancia (ligando) que se une a un sitio específico en una molécula de receptor de una célula y, de esta manera, activa la transducción de señales en la célula. Lo anterior conduce a un efecto medible.

50 55 Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, el término "antagonista" se refiere a una sustancia (ligando) que se une a un sitio en la célula receptora que es específico de una sustancia agonista, bloqueando de esta manera dicho sitio al agonista sin activar un efecto. De esta manera, el antagonista inhibe el efecto del agonista.

60 Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria, en la descripción de la invención y en las reivindicaciones, la expresión "análogo de estatina" se define como un mimético dipeptídico con la estructura genérica siguiente:



Estatina $\text{R}^2=\text{OH}$, R^1 puede modificarse significativamente aunque típicamente son iguales a cadenas laterales de aminoácidos.

- 5 Análogos de estatina $\text{R}^2=\text{H}$, R^1 puede modificarse significativamente aunque típicamente son iguales a cadenas laterales de aminoácidos.

Abreviaturas:

10 NODASA=ácido 1,4,7-triazaciclononano-1-succínico-ácido 4,7-diacético

NODAGA=ácido 1,4,7-triazaciclononano-N-glutárico-ácido N',N"-diacético

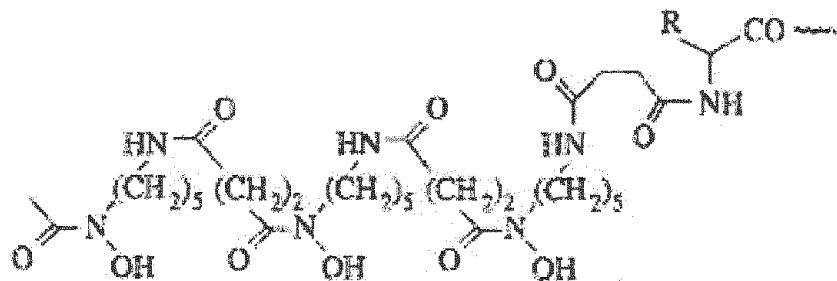
15 TRITA=1,4,7,10-tetraazaciclotridecano-ácido 1,4,7,10-N,N',N",N"-tetraacético

Cpa=(S)-4-carboxamidofenilalanina

4-Am-5-MeHpA=ácido 4-amino-5-metilheptanoico

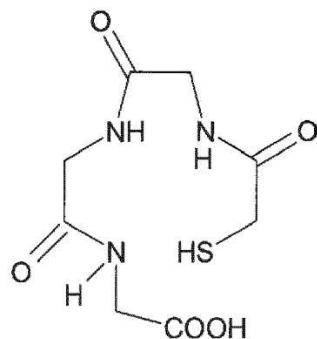
20 4-Am-5-MeHxA=ácido 4-amino-5-metilhexanoico

DFO=N'-[5-(acetil-hidroxiamino)pentil]-N-[5-[3-(5-aminopentil-hidroxi-carbamoil)propanoiloamino]pentil]-N-hidroxi-butanodiamida

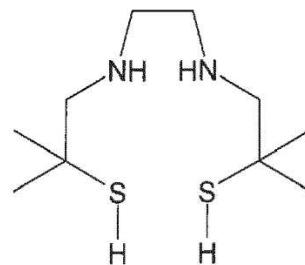


25

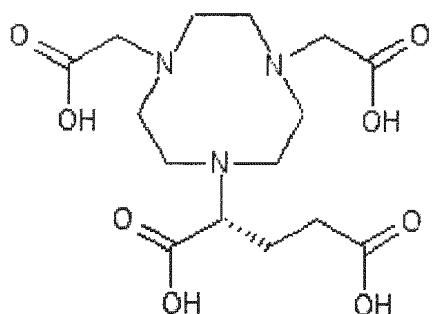
DFO



triamida monotiol (MAG3)



bis-amino bis-tiol (BAT)



Sin elaboración adicional, se cree que el experto en la materia puede, a partir de la descripción anterior, utilizar la presente invención en su totalidad. Por lo tanto, las formas de realización específicas preferidas son proporcionadas a continuación de manera ilustrativa y no limitativa del resto de la exposición en modo alguno.

Figuras

Figura 1: curvas de dosis-respuesta de análogos de bombesina determinadas mediante el ensayo de liberación de calcio. El ensayo de liberación de calcio se llevó a cabo tal como se indica en la sección de Materiales y métodos. Las células PC3 se trataron con bombesina a concentraciones de entre 0,01 nmoles/l y 10 pmoles/l (●) sola en presencia de 10 µmol/l del compuesto de análogos de bombesina 1 (▲) o In-compuesto 1 (◆) o análogos de bombesina Compuesto 1a (■). El compuesto 1, sometido a ensayo por sí solo a una concentración de 1 µmol/l y compuesto 1 a una concentración de 10 pmoles/l (Δ), In-Compuesto 1 (X) y compuesto 1a (□) no presentan ningún efecto sobre la liberación del calcio en las células PC3. El compuesto 1a se refiere a la secuencia de unión de 1, sin el conector ni el quelato (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂). El compuesto 1 se refiere al quelato (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂). In-Compuesto 1 se refiere a In-quelato (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂).

Figura 2: de inmunofluorescencia de células HEK-RPLG

Microscopía de inmunofluorescencia del compuesto 1, In-Compuesto 1, Compuesto 1b y RPLG-ANTAG utilizando el anticuerpo monoclonal de HA-epítopo de ratón y células HEK-RPLG. (a) Ningún péptido, (b) bombesina 10 nmoles/l, (c) Compuesto 1b, (d) Compuesto 1b + bombesina 10 nmoles/l, (d, f, h, j) células tratadas con bombesina 10 nmoles/l en presencia de 1 µmol/l de los análogos Compuesto 1b, RPLG-ANTAG, Compuesto 1 y In-Compuesto 1, (c, e, g, i) células tratadas con Compuesto 1b, RPLG-ANTAG y Compuesto 1.

Figura 3a, 3b, 4a, 4b: obtención de imágenes de PET en ratones portadores de tumores PC-3 (3) y LNCaP (4) de Compuesto 2 Ga-68-DOTA. a) Una hora después de la inyección de 10 MBq de radiotrazador, b) bloqueo con 100 µg de bombesina.

Figura 6: imagen de SPECT/CT de ^{99m}Tc-ARN4-06 (15 MBq/200 pmoles) en ratones portadores de tumor PC-3.

Figura 8: imagen de SPECT/CT de ^{99m}Tc-ARN04-05 (15 MBq/200 pmoles) en ratones portadores de tumor PC-3.

Figura 9: análisis de HPLC de Compuesto 2 Ga-68-DOTA en una columna de fase inversa.

Figura 10a, b, c, d, e: ensayo de estabilidad de Compuesto 2 Ga-68-DOTA en plasma y orina de ratón analizados mediante HPLC.

Figura 11: estabilidad en suero humano de Compuesto 2 Lu-177-DOTA

Figura 12: comparación entre tumor/tejido Ga-68 RM2 con F18 FDG y F18 colina

La exposición o exposiciones completas de todas las solicitudes, patentes y publicaciones citadas en la presente memoria se incorporan en la misma como referencia en su totalidad.

Los ejemplos, a continuación, pueden repetirse con el mismo éxito mediante la sustitución de los reactivos y/o condiciones operativas genérica o específicamente descritas de la presente invención por las utilizadas en los ejemplos anteriores.

A partir de la descripción anteriormente proporcionada el experto en la materia podrá determinar fácilmente las características esenciales de la presente invención y, sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, podrá realizar diversos cambios y modificaciones en la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

Ejemplos

En los que A se refiere a A pero también a A', según resulte apropiado para todos los ejemplos dados a conocer a continuación.

Ejemplo 1 (A-B-C)

En el que A se refiere a A pero también a A', según resulte apropiado para todos los ejemplos dados a conocer a continuación.

a) Síntesis de conjugados de antagonista de péptido bombesina con la secuencia general (A=DOTA, B=Espaciador B₁-B₂, C=Péptido con amida N-terminal Z [Z=NH])

15 DOTA-Espaciador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

Se sintetizaron los péptidos manualmente sobre fase sólida utilizando la estrategia de Fmoc. Con el fin de obtener amidas N-terminales, se utilizó resina de amida de Rink MBHA LL (malla 100-200) (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-4-metilbenzimidazolamina). En general, se introdujo en el reactor amida de Rink MBHA con una carga teórica de 0,34 mmoles/g de resina. Se añadió N,N-dimetilformamida (DMF) al reactor y se agitó durante 30 minutos para permitir el hinchado de la resina. Tras eliminar el solvente, se añadió una solución de piperidina al 20% en DMF y la resina se agitó durante 15 minutos para eliminar el grupo protector 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Se repitió esta etapa dos veces. Después de este procedimiento, se lavó la resina tres veces durante 5 minutos con DMF. Se recolectó la solución de piperidina y la solución de DMF de los últimos tres lavados y se enrasó a 100 ml con etanol. A partir de esta solución se extrajo una alícuota para determinar espectrofotométricamente la cantidad de grupos protectores Fmoc eliminados.

Antes de acoplar el derivado de aminoácido-Fmoc, la resina se lavó dos veces durante 2 minutos con DMF. Se añadieron a la resina 2 equivalentes de aminoácidos-Fmoc, preactivados con 2 equivalentes de N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-hidroxibenzotriazol (HOBr) y se ajustó el pH a un valor de 8 a 9 mediante la adición de aproximadamente 4 equivalentes de N-etildiisopropilamina (DIPEA). La reacción se incubó durante 2 h bajo agitación suave. Tras la reacción, se retiró la solución y la fase sólida se lavó dos veces durante 5 minutos con DMF. Se realizó un seguimiento de la reacción con la prueba de Kaiser. Una determinada cantidad de perlas de la resina se lavó 3 veces con etanol, 50 µl de la solución 1 (se mezclaron 20 g de fenol en 10 ml de etanol con 1 ml de una solución de KCN 0,01 M en 49 ml de piridina) y se añadieron 50 µl de solución 2 (500 g de ninhidridina en 10 ml de etanol) y las perlas se incubaron durante 10 minutos a 95°C. Las perlas azules indican funciones amino libres no acopladas.

40 Todos los aminoácidos se utilizaron en forma de derivados protegidos con Fmoc N-terminal y se acoplaron de una manera similar. Se utilizó triptófano con un grupo protector terc-butiloxicarbonilo (Boc) en la cadena lateral, mientras que la histidina y la glutamina se protegieron con Trt. En el caso de que la prueba de Kaiser realizada después del acoplamiento de cada aminoácido indicase un acoplamiento incompleto de las funciones amino, se repetía el acoplamiento.

45 Tras construir la secuencia peptídica deseada completa, se lavó la resina 5 veces con DCM, seguido del lavado 5 veces con éter dietílico, cada uno durante 2 minutos y se secaron al vacío.

b) Acoplamiento con ESPACIADOR y pro-quelante DOTA (Bu)₃

50 El proquelante DOTA(Bu)₃ se obtuvo de Macrocylics Inc., Dallas, USA. Antes del acoplamiento del ESPACIADOR, se eliminó la protección de Fmoc N-terminal de los péptidos unidos a la resina. La resina se hinchó durante 15 min. en DMF, se trató dos veces con una solución de piperidina al 20% en DMF (15 min.) y se lavó tres veces con DMF. La solución de los tratamientos de piperidina y los lavados con DMF siguientes se recolectaron para determinar la cantidad de grupos Fmoc cortados.

55 Se añadieron a la resina 2 equivalentes del ESPACIADOR, preactivos con hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-amonio (HATU) durante 20 min. en DMF. Se ajustó el pH a 8-9 mediante la adición de DIPEA. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se realizó un seguimiento del acoplamiento utilizando la prueba de Kaiser. El proquelante DOTA(Bu)₃ se acopló de la misma manera tras la eliminación del Fmoc tal como se ha indicado anteriormente. El acoplamiento de DOTA(Bu)₃ se agitó durante la noche. Tras eliminar la solución, la resina se lavó 3 veces con DMF, 5 veces con DCM, seguido de 5 veces con éter dietílico, cada uno durante 2 minutos, y se secó al vacío.

c) Desprotección, corte y purificación

65 El péptido-resina se introdujo en una jeringa dotada de una frita. Se añadió una solución de ácido trifluoroacético

(TFA)/tioanisol (TA)/triisopropilsilano (TIS)/H₂O (94/2/2/1) y la jeringa se agitó durante 2 h. Se añadió la solución a una mezcla de 50% éter diisopropílico y 50% éter dietílico sobre hielo para permitir la precipitación del péptido. Se recogió el péptido mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min. y se descantó el sobrenadante. El precipitado se lavó varias veces con éter dietílico y se secó al vacío. El producto en bruto se disolvió en agua y se purificó

5 mediante RP-HPLC semipreparativa en un sistema de HPLC Metrohm LC-CaDi 22-14 (Herisau, Suiza) con una columna C18 Macherey-Nagel VP 250/21 Nucleosil 100-5 (eluyentes: eluyente 1=TFA al 0,1% en agua y eluyente 2=acetonitrilo; gradiente: 0 a 20 min., 90%-50% de eluyente 1; flujo: 15 ml/min.).

10 Los conjugados fueron analizados mediante RP-HPLC analítica y se caracterizó mediante espectroscopía de masas (EM-IEP).

A-B-C-1

15 DOTA-Espaciador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-ZH (Z=NH)

15 Compuesto 1: A=DOTA, B₁=Gly, B₂=4-aminobenzoilo; Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Sta; Xaa₄=Leu,

20 DOTA-Gly-aminobenzoilo-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₈₀H₁₁₄N₂₀O₂₀, calculado (m/z): 1.675,8, observado [M+K]⁺: 1.715,1.

25 Compuesto 2: A=DOTA, B₁=4-amino-1-carboximetil-piperidinil; B₂=ninguno, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Sta; Xaa₄=Leu

30 DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₉H₁₁₈N₂₀O₁₉; calculado (m/z): 1639,9, observado [M+K]⁺: 1.678,1

35 Compuesto 3: A=DOTA, B₁=4-amino-1-piperidina-4-carboxi; B₂=ninguno, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Sta; Xaa₄=Leu,

40 DOTA-4-amino-1-piperidina-4-carboxilicacid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂ C₇₇H₁₁₆N₂₀O₁₉, calculado (m/z): 1624,9, observado [M+K]⁺: 1.663,7.

45 Compuesto 4: A=DOTA, B₁=15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoilo; B₂=ninguno, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Sta; Xaa₄=Leu,

50 DOTA-ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₈₂H₁₂₇N₁₉O₂₃, calculado (m/z): 1.747,8, observado [M+K]⁺: 1.785,1.

55 Compuesto 5: A=DOTA, B₁=15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoilo; B₂=4-amino-1-piperidín-4-carboxi, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Sta; Xaa₄=Leu,

60 DOTA-(ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico)-(4-amino-1-carboximetil-piperidina)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₈₉H₁₃₉N₂₁O₂₄, calculado (m/z): 1.886,0, observado [M+K]⁺: 1.924,9.

65 Compuesto 6: A=DOTA, B₁=ácido diaminobutírico; B₂=ninguno, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Sta; Xaa₄=Leu,

70 DOTA-ácido diaminobutírico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₅H₁₁₄N₂₀O₁₉, calculado (m/z): 1.598,9, observado [M+K]⁺: 1.638,4.

75 Compuesto 7: A=DOTA, B₁=4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazinilo; B₂=ninguno, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Sta; Xaa₄=Leu,

80 DOTA-4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₉H₁₂₁N₂₁O₁₉, calculado (m/z): 1.667,9, observado [M+Na]⁺: 1.691,2.

85 Compuesto 8: A=DOTA, B₁=ácido (5-amino-3-oxa-pentil)-succinámico; B₂=ninguno, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Sta; Xaa₄=Leu,

90 DOTA-ácido (5-amino-3-oxa-pentil)-succinámico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

C₇₉H₁₂₀N₂₀O₂₁, calculado (m/z): 1.685,9, observado [M+K]⁺: 1.723,7.

Ejemplo 2 (A-B-C)

95 a) Síntesis de conjugados de antagonista de péptido bombesina con la secuencia general (A=N₄-azido, B=Espaciador B₁-B₂, C=Péptido con amida N-terminal Z [Z=NH₂])

N₄-triazolas-dPEG₁-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

5 a) Síntesis de los péptidos: Fmoc-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

Se sintetizaron los péptidos manualmente sobre fase sólida utilizando la estrategia de Fmoc. Para obtener amidas N-terminales, se utilizó la resina de amida de Rink MBHA (malla de 100 a 200). La síntesis se llevó a cabo tal como se ha indicado en el Ejemplo 1.

10 b) Acoplamiento con grupo alquilo propargil-dPEG₁-éster de NHS

Antes del acoplamiento con el grupo alquilo, se eliminó la protección de Fmoc N-terminal de los péptidos unidos a la resina. La resina se hinchó durante 15 min. en DMF, se trató dos veces con una solución de piperidina al 20% en DMF (15 min.) y se lavó tres veces con DMF. La solución del tratamiento de piperidina y los lavados con DMF siguientes se recolectaron para la determinación de Fmoc.

15 Se añadieron a la resina 2 equivalentes de propargil-dPEG₁-éster de NHS. Se ajustó el pH a 8-9 mediante la adición de DIPEA. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h y se realizó un seguimiento del acoplamiento utilizando una prueba de Kaiser.

20 c) Desprotección, corte y purificación

25 Se introdujo el péptido-resina en una jeringa dotada de una frita. Se añadió una solución de TFA/TIS/H₂O (94/2,5/2,5) y la jeringa se agitó durante 2 h. Se añadió la solución a una mezcla de 50% éter diisopropílico y 50% éter dietílico sobre hielo para permitir la precipitación del péptido. Se recogió el péptido mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min. y se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó varias veces con éter dietílico y se secó al vacío. El producto en bruto se disolvió en agua y se purificó mediante RP-HPLC semipreparativa tal como se ha indicado anteriormente.

30 Los conjugados se analizaron mediante RP-HPLC preparativa y se caracterizaron mediante espectroscopía de masas (EM-IEP).

35 d) Síntesis de quelante N₄-azido. La síntesis implicaba 3 etapas.

35 i) Síntesis de N,N',N'',N'''-tetracis(terc-butiloxicarbonil)-6-(azido)-1,4,8,11-tetraazaundecano (N₄(Boc)₄-N₃) [3]:

40 a) N,N',N'',N'''-tetracis(terc-butiloxicarbonil)-6-(hidroxi)-1,4,8,11-tetraazaundecano (N₄(Bob)₄-OH) [1]: una solución de 6-(hidroxi)-1,4,8,11-tetraazaundecano (1 g, 3,1 mmoles) en DMF (10 ml) se enfrió a 0°C. A lo anterior se añadió una solución de dicarbonato de di-terc-butilo (3,32 ml, 15,5 mmoles) en DMF (5 ml) seguido de DIPEA (2,7 ml, 15,5 mmoles). A continuación, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Despues de este tiempo de reacción, la mezcla de reacción se dividió entre agua y acetato de etilo. La capa acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo y la fase de acetato de etilo agrupada se lavó con solución de cloruro sódico y se secó sobre sulfato sódico anhídrico. La filtración y la evaporación del solvente bajo presión reducida rindió el compuesto del título con un rendimiento de 86%.

45 ii) N,N',N'',N'''-tetracis(terc-butiloxicarbonil)-6-(O-metil-sulfonil)-1,4,8,11-tetraazaundecano (N₄(Bob)₄-O-SO₂CH₃) [2]:

50 A una solución de 1 (300 mg, 0,54 mmoles) en piridina (3 ml) se añadió cloruro de metilsulfonilo (84 µl, 1,08 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta completarla según el seguimiento mediante CCF. Se evaporó el solvente bajo presión reducida y se introdujo el residuo en acetato de etilo. El acetato de etilo se lavó tres veces con NaHCO₃ al 10% y agua y se secó sobre sulfato sódico anhídrico. La filtración y la evaporación del solvente bajo presión reducida rindió el producto en bruto, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía de columna de gel de sílice, rindiendo el compuesto del título (84%).

55 iii) N,N',N'',N'''-tetracis(terc-butiloxicarbonil)-6-(azido)-1,4,8,11-tetraazaundecano (N₄(Boc)₄-N₃) [3]:

60 Una suspensión de 2 (250 mg, 0,38 mmoles) y azida sódica (100 mg, 1,52 mmoles) en DMF (3 ml) se agitó a 75°C durante 5 h. Despues, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. A continuación, la mezcla de reacción se dividió entre agua y acetato de etilo. La capa acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo y el acetato de etilo agrupado se lavó con solución de cloruro sódico y se secó sobre sulfato sódico anhídrico. La filtración y la evaporación del solvente bajo presión reducida rindió el producto en bruto, que seguidamente se purificó mediante cromatografía de columna (rendimiento: 88%).

65 d) Acoplamiento en solución

65 El péptido (6,2 mg, 5 µm) con grupo alquilo terminal y 3 (3 mg, 5 µm) se disolvió en una mezcla 1:1 de agua y

alcohol terc-butílico (1 ml). Se añadieron polvos de cobre (10 mg) seguido de solución acuosa 0,1 M de pentahidrato de sulfato de cobre (II) (60 μ l, 6 μ m, 1,2 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se separaron los polvos de cobre mediante filtración y se eliminó el solvente bajo presión reducida. El péptido en bruto se purificó mediante RP-HPLC semipreparativa.

5 El conjugado de quelante-péptido se trató con TFA:TIS:H₂O (95:2:3). Se eliminó el solvente bajo presión reducida. El producto en bruto se trituró con éter dietílico y se purificó mediante RP-HPLC semipreparativa tal como se ha indicado anteriormente.

10 Los conjugados se analizaron mediante RP-HPLC analítica y se caracterizaron mediante espectroscopía de masas (EM-IEP).

Compuesto 14: A =N₄-azido, B₁ = propargil-dPEG₁-éster de NHS; B₂=ninguno, Xaa₁=DPhen; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Sta; Xaa₄=Leu,
15 N₄-triazoles-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₆₈H₁₀₅N₂₁O₁₃, calculado (m/z): 1.424,7, observado: [M+H]⁺: 1.425,5.

Ejemplo 3 (A-B-C2)

20 DOTA-Espaciador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₂-CH₃

Todos los pseudopéptidos se sintetizaron en fase solución mediante condensación del heptapéptido Fmoc-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Xaa₂-His-OH con el aminoácido modificado H-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃.

25 a) Síntesis del heptapéptido Fmoc-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Xaa₂-His-OH

Los péptidos se sintetizaron manualmente en resina de cloruro de 2-clorotritilo utilizando la estrategia de Fmoc. En general, se introdujo en el reactor resina de cloruro de 2-clorotritilo con una carga teórica de 1,4 mmoles/g de resina. La resina se hinchó en DCM durante 30 min. y se acopló el primer aminoácido mediante la adición de 1 equivalente de aminoácido, mezclado con un exceso molar de 4 veces de DIPEA en DCM. La mezcla de reacción de acoplamiento se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después la resina se lavó dos veces con una mezcla de DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1), dos veces con DCM y finalmente se hinchó en DMF. Se desprotegió el Fmoc utilizando piperidina al 20% en DMF y la cantidad de grupo protector Fmoc eliminado se determinó espectrofotométricamente a 300 nm. El siguiente aminoácido se acopló mediante la adición de un exceso molar de 2 veces de aminoácido y se mezcló con cantidades equimolares de DIC/HOBt y un exceso molar de 4 veces de DIPEA en DMF. La resina se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se realizó un seguimiento del acoplamiento utilizando la prueba de la ninhidrina de Kaiser. Cada aminoácido se acopló utilizando la misma estrategia.

40 b) Acoplamiento con ESPACIADOR y proquelante DOTA ('Bu)₃

40 Los acoplamientos se llevaron a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

c) Corte y purificación

45 Los péptidos totalmente protegidos se cortaron del soporte sólido mediante suspensión de la resina en una mezcla de TFA/TIS/DCM (1/5/94). Se extrajo varias veces un volumen de 5 ml de la solución de corte con la jeringa, se incubaron durante 10 min. y las fracciones cortadas se recolectaron en un matraz de 50 ml. Tras la recolección de todas las fracciones, se añadieron 3x10 ml de tolueno al matraz, se evaporaron los solventes y el producto se secó seguidamente durante 1 h en una bomba de vacío de aceite.

50 d) Síntesis de Boc-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃. La síntesis implicaba tres etapas.

i) Síntesis de Boc-Leu-N(OCH₃)CH₃

55 Se disolvió Boc-Leu-OH (1 g, 4,3 mmoles) en DCM (30 ml) y se añadió tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) (1,380 g, 4,3 mmoles), HOEt (0,581 g, 4,3 mmoles) y DIPEA (743 μ l, 4,3 mmoles) a 0°C. Tras 5 min. de agitación, se añadió hidrocloruro de O,N-dimetilhidroxilamina (0,461 g, 4,73 mmoles) y DIPEA (817 μ l, 4,73 mmoles). Todos el material sólido se disolvió en 10 min. y la mezcla se agitó durante la noche a TA. Se evaporó el solvente, la mezcla de reacción se redisolvió en AcOEt y se lavó con H₂O, ácido cítrico al 5%, H₂O, solución acuosa al 5% de NaHCO₃ y solución saturada de NaCl varias veces. La solución se secó sobre MgSO₄ y se eliminó el solvente al vacío. El compuesto deseado se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice. EM-IEP: calculado 269; observado 292 [M+Na]⁺.

65 ii) Síntesis de Boc-Leu-(CH₂)₃-CH₃

65 Se activó magnesio (0,330 g, 13,6 mmoles) mediante suspensión en tolueno durante 30 min. bajo N₂. Se eliminó el

tolueno y se secó el Mg bajo N₂. A la suspensión de Mg en THF (20 ml) se añadió bromobutano (1,46 ml, 13,6 mmoles) gota a gota y la mezcla se calentó bajo reflujo. Tras disolver todo el magnesio, se añadió Boc-Leu-N(OCH₃)CH₃ en THF gota a gota y la reacción se agitó durante 2 h a 0°C. Se añadió HCl 1 M (150 ml), seguido de acetato de etilo (100 ml). La capa orgánica se lavó con hidrogenosulfato potásico 1 M y agua, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío. El producto esperado se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice. El producto se caracterizó mediante RMN-¹H y RMN-¹³C.

EM-IEP: calculado 271; observado 293,3 [M+Na]⁺.

iii) Síntesis de Boc-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃

A una solución de Boc-Leu-(CH₂)₃-CH₃ (0,190 g, 0,7 mmoles) en metanol (5 ml) se añadió NaBH₄ (0,104 g, 2,8 mmoles). La mezcla de reacción se agitó adicionalmente durante 1 h, después se neutralizó con ácido acético y el solvente se eliminó bajo presión reducida. El producto esperado se precipitó con una solución saturada de bicarbonato. El péptido se recolectó mediante filtración, se lavó con agua y hexano y se secó. El producto se caracterizó mediante RMN-¹H y RMN-¹³C. EM-IEP: calculado, 272; observado, 273 [M+H]⁺; 547,7 [2M+H]⁺.

iv) Acoplamiento en solución

Se desprotegió Boc-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃ utilizando una solución de TFA al 80% en DCM. Tras 1 h, se concentró la solución, se lavó varias veces con DCM y se secó. Se disolvió el quelante-espaciador-péptido en DMF, se añadió HATU (1,2 equivalentes) y la mezcla se agitó durante 1 h. Se disolvió H-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃ en DMF y se añadió al péptido. Se ajustó el pH a 8 utilizando DIPEA y la reacción se agitó durante 4 h a TA.

Se concentró el solvente y se obtuvo el péptido, totalmente protegido, mediante precipitación con H₂O sobre hielo. El péptido en bruto se precipitó, se enfrió, se centrifugó y se separó del solvente mediante decantación. Con el fin de obtener el péptido totalmente desprotegido, se solubilizó en una mezcla de DCM/TFA/TIS/H₂O 10/85/2,5/2,5. Tras 4 h, se concentró la solución y el péptido se precipitó utilizando una mezcla de 50% éter dietílico y 50% éter diisopropílico sobre hielo. A continuación, se recogió el péptido mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min. y se decantó el sobrenadante. Se lavó varias veces el precipitado con éter dietílico y el producto en bruto se mantuvo a continuación al vacío durante la noche para eliminar los solventes restantes. El producto en bruto se disolvió en agua y se purificó mediante cromatografía preparativa tal como se ha indicado anteriormente.

El conjugado se analizó mediante RP-HPLC analítica y se caracterizó mediante espectroscopía de masas (EM-IEP).

Compuesto 9: A=DOTA, B₁=4-amino-1-carboximetil-piperidina:B₂=ninguno, Xaa₁ DPhe; Xaa₂=Gly; DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂) (CH₂)₂-CH₃, C₇₄H₁₁₂N₁₈O₁₇, calculado (m/z): 1.524,8, observado [M+K]⁺: 1564,3.

Compuesto 10: A=DOTA, B₁=15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoilo; B₂=4-amino-1-carboximetil-piperidina, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly;

DOTA-PEG₄-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃; C₈₆H₁₃₅N₁₉O₂₂, calculado (m/z): 1786,9, observado [M+K]⁺: 1811,1.

Compuesto 11: A=DOTA, B₁=15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoilo; B₂=ninguno, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly;

DOTA-PEG₄-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃ C₇₈H₁₂₁N₁₇O₂₁, calculado (m/z): 1632,8, observado [M+K]⁺: 1672,2.

50 Ejemplo 4 (A-B-C-3)

DOTA-Espaciador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-NH₂

55 Síntesis de conjugados de bombesina con la secuencia general: DOTA-Espaciador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp8-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

a) Síntesis del péptido: Fmoc- Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²- Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

Los péptidos se sintetizaron manualmente en resina MBHA LL (malla de 100 a 200) HCl utilizando estrategia de Boc. En general, se introdujo en el reactor resina MBHA con una carga teórica de 0,59 mmoles/g y se hinchó en DCM durante 30 min. La resina se trató 3 veces (10 min.) con una solución de DIPEA al 10% en DCM. El primer acoplamiento de Boc-Leuψ(CH₂NH)-Phe-OH se consiguió utilizando 2 equivalentes de Boc-aminoácido activado con 2 equivalentes de HOBT y 2 equivalentes de DIC. La mezcla de reacción de acoplamiento se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se llevó a cabo un seguimiento de la reacción utilizando la prueba de ninhidrina de Kaiser. Se desprotegió el Boc utilizando TFA al 30% en DCM y esta etapa se repitió dos veces. A continuación, la resina se trató con una solución de DIPEA al 10% en DCM y se llevaron a cabo los acoplamientos tal como se ha indicado

anteriormente.

(H-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)-Phe-NH₂: C₅₆H₇₆N₁₄O₉, calculado (m/z): 1089,3, observado [M+H]⁺: 1089,8.

5

b) Acoplamiento con ESPACIADOR y proquelante DOTA (Bu)₃

Los acoplamientos se llevaron a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

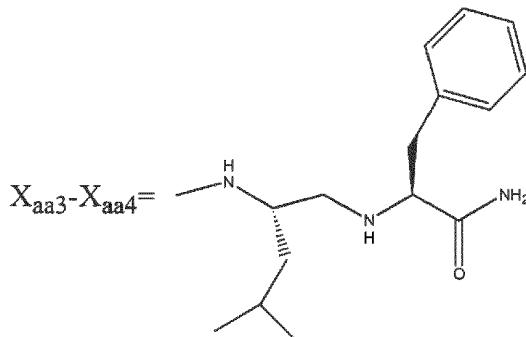
10 c) Desprotección, corte y purificación

El péptido se trató con TFA (1 ml) y TIS (30 μ l) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, la mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA) (100 μ l) gota a gota bajo agitación. Se selló el matraz con un tapón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h.

15 El volumen se redujo bajo vacío y el péptido se precipitó mediante la adición de éter dietílico frío. El precipitado se lavó varias veces con éter dietílico y el producto en bruto se secó bajo vacío. El producto en bruto se disolvió en agua y se purificó mediante HPLC preparativa tal como se ha indicado anteriormente.

20 Los conjugados se analizaron mediante RP-HPLC analítica y se caracterizó mediante espectroscopía de masas (EM-IEP).

Compuesto 12: A=DOTA, B₁=4-amino-1-carboximetil-piperidina; B₂=ninguno, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Leu ψ (CH₂NH); Xaa₄=Phe



25

DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)-Phe-NH₂ C₇₉H₁₁₄N₂₀O₁₇, calculado (m/z): 1615,9, observado [M+K]⁺: 1654,9.

30 Síntesis de conjugados de bombesina con la secuencia general: DOTA-Espaciador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leu ψ (CH₂NH)-Cys-NH₂

a) Síntesis del péptido: Fmoc-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹²-His¹²-Leu ψ (CH₂NH)-Cys-NH₂

35 Se sintetizaron los péptidos manualmente mediante fase sólida en resina MBHA (0,59 mmoles/g) utilizando la estrategia de Boc. Se acopló Boc-Cys(4-MeOBzl)-OH (2,5 eq.) a la resina utilizando DIC (2,5 eq.) y HOBr (2,5 eq.) como reactivo activador. Se ajustó el pH a 8 con DIPEA (5 eq.). Se introdujo el enlace reducido ¹³ ψ ¹⁴(CH₂-NH) utilizando Boc-Leu-aldehído (2,5 eq.) disuelto en dimetilformamida acidificada. Se añadió lentamente NaBH₃CN (2,5 eq.) en DMF, durante 20 min., y la reacción se agitó durante 1 h a TA. Tras la formación de un enlace peptídico reducido, se llevaron a cabo todas las reacciones de acoplamiento utilizando aminoácidos protegidos con N-Boc.

40

b) Acoplamiento con ESPACIADOR y pro-quelante DOTA (Bu)₃

Los acoplamientos se llevaron a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

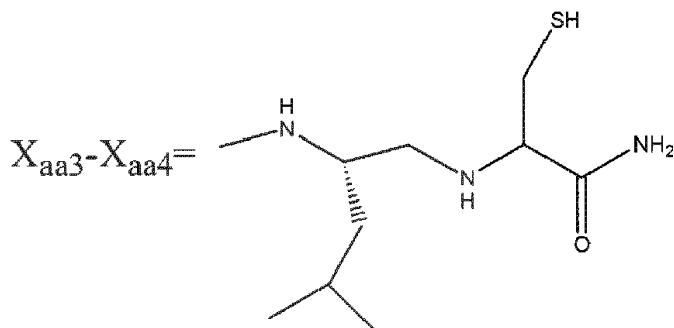
45

c) Desprotección, corte y purificación

La desprotección, corte y purificación se llevaron a cabo tal como se ha indicado anteriormente. Los conjugados se analizaron mediante RP-HPLC analítica y se caracterizaron mediante espectroscopía de masas (EM-IEP).

50

Compuesto 13: A=DOTA, B₁=4-amino-1-carboximetil-piperidina; B₂=ninguno, Xaa₁=DPhe; Xaa₂=Gly; Xaa₃=Leu ψ (CH₂NH); Xaa₄=Cys



DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂; C₇₃H₁₁₀N₂₀O₁₇S, calculado (m/z): 1571,8, observado [M+Na]⁺: 1593,6.

5

Ejemplo 4

Radiomarcaje de los conjugados sintetizados (Compuestos 1 a 13)

10 Procedimiento general

A una alícuota de 10 µg del conjugado de quelante-antagonista de péptido bombesina en agua se añadieron 1 a 2 mCi de una solución acuosa de (¹¹¹InCl₃, ¹⁷¹LuCl₃ o ^{67/68}GaCl₃) y 250 a 500 µl de tampón de acetato sódico 0,4 M (pH=5). Dicha solución se calentó durante 30 min. a 95°C y se enfrió hasta la temperatura ambiente durante 10 min. 15 Se añadió una alícuota de 5 µl de la mezcla de reacción a 25 µl de solución de Ca-DTPA (0,1 M, pH 5,2) y se analizó mediante HPLC para determinar la cantidad de radionúclido no marcado.

Ejemplo 5

20 Marcaje de los conjugados sintetizados con ¹¹⁵In.

El acomplejamiento de los análogos de bombesina con ^{nat}In se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo. Se utilizó ^{nat}In en forma de solución de ^{nat}InCl₃ y en una proporción molar de 1:1.

25 Ejemplo 6 (ensayos in vitro)

Materiales y métodos para la caracterización in vitro de antagonistas del receptor de PLG

Reactivos y péptidos

30 Todos los reactivos eran del mejor grado disponible y se obtuvieron de proveedores habituales. El anticuerpo monoclonal de epítopo de hemaglutinina (HA) de ratón se obtuvo de Covance (Berkeley, CA). Los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 de cabra anti-IgG de ratón (H+L) se obtuvieron de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). La bombesina y el antagonista [D-Phe⁶, Leu-NHEt¹³, des-Met¹⁴]-bombesina(6-14) (RPLG-ANTAG) se obtuvo de Bachem (Bubendorf, Suiza). RM26, RM1b, In-RM1b y ¹⁷⁵Lu-AMBA fueron proporcionados por H.R. Mäcke (Basel, Suiza). El kit de ensayo de Fluo-4NW calcio se obtuvo de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR).

Líneas celulares

40 Se generaron células 293 de riñón embrionario humanas (HEK293) que expresaban establemente el receptor de PLG humana etiquetada por epítopo HA (HEK-RPLG) se generaron tal como se ha descrito anteriormente (Cescato et al., 2008) y se cultivaron a 37°C y con 5% de CO₂ en medio de Eagle modificado por Dulbecco con GlutaMAX™-I (DMEM) que contenía suero de feto bovino (SFB) al 10% (v/v), 100 U/ml de penicilina, 100 µ/ml de estreptomicina y 750 µg/ml de G418. Se obtuvieron células de cáncer de próstata humano (células PC3) del DSMZ (Deutsche 45 Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ nº ACC465) y se cultivaron a 37°C y con 5% de CO₂ en medio F12K de Ham que contenía L-glutamina 2 mM y complementado con SFB al 10% (v/v), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Todos los reactivos de cultivo eran de Gibco BRL (Grand Island, NY).

Mediciones de afinidad de unión

50 Se determinó la afinidad de unión del receptor de PLG de los diversos compuestos mediante autorradiografía de receptores in vitro en secciones criostáticas de carcinomas de próstata bien caracterizados o en secciones de pellets de células HEK-RPLG o PC3 tal como se ha indicado anteriormente (Markwalder et al., Can. Res. 59:1152-1159, 1999; Reubi et al., Eur. J. Nucl. Med. 27: 273-282, 2000; Reubi et al., Clin. Cancer Res. 8:1139-1146, 2002). Los radioligandos utilizados eran ¹²⁵I-[Tyr⁴]-bombesina, que es conocido que marca preferentemente los receptores de

PLG (Vigna et al., Gastroenterology 93: 1287-1295, 1987) y ^{125}I -[D-Tyr⁶, β -Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]-bombesina (6-14) como ligando universal de receptor de bombesina (Gastroenterology 93:1287-1295, 1987). Ver los resultados en la Tabla 1.

5 Microscopía de inmunofluorescencia

Se llevaron a cabo ensayos de internalización basados en microscopía de inmunofluorescencia con células HEK-RPLG tal como se ha indicado anteriormente (Cescato et al., 2006; Cescato et al., 2008). Brevemente, se cultivaron células HEK-RPLG en placas de cuatro pocillos de 35 mm recubiertas con poli-D-lisina (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania). Para el experimento, las células se trataron con bombesina 10 nM o con 1 μM de los diversos análogos de bombesina o para evaluar el antagonismo potencial con bombesina 10 nM en presencia de un exceso de 100 veces de estos diversos análogos durante 30 min. a 37°C y con 5% de CO₂ en medio de cultivo y después se procesaron para microscopía de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón de epítopo HA a una dilución de 1:1.000 como primer anticuerpo y Alexa Fluor 488-anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H+L) a una dilución de 1:600 como anticuerpo secundario. Se obtuvieron imágenes de las células utilizando un microscopio de inmunofluorescencia Leica DM RB y una cámara Olympus DP10.

La internalización de receptor de PLG inducida por la bombesina resultó eficientemente antagonizada por los análogos de bombesina Compuesto 1, In-Compuesto 1, Compuesto 1b y RPLG-ANTAG. Las células HEK-RPLG se trataron durante 30 min. con vehículo (sin péptido, a) o con 10 nmoles/l de bombesina (b), una concentración inductora de un efecto de internalización submáximo. Los paneles (d, f, h, j) muestran células tratadas con 10 nmoles/l de bombesina en presencia de 1 $\mu\text{moles/l}$ de los análogos Compuesto 1b, RPLG-ANTAG, Compuesto 1 y In-Compuesto 1. El efecto del Compuesto 1b, RPLG-ANTAG, Compuesto 1 y In-Compuesto 1 por sí solo a una concentración de 1 $\mu\text{mol/l}$ se muestra en los paneles (c, e, g, i, k). Tras la incubación con los péptidos, las células se procesaron para la inmunocitoquímica tal como se ha indicado anteriormente. Una clara tinción perinuclear punteada era detectable para las células tratadas con bombesina. Esta tinción punteada resultó anulada eficientemente con un exceso de los análogos Compuesto 1, In-Compuesto 1, Compuesto 1b y RPLG-ANTAG. El Compuesto-1, In-Compuesto 1, Compuesto 1b y RPLG-ANTAG administrados solos no presentaron ningún efecto sobre la internalización del receptor de PLG.

Ver los resultados en la Tabla 1 y en la figura 2.

Ensayo de liberación de calcio

35 Se midió la liberación del calcio intracelular en células PC3 utilizando el kit de ensayo Fluo-4NW Calcio tal como se ha descrito anteriormente (Magrys et al., J. Clin. Immunol. 27:181-192, 2007; Michel et al., Cescato et al., J. Nucl. Med. 49: 318-326, 2008). Brevemente, se sembraron placas de 96 pocillos con células PC3 (10.000 células en cada pocillo) y se cultivaron durante 2 días a 37°C y con 5% de CO₂ en medio de cultivo. El día del experimento las células se lavaron con tampón de ensayo (1xHBSS, HEPES 20 mM) que contenía probenecid 2,5 mM y después se cargaron con 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de pigmento Fluo-4NW en tampón de ensayo que contenía probenecid 2,5 mM durante 30 min. a 37°C y con 5% de CO₂ y después durante 30 min. adicionales a temperatura ambiente. Para medir la movilización del calcio intracelular tras la estimulación con los análogos de bombesina que debían someterse a ensayo, las células cargadas con pigmento se transfirieron a un aparato SpectraMax M2^e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se registró la movilización del calcio intracelular en un análisis cinético durante 60 s a temperatura ambiente, realizando un seguimiento de la emisión de la fluorescencia a 520 nm (con $\lambda_{\text{ex}}=485$ nm) en presencia de los análogos a las concentraciones indicadas. Se midió la fluorescencia máxima (F-max) tras la adición de yonomicina 25 μM . Se realizaron mediciones de línea base (línea base F) para las células no tratadas y cargadas de pigmento. Se muestran los datos como porcentaje de la respuesta máxima de calcio (F-max - F-línea base=100% de respuesta máxima de calcio), tal como se ha descrito anteriormente (Magrys et al., J. Clin. Immunol. 27:181-192, 2007; Michel et al., Cescato et al., J. Nucl. Med. 49: 318-326, 2008). Todos los experimentos se repitieron por lo menos tres veces por triplicado.

55 La figura 1 muestra que In-Compuesto 1 y el compuesto 1a se comportan como antagonistas que desplazan la curva de dosis-respuesta de la bombesina hacia la derecha en presencia de bombesina (BB).

Ver los resultados en la Tabla 1 y en la figura 1.

Compuesto 1: DOTA-Gly-aminobenzoil-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 2: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

60 Compuesto 3: DOTA-ácido 4-amino-1-piperidín-4-carboxílico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 4: DOTA-ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

65 Compuesto 5: DOTA-(ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico)-(4-amino-1-carboximetil-piperidín)-D-Phe-

Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 6: DOTA-ácido diaminobutírico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

5 Compuesto 7: DOTA-4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 8: DOTA-ácido (5-amino-3-oxa-pentil)-succinámico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

10 Compuesto 9: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Compuesto 10: DOTA-(ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

15 Compuesto 11: DOTA-ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Compuesto 12: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)-Phe-NH₂

20 Compuesto 13: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)-Cys-NH₂

Compuesto 14: N₄-triazoles-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂.

TABLA 1. Unión in vitro de receptor de PLG, señalización y propiedades de internalización de los análogos de BN

Compuesto	Media de IC ₅₀ (nM) de unión ± SEM	Señalización de movilización del Ca ⁺⁺	Internalización de receptor
1	30 ± 4,5	ANTAG/ningún efecto agonista	ANTAG/ningún efecto agonista
¹¹⁵ In-1	16 ± 5,3	ANTAG/ningún efecto agonista	ANTAG/ningún efecto agonista
2	9,7 ± 3,8	ANTAG/ningún efecto agonista	ANTAG/ningún efecto agonista
¹¹⁵ In-2	9,3 ± 1,9	ANTAG/ningún efecto agonista	ANTAG/ningún efecto agonista
3	43 ± 14	ANTAG/ningún efecto agonista	ANTAG/ningún efecto agonista
4	21 ± 6,5	ANTAG/ningún efecto agonista	ANTAG/ningún efecto agonista
5	7,3 ± 0,6	ANTAG/ningún efecto agonista	ANTAG/ningún efecto agonista
6	7,4 ± 2,2	ANTAG/ningún efecto agonista	ANTAG/ningún efecto agonista
7	11 ± 0	NA	NA
8	19 ± 3,0	NA	NA
9	3,2 ± 1,3	ANTAG/ningún efecto agonista	ANTAG/ningún efecto agonista
¹¹⁵ In-9	2,5 ± 0,2	ANTAG/ningún efecto agonista	ANTAG/ningún efecto agonista
10	6,9 ± 0,5	ANTAG/ningún efecto agonista	NA

25 Se midieron las afinidades de unión de los compuestos 1, 2 y 9 tras el acomplejamiento con el isótopo no radioactivo ¹¹⁵In. Los datos revelan que el acomplejamiento con isótopo no afecta a la afinidad de unión al receptor ni a las propiedades del antagonista.

30 Métodos estándares en publicaciones relevantes:

Cescato R, Schulz S, Waser B, et al. Internalization of sst2, sst3 and sst5 receptors: Effects of somatostatin agonists and antagonists. J. Nucl. Med. 47:502-511, 2006.

35 Cescato R, Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, Charalambidis D, Piccand V, Reubi JC. Bombesin Receptor Antagonists May Be Preferable to Agonists for Tumor Targeting. J. Nucl. Med. 49:318-326, 2008.

Magrys, A.; Anekonda, T.; Ren, G.; Adamus, G. The role of anti-alpha-enolase autoantibodies in pathogenicity of autoimmune-mediated retinopathy. J. Clin. Immunol. 27:181-192, 2007.

Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res.* 59:1152-1159, 1999.

- 5 Michel, N.; Ganter, K.; Venzke, S.; Bitzegeio, J.; Fackler, O. T.; Kepplet, O. T. The Nef protein of human immunodeficiency virus is a broad-spectrum modulator of chemokine receptor cell surface levels that acts independently of classical motifs for receptor endocytosis and Galphai signaling. *Mol. Biol. Cell.* 17:3578-3590, 2006.
- 10 Reubi JC, Schaer JC, Waser B, et al. Affinity profiles for Human somatostatin receptor sst₁-sst₅ of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur. J. Nucl. Med.* 27:273-282, 2000.
- 15 Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, et al. Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers: Detection with the Universal Radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta ALA(11), PHE(13), NLE(14)] Bonabesin(6-14). *Clin. Cancer Res.* 8:1139-1146, 2002.
- 15 Vigna SR, Mantyh CR, Giraud AS, et al. Localization of specific binding sites for bombesin in the canine gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 93:1287-1295, 1987.

Ejemplo 7

Experimentos de biodistribución en ratones desnudos portadores de tumor PC-3

En ratones desnudos hembra se implantaron por vía subcutánea 10 millones de células tumorales PC-3 que se habían expandido recientemente en una solución salina tamponada con fosfato esterilizada (PBS, pH 7,4). Once días después de la inoculación en los ratones se inyectaron en la vena de la cola 10 pmoles de péptidos marcados radioactivamente (aproximadamente 0,18 MBq) diluidos en NaCl (albúmina de suero bovino al 0,1%, pH 7,4, volumen inyectado total=100 µl). Para la determinación de la incorporación no específica en el tumor o en órganos positivos para receptor, en un grupo de 4 animales se preinyectaron 0,02 pmoles de péptido no marcado en solución de NaCl al 0,9% y tras 5 min., se inyectó péptido radiomarcado. A intervalos de 1, 4, 24, 48 y 72 h, se sacrificaron los ratones (en grupos de 3 o 4) y se recolectaron los órganos de interés, se enjuagaron en exceso de sangre, se pesaron y se realizó un recuento en un contador γ.

¹¹¹In-COMPUESTO 1

¹¹¹In- DOTA-Gly-aminobenzoil-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Cantidad de inyección:	5 µCi / 10 pmoles / 100 µl/ratón
Compuesto de bloqueo	2.000 veces
Animal:	Ratones desnudos portadores de tumor PC3: 3 ratones/grupo
Punto temporal:	1h, 4h, 4h de bloqueo, 24 h, 48 h, 72 h

Órgano	1h	4 h	4 h de bloqueo	24 h	48 h	72 h
Sangre	0,86±0,17	0,04±0,00	0,02±0,01	0,01±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
corazón	0,28±0,05	0,04±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,00±0,00	0,01±0,00
Hígado	1,93±0,29	0,38±0,05	0,39±0,08	0,19±0,01	0,10±0,01	0,09±0,02
bazo	0,57±0,21	0,12±0,01	0,09±0,01	0,05±0,01	0,04±0,01	0,02±0,00
pulmón	0,82±0,13	0,12±0,04	0,10±0,03	0,05±0-01	0,02±0,01	0,01±0,00
riñón	3,99±0,33	1,93±0,18	2,67±0,10	1,01±0,06	0,50±0,09	0,28±0,02
estómago	3,31±0,63	0,76±0,14	0,07±0,03	0,05±0,02	0,01±0,00	0,02±0,01
intestino	1,73±0,48	0,20±0,10	0,07±0,01	0,04±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
adrenal	4,14±1,46	1,20±0,12	0,10±0,06	1,24±0,16	0,38±0,09	0,36±0,04
páncreas	21,92±1,34	0,32±0,31	0,07±0,02	0,15±0,02	0,06±0,01	0,06±0,01
pituitaria	7,80±1,90	0,85±0,45	0,11±0,09	0,21±0,19	0,03±0,03	0,05±0,07
músculo	0,19±0,06	0,03±0,01	0,02±0,00	0,03±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
hueso	0,40±0,10	0,18±0,07	0,04±0,01	0,14±0,03	0,03±0,00	0,03±0,01
tumor	14,24±1,75	13,46±0,80	0,46±0,00	6,58±1,14	2,08±0,12	1,31±023

Tumor a tejido	1 h	4 h	24 h	48 h	72 h
tumor:riñón	3,6	7,0	6,5	4,2	4,7
tumor:hígado	7,4	35,4	34,6	20,8	14,5
tumor:sangre	16,5	336,5	658,0	1600,0	1871,4
tumor:músculo	75,0	448,7	219,3	693,3	1091,7

⁶⁸Ga-COMPUESTO 1⁶⁸Ga-DOTA-Gly-aminobenzoil-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Animal:	Ratones desnudos portadores de tumor PC3; 3 ratones/grupo
Cantidad de inyección:	1,27 µCi / 10 pmoles / 100 µl/ratón
Compuesto de bloqueo	3.000 veces Compuesto 1
Punto temporal:	1 h, 1 h bloqueo, 2 h,

5

Órgano	1h	1 h de bloqueo	2 h
Sangre	0,86±0,09	0,55±0,30	0,39±0,15
corazón	0,33±0,21	0,30±0,18	0,14±0,02
Hígado	1,14±0,37	1,05±0,60	0,98±0,32
bazo	1,29±0,53	0,08±0,05	0,03±0,01
pulmón	0,80±0,33	0,71±0,23	0,21±0,09
riñón	2,79±0,39	3,18±1,79	1,21±0,12
estómago	3,09±0,51	0,41±0,31	1,68±0,02
intestino	2,09±0,17	1,06±0,55	5,39±0,52
adrenal	3,31±0,78	0,07±0,06	0,89±0,62
páncreas	27,84±4,88	0,96±0,45	10,73±2,76
pituitaria	13,35±1,32	0,28±0,08	0,22±0,00
músculo	0,26±0,08	0,07±0,05	0,20±0,02
hueso	0,03±0,01	0,18±0,11	0,03±0,01
tumor	8,71±0,67	2,04±1,04	10,45±1,61

	1 h	2 h
tumor:riñón	3,13	8,64
tumor:hígado	7,66	10,68
tumor:páncreas	0,31	0,97
tumor:sangre	10,18	27,08
tumor:músculo	33,74	53,51

¹¹¹In-COMPUESTO 2¹¹¹In-DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

10

Cantidad de inyección:	5 µCi / 10 pmoles / 100 µl/ratón
Compuesto de bloqueo	2.000 veces
Animal:	ratones desnudos portadores de tumor PC3: 3 ratones/grupo
Punto temporal:	1h, 4h, 4h de bloqueo, 24 h, 48 h, 72 h

Órgano	1h	4 h	4 h de bloqueo	24 h	48 h	72 h
Sangre	0,77±0,28	0,05±0,04	0,13±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
corazón	0,32±0,09	0,04±0,03	0,09±0,01	0,02±0,01	0,01±0,00	0,02±0,02
Hígado	0,49±0,12	0,118±0,06	0,34±0,03	0,09±0,01	0,07±0,01	0,06±0,02
bazo	0,53±0,20	0,12±0,06	0,16±0,02	0,06±0,02	0,05±0,01	0,06±0,03
pulmón	0,70±0,30	0,10±0,07	0,19±0,01	0,04±0,03	0,11±0,24	0,04±0,02
Riñón	4,78±1,11	2,14±0,73	2,98±0,20	1,25±0,16	0,91±0,09	0,74±0,18
estómago	3,15±0,78	1,07±0,15	0,12±0,02	0,06±0,02	0,03±0,01	0,05±0,01
intestino	2,11±0,47	0,25±0,15	0,11±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01
adrenal	3,46±2,07	1,17±0,54	1,10±0,60	0,71±0,29	0,54±0,29	1,01±0,74
páncreas	22,64±4,71	1,55±0,48	0,10±0,00	0,32±0,09	0,19±0,04	0,19±0,02
pituitaria	7,00±5,68	0,59±0,55	0,58±0,49	0,07±0,33	0,21±0,33	0,51±0,24
músculo	0,29±0,17	0,05±0,04	0,06±0,02	0,02±0,01	0,01±0,01	0,02±0,01
hueso	0,91±0,68	0,35±0,57	0,35±0,11	0,20±0,18	0,12±0,11	0,15±0,05
tumor	15,23±4,78	11,75±2043	0,45±0,04	6,84±1,02	4,67±0,39	4,07±0,34

Tumor a tejido	1 h	4 h	24 h	48 h	72 h
tumor:riñón	3,2	5,5	5,5	5,1	5,5
tumor:hígado	30,9	64,6	74,1	67,2	63,0
tumor:sangre	19,9	243,9	2744,6	3823,7	3391,2
tumor:páncreas	0,7	7,6	21,4	24,6	21,4

ES 2 615 805 T3

tumor:músculo	52,0	260,2	436,6	354,5	165,4
---------------	------	-------	-------	-------	-------

⁶⁸Ga-COMPUESTO 2

⁶⁸Ga-DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

5

Radioligando	⁶⁸ Ga-COMPUESTO 2
Animal:	Ratones desnudos portadores de tumor PC3; 3 ratones/grupo
Cantidad de inyección:	1,27 µCi / 10 pmoles / 100 µl/ratón
Punto temporal:	1h

Órgano	1h
Sangre	0,03±0,01
corazón	0,19±0,02
Hígado	0,41±0,04
bazo	0,36±0,01
pulmón	0,34±0,03
riñón	1,87±0,08
estómago	2,13±0,34
intestino	1,54±0,22
adrenal	2,48±0,48
páncreas	11,63±0,19
pituitaria	0,36±0,19
músculo	0,13±0,00
hueso	0,23±0,03
tumor	9,31±1,58

	1 h
tumor: riñón	4,98
tumor: hígado	22,60
tumor:páncreas	0,80
tumor:sangre	20,85
tumor:músculo	74,02

¹¹¹In-COMPUESTO 4

¹¹¹In-DOTA-(ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

10

Cantidad de inyección:	5 µCi / 10 pmoles / 100 µl/ratón
Compuesto de bloqueo	2.000 veces
Animal:	ratones desnudos portadores de tumor PC3: 3 ratones/grupo
Punto temporal:	1h, 4h, 4h de bloqueo, 24 h, 48 h, 72 h

Órgano	1h	4 h	4 h de bloqueo	24 h
Sangre	0,21±0,02	0,02±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00
Corazón	0,08±0,01	0,02±0,00	0,02±0,00	0,00±0,00
Hígado	0,22±0,01	0,09±0,01	0,09±0,01	0,03±0,01
bazo	0,18±0,10	0,07±0,02	0,04±0,01	0,01±0,00
Pulmón	0,24±0,01	0,07±0,01	0,04±0,01	0,01±0,01
riñón	1,85±0,15	1,38±0,37	1,40±0,29	0,24±0,01
estómago	2,01±0,36	0,56±0,18	0,03±0,01	0,01±0,01
intestino	1,16±0,24	0,10±0,04	0,05±0,04	0,02±0,00
adrenal	2,18±0,93	0,86±0,17	0,07±0,06	0,59±0,16
páncreas	10,96±0,57	0,52±0,05	0,02±0,00	0,01±0,01
pituitaria	4,23±1,46	0,55±0,20	0,17±0,10	0,00±0,00
músculo	0,08±0,02	0,02±0,01	0,01±0,00	0,00±0,00
Hueso	0,16±0,06	0,12±0,04	0,02±0,01	0,04±0,02
tumor	10,56±0,70	8,63±1,13	0,45±0,06	3,23±0,52

Tumor a tejido	1 h	4 h	24 h
tumor:riñón	5,71	6,27	13,40
tumor:páncreas	0,96	16,71	345,16
tumor:sangre	49,67	552,10	3457,24

ES 2 615 805 T3

tumor:músculo	140,10	349,48	808,55
tumor:hueso	64,16	71,75	86,62

¹¹¹In-COMPUESTO 5

5 ¹¹¹In-DOTA-(ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico)-(4-amino-1-carboxi-metil-piperidín)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Animal:	ratones desnudos portadores de tumor PC3: 3-4 ratones/grupo
Cantidad de inyección:	5 µCi / 10 pmoles / 100 µl/ratón
Compuesto de bloqueo	2.000 veces
Punto temporal:	1h, 4h, 4h de bloqueo, 24 h

Órgano	1 h	4 h de bloqueo	4 h	24 h
Sangre	0,75 ± 0,21	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00
corazón	0,28 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Hígado	0,40 ± 0,09	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,05	0,11 ± 0,02
bazo	0,80 ± 0,28	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,01
pulmón	0,62 ± 0,15	0,05 ± 0,01	0,15 ± 0,19	0,51 ± 0,73
riñón	5,08 ± 0,72	1,76 ± 0,36	2,04 ± 0,15	1,37 ± 0,22
estómago	3,92 ± 1,26	0,06 ± 0,01	0,87 ± 0,58	0,05 ± 0,01
intestino	2,39 ± 0,42	0,03 ± 0,01	0,17 ± 0,10	0,05 ± 0,02
adrenal	3,63 ± 0,53	0,07 ± 0,02	0,68 ± 0,31	0,62 ± 0,16
páncreas	26,83 ± 4,34	0,06 ± 0,02	1,36 ± 0,81	0,33 ± 0,05
pituitaria	9,02 ± 0,99	0,23 ± 0,14	0,38 ± 0,16	0,46 ± 0,52
músculo	0,19 ± 0,07	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
hueso	0,34 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02
tumor	10,27 ± 0,36	0,61 ± 0,07	9,35 ± 0,73	6,33 ± 0,76

Tumor a tejido	1 h	4 h	24 h
tumor:sangre	13,73	319,66	1155,51
tumor:riñón	2,02	4,59	4,62
tumor:páncreas	0,38	6,90	19,16
tumor:músculo	53,65	475,17	364,92
tumor:hueso	29,93	124,55	76,65

¹¹¹In-COMPUESTO 9

10 ¹¹¹In-DOTA-DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Cantidad de inyección:	5 µCi / 10 pmoles / 100 µl/ratón
Compuesto de bloqueo	2.000 veces
Animal:	ratones desnudos portadores de tumor PC3: 3 ratones/grupo
Punto temporal:	1h, 4h, 4h de bloqueo, 24 h, 48 h, 72 h

Órgano	1h	4 h	4 h de bloqueo	24 h	48 h	72 h
Sangre	0,43±0,10	0,12±0,03	0,04±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
corazón	0,17±0,03	0,09±0,02	0,15±0,05	0,03±0,01	0,02±0,00	0,08±0,03
Hígado	0,73±0,12	0,49±0,14	0,40±0,02	0,20±0,02	0,11±0,01	0,10±0,02
bazo	1,13±0,41	0,57±0,24	0,23±0,03	0,21±0,06	0,15±0,04	0,15±0,04
pulmón	0,45±0,05	0,21±0,06	0,38±0,06	0,08±0,04	0,05±0,02	0,18±0,07
riñón	5,23±3,01	2,43±0,47	2,88±1,52	1,41±0,22	0,97±0,06	0,55±0,15
estómago	4,433±2,48	5,72±4,04	0,16±0,03	1,08±0,15	0,43±0,10	0,28±0,09
intestino	3,61±0,61	3,31±1,61	0,14±0,02	0,35±0,05	0,16±0,07	0,10±0,01
adrenal	10,66±2,64	5,16±1,55	1,36±0,56	2,31±0,96	2,24±1,43	1,84±0,36
páncreas	65,69±8,14	39,80±9,,25	0,18±0,04	4,52±0,53	2,30±0,19	1,06±0,19
pituitaria	12,63±3,26	5,54±2,07	3,72±1,62	0,71±0,37	0,56±0,24	2,56±0,28
músculo	0,22±0,06	0,14±0,04	0,13±0,07	0,05±0,01	0,03±0,01	0,08±0,04
hueso	1,31±1,29	0,71±0,25	1,61±0,52	0,29±0,14	0,23±0,13	1,08±0,83
tumor	9,18±1,16	13,17±5,01	038±0,08	8,39±0,88	5,89±0,351	3,04±1,44

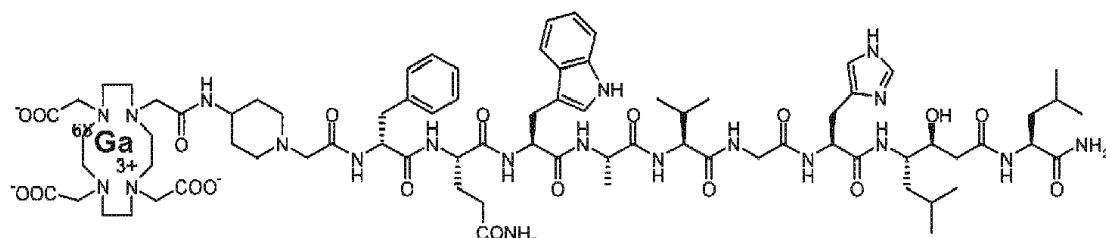
Tumor a tejido	1 h	4 h	24 h	48 h	72 h
tumor:riñón	1,8	5,4	6,0	6,1	6,2
tumor:hígado	12,7	26,7	42,4	53,0	35,0
tumor: Sangre	21,1	109,7	631,4	803,8	304,0
tumor:páncreas	0,2	0,3	1,9	2,6	2,9
tumor:músculo	42,6	94,7	169,2	191,9	42,9

Ejemplo 8

5 Imágenes de PET/TC, experimento de biodistribución en ratones portadores de tumor PC-3 y LNCaP de Ga-68-DOTA Compuesto 2, afinidad de unión y estabilidad

Obtención de imágenes + Biodistribución

10 Compuesto 2: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂



Fórmula empírica: C₇₈H₁₁₅N₂₀O₁₉Ga; Peso molecular: 1704,89.

15 Se obtuvieron imágenes de Ga-68-DOTA-Compuesto 2 en un microPET/TC (Inveon, Siemens) en ratones portadores de tumor PC-3 y LNCaP 1 h después de la inyección de 10 MBq de radiotrazador. Debido a la rápida eliminación renal de dicho antagonista de bombesina se observó una actividad de fondo muy baja con sólo algo de incorporación en riñón y vejiga. Se bloqueó eficazmente un contraste tumoral elevado visible en ambos xenoinjertos con 100 µg de bombesina o con el Compuesto no radioactivo 2 mismo. Los receptores de bombesina se bloquearon con éxito utilizando bombesina, conduciendo a una pérdida crítica de señal en el tumor, figura 3a y 3b en ratones portadores de tumor PC-3 + figura 4a y 4b, ratones portadores de tumor LNCaP.

Afinidad de unión

25 Se determinó la afinidad de unión de Ga-68-DOTA-Compuesto 2 para PLGr mediante dos métodos diferentes: la autorradiografía de receptores sobre tejidos humanos y un ensayo celular con células PC-3. Ambos métodos proporcionaron una afinidad de unión elevada del Compuesto 2, con una IC₅₀ de ~8 nM basada en el péptido no radioactivo DOTA-Compuesto 2.

30 Estabilidad en plasma y microsomas de ratón

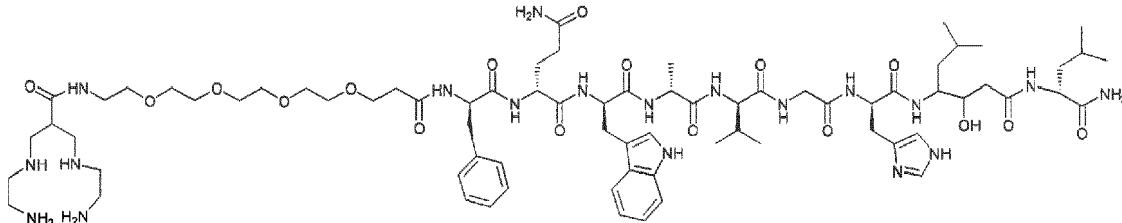
35 Ga-68-DOTA-Compuesto 2 mostró una buena estabilidad metabólica, medida mediante métodos *in vitro* e *in vivo* diferentes. Se investigó la estabilidad *in vivo* en el plasma de Ga-68-DOTA-compuesto 2 en ratones no portadores de tumor. Se analizó el plasma y la orina de los ratones mediante HPLC 1, 3, 5, 10 y 15 min. después de la inyección intravenosa de aprox. 20 MBq de Ga-68-DOTA-Compuesto 2 (figura 10a, b, c, d y e). Tras algunos minutos, se observó una degradación plasmática menor del radiotrazador, mostrando dos metabolitos muy pequeños/polares en tiempos de retención 1,3 min. y 1,5 min., que también se observaron como metabolitos principales en la orina. Apareció el compuesto mismo en un tiempo de retención de 11,6-11,7, mostrando un doble pico desde 5 min. p.i.

40 Se determinó la estabilidad microsómica de Ga-68-DOTA-Compuesto 2 utilizando microsomas de ratón y humanos incubados con el radiotrazador y analizados mediante HPLC. No se observó degradación por microsomas de ratón o humanos de Ga-68-DOTA-Compuesto 2. Las impurezas menores detectadas en los cromatogramas también se observaron sin el cofactor microsómico.

Ejemplo 9

45 Imágenes de SPECT/TC y experimento de biodistribución en ratones portadores de tumor PC-3 de ^{99m}Tc-ARN4-06
50 Ver el protocolo experimental anteriormente.

Radiolígando	^{99m} Tc-ARN4-06
Animal:	ratones desnudos portadores de tumor PC3; 3 ratones/grupo
Cantidad de inyección:	10 µCi / 10 pmoles / 100 µl/ratón
Punto temporal:	1h, 4h y 24 h



Órgano	1 h	desv. est.	4 h	desv. est.	24 h	desv. est.
Sangre	1,32	0,07	0,33	0,05	0,04	0,01
corazón	0,64	0,15	0,22	0,03	0,10	0,04
hígado	6,31	1,16	3,62	1,16	1,19	0,36
bazo	3,91	0,66	1,29	0,53	0,87	0,18
pulmón	5,11	1,00	3,17	1,51	1,69	0,84
Riñón izquierdo	6,55	0,59	2,73	0,42	1,28	0,30
estómago	8,09	1,45	5,44	1,26	0,61	0,19
intestino	8,41	2,39	2,02	0,80	0,16	0,08
adrenal	11,99	1,62	6,31	0,27	1,41	0,45
páncreas	72,50	8,98	11,18	2,89	0,41	0,20
pituitaria	6,86	2,85	2,12	0,59	0,83	0,31
músculo	0,27	0,03	0,07	0,00	0,18	0,12
hueso	0,78	0,13	0,45	0,18	0,35	0,20
tumor	28,66	1,75	34,68	3,71	18,40	2,58
Riñón	6,26	0,48	2,84	0,49	1,24	0,32

Radiolígando	^{99m} Tc-ARN4-05
Radiolígando	^{99m} Tc-ARN4-05

5

Proporción tumor:órgano	1 h	4 h	24 h
tumor:sangre	20,79	85,11	455,94
tumor:corazón	36,75	150,38	176,45
tumor:hígado	4,37	9,50	15,47
tumor:bazo	7,50	20,51	21,05
tumor:pulmón	5,64	11,78	10,88
tumor:riñón	4,26	12,92	14,35
tumor:estómago	3,32	5,83	30,02
tumor:intestino	3,20	16,51	117,53
tumor:adrenal	2,31	2,62	13,07
tumor:páncreas	0,38	3,28	44,93
tumor:pituitaria	4,43	4,40	22,14
tumor:músculo	116,82	283,06	99,65
tumor:hueso	34,10	35,16	52,06
tumor:riñón	4,25	12,25	14,87

La figura 6 muestra una imagen de SPECT/TC de ^{99m}Tc-ARN4-06 (15 MBq/200 pmoles).

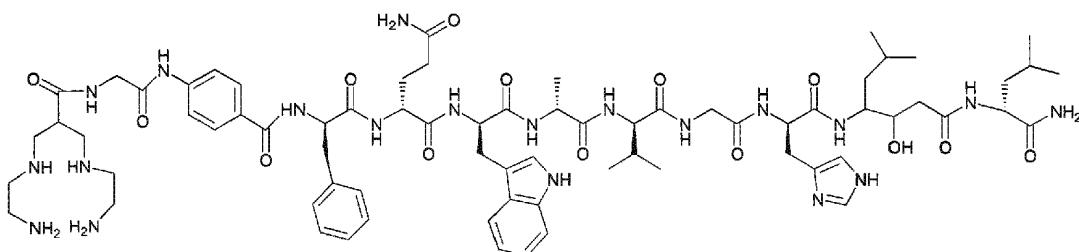
Ejemplo 10

10

Imágenes de SPECT/TC y experimento de biodistribución en ratones portadores de tumor PC-3 de ^{99m}Tc-ARN4-05

Ver el protocolo experimental anteriormente.

Animal:	ratones desnudos portadores de tumor PC3; 6 a 9 ratones/grupo
Cantidad de inyección:	10 µCi / 10 pmoles / 100 µl/ratón
Punto temporal:	1h, 4h, 24 h



Órgano	1 h	desv. est.	4 h	desv. est.	24 h	desv. est.
Sangre	1,69	0,14	0,40	0,05	0,09	0,02
corazón	0,68	0,02	0,20	0,03	0,14	0,07
hígado	12,32	1,01	7,75	0,62	3,88	0,40
bazo	4,00	0,60	1,72	0,34	0,83	0,22
Pulmón	3,11	0,47	1,24	0,41	1,15	1,47
Riñón izquierdo	10,50	1,20	6,12	1,17	1,42	0,13
estómago	5,68	0,01	4,86	1,04	0,42	0,15
intestino	6,97	1,57	2,12	0,37	0,12	0,01
adrenal	19,05	3,06	7,91	2,70	2,08	0,31
páncreas	64,86	6,72	19,86	2,35	0,57	0,21
pituitaria	3,67	2,03	1,15	0,11	1,53	1,33
músculo	0,43	0,16	0,08	0,02	0,11	0,04
hueso	1,34	0,26	0,57	0,11	0,41	0,19
tumor	22,50	2,62	29,91	4,00	15,16	0,45

Proporción tumor:órgano	1 h	4 h	24 h
tumor:sangre	13,30	74,77	167,74
tumor: corazón	33,19	149,55	105,06
tumor:hígado	1,83	3,86	3,91
tumor:bazo	5,62	17,41	18,21
tumor:pulmón	7,24	24,11	13,21
tumor:riñón	2,14	4,89	10,71
tumor:estómago	3,96	6,15	35,99
tumor:intestino	3,23	14,09	129,43
tumor:adrenal	1,18	3,78	7,30
tumor:páncreas	0,35	1,51	26,66
tumor:pituitaria	6,14	25,96	9,93
tumor:músculo	52,54	364,22	133,21
tumor:hueso	16,80	52,85	37,06

5

La figura 8 muestra una imagen de SPECT/TC de ^{99m}Tc -ARN4-05 (15 MBq/200 pmoles).

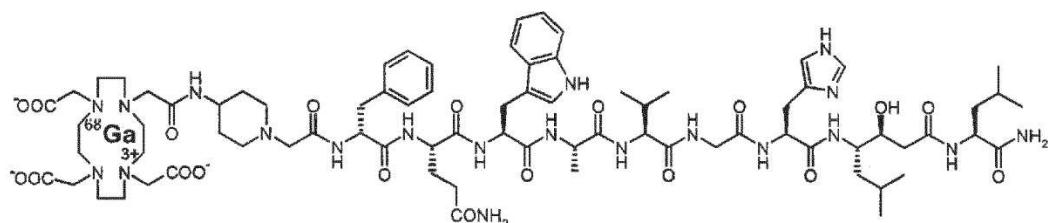
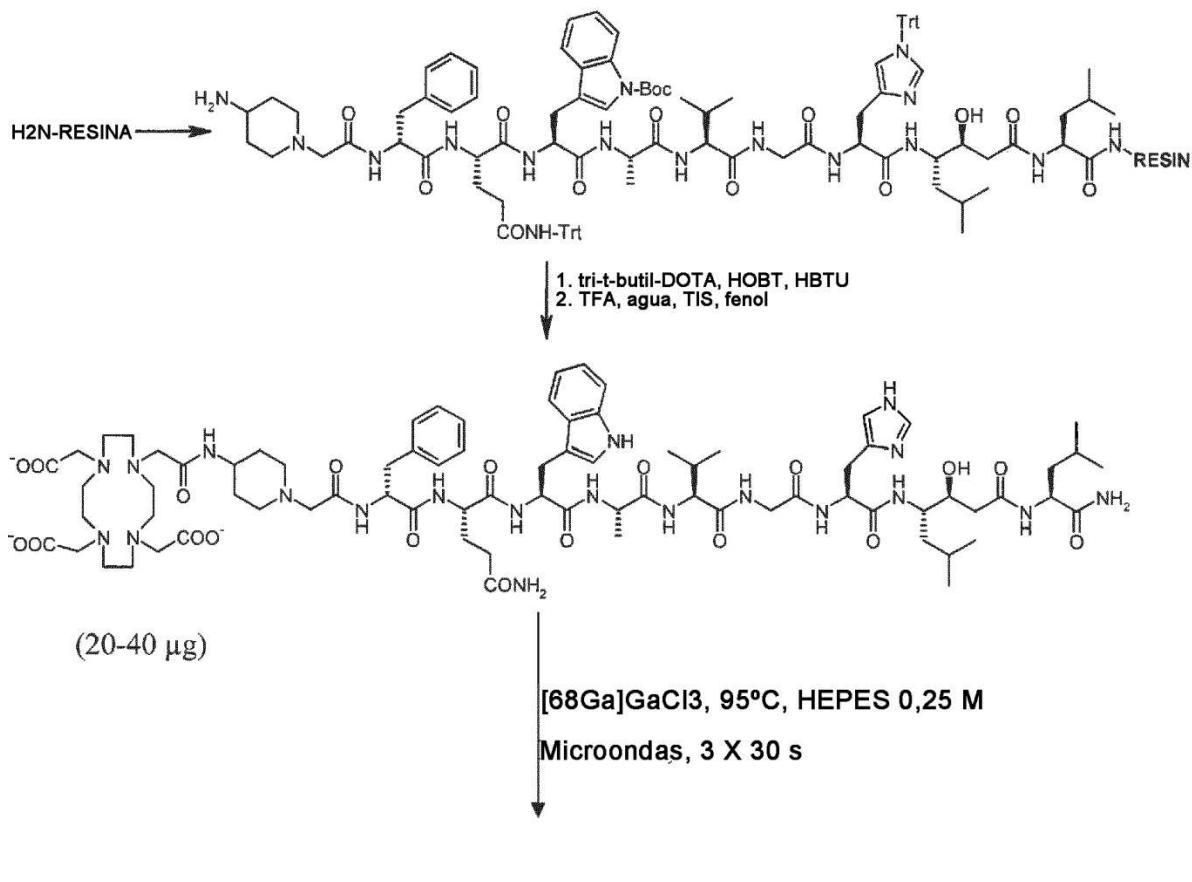
Ejemplo 11

10 Síntesis de Ga-68-DOTA-Compuesto 2

Etapa 1: se sintetizaron péptidos no radioactivos mediante síntesis peptídica en fase sólida (SPFS) siguiendo la estrategia estándar de Fmoc con resina de amida de Rink soportada en poliestireno. Etapa 2:

15 350 μl de HEPES 0,25 M en vial Wheaton V

- Adición de $[^{68}\text{Ga}]$ GaCl₃ en 400 μl de acetona al 97,6%/HCl 0,05N
- Ajustar pH a ~3,5 con HCl 0,1M
- Adición de 40 μg de péptido en 40 μl de agua
- 20 • Calentamiento 75 W (95°C) durante 30 s
- Reposo durante 30 s
- Repetición de calentamiento y reposo tres veces más
- Adición de 5 ml de agua a la mezcla de reacción
- Inmovilización sobre tC 18 Light SPE
- 25 • Lavado con agua (5 ml)
- Elución con EtOH (500 μl)



Rendimiento radioquímico (no optimizado)	79 a 231 MBq (32 - 60% d.c.)
Actividad inicial	189 a 593 MBq
Nº de marcas	10
Negativos	0
Pureza radioquímica	>98% (según HPLC e ITLC)
Actividad específica	3,2 a 11,8 GBq/µmol

- 5 La figura 9 muestra el análisis de HPLC de Ga-68-DOTA-Compuesto 2 en una columna de fase inversa. Pureza del producto

Columna:	ACE 5µ C18 50 x 4,6mm
Solvente:	Solvente A: H2O + TFA al 0,1%
Solvente B:	MeCN + TFA al 0,1%
Gradiente:	5% a 95% en 7 min.
Caudal	2 ml/min.

Ejemplo 12

10

Estabilidad en suero de Lu-177-DOTA-Compuesto 2

Compuesto 2: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidín-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

También se investigó la estabilidad en suero humano de Lu-177-DOTA-Compuesto 2 marcado radioactivamente con Lu-177. Tras 96 h de incubación de Lu-177-DOTA-Compuesto 2 en suero humano todavía se encontraba intacto 70% del compuesto, según análisis mediante métodos de HPLC (figura 11). A 1 ml de suero humano recién preparado, previamente equilibrado en un medio con 5% de CO₂ a 37°C, se añadieron 0,03 nmoles de solución 5 estándar de péptido marcado con ¹⁷⁷Lu. La mezcla se incubó en un medio con 5% de CO₂ a 37°C. En diferentes puntos temporales se extrajeron alícuotas de 100 µl (por triplicado) y se trataron con 200 µl de EtOH para precipitar las proteínas en el suero. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 15 min. a 5.000 rpm. Se extrajeron 10 50 µl del sobrenadante para el recuento de la actividad en un contador de pocillos γ, se lavó dos veces el sedimento con 1 ml de EtOH y se contó, y se comparó la actividad del sobrenadante con la actividad del pellet, proporcionando el porcentaje de péptidos no unidos a proteínas o el metal radioactivo transferido a las proteínas del suero. Se analizó el sobrenadante mediante HPLC (eluyentes: A=ácido trifluoroacético al 0,1% en agua y B=acetonitrilo; 15 gradiente: 0 min. 95% de A; 20 minutos: 50% de A) para determinar la estabilidad del péptido en el suero.

La figura 11 muestra la estabilidad de Lu-177-DOTA-Compuesto 2 en el suero humano.

Ejemplo 13

Comparación entre F18-Colina y F18-FDG

20 Biodistribución de Ga-68-RM2, ver la Tabla a continuación.

Ga-68-	DOTA-	4-amino-1-carboximetil-piperidín-	D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH ₂
--------	-------	-----------------------------------	---

25 a 1 h p.i. en ratones portadores de tumor PC-3 se comparó con el trazador F-18 [¹⁸F]fluoroetilcolina (FEC) utilizado para la formación de imágenes de cáncer de próstata y FDG, el trazador F18 estándar de oro en oncología. Las proporciones de tumor a tejido elevadas subrayan la utilidad diagnóstica del compuesto con Ga-68 RM2 para la formación de imágenes de PET.

Ver la figura 12.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presenta la fórmula general (I)



en la que

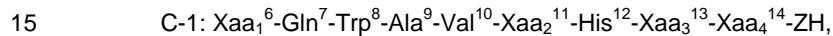
x es un número entero de 1 a 3,

n es un número entero de 1 a 6,

A es un quelante de metal que comprende por lo menos un metal radionúclido,

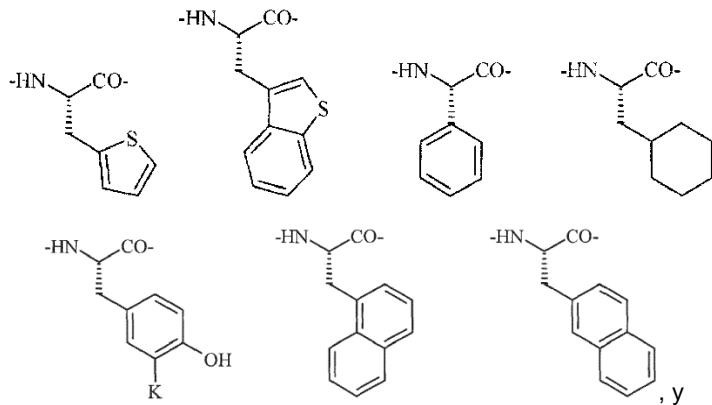
B es un espaciador unido al extremo N de C o un enlace covalente,

C es un antagonista de péptido análogo de la bombesina de secuencia C-1 a C-3, en la que:



en la que:

20 Xaa₁ es D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo que presenta cualquiera de las fórmulas descritas a continuación



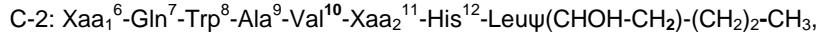
25

K es F, Cl, I o NO₂,

Xaa₂ es Gly o β-Ala,

Xaa₃ es estatina, 4-Am,5-MeHpA o 4-Am,5-MeHxA,

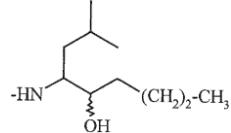
30 Xaa₄ es Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle o iso-Bu-Gly, y Z es NH, O;



en la que:

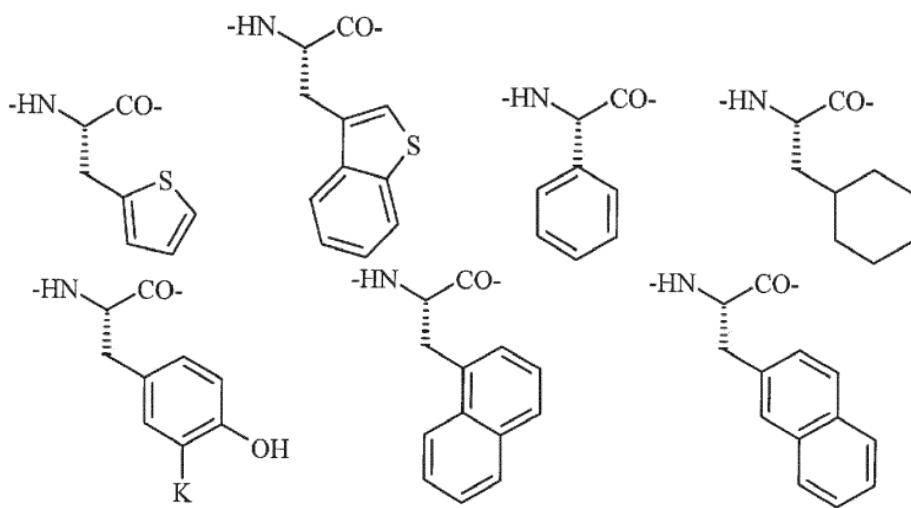
35

Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃ es



40

Xaa₁ es D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo que presenta cualquiera de las fórmulas descritas a continuación



y

5

K es F, Cl, I o NO₂,
Xaa₂ es Gly o β-Ala;

10

C-3: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₅¹³-Xaa₆¹⁴-ZH, en la que:

10

Xaa₁ es D-Phe,
Xaa₂ es Gly,
Xaa₅ es Leuψ-CH₂NH-,
Xaa₆ es Cys o Phe,

15

y

20

Z es NH,
y sales farmacéuticamente aceptables de un ácido inorgánico u orgánico del mismo, hidratos, complejos, ésteres, amidas y solvatos del mismo.

25

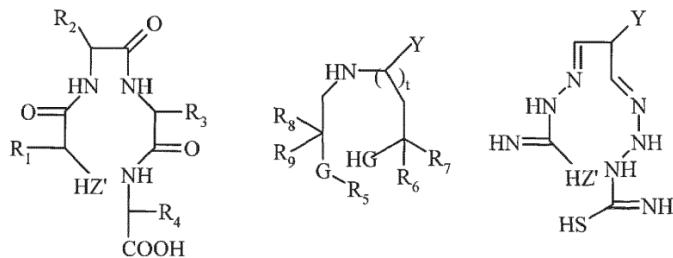
2. Conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según la reivindicación 1, en el que el quelante de metal (A) es un quelante de metal para metales trivalentes o para metales pentavalentes.

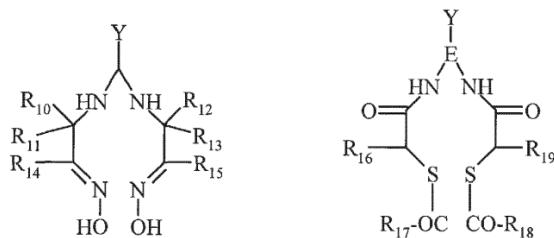
25

3. Conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según la reivindicación 2, en el que el quelante de metal para metales trivalentes se selecciona de entre el grupo que comprende quelantes a base de DOTA, NODASA, NODAGA, NOTA, DTPA, EDTA, TETA y TRITA.

30

4. Conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según la reivindicación 2, en el que el quelante de metal para metales pentavalentes se selecciona de entre el grupo que comprende:





en las que

- 5 R₁-R₁₅ son independientemente entre sí átomos de hidrógeno o grupos alquilo (C₁-C₄), en las que, en la



fracción de la fórmula anterior, t es 1 o 2 o 3 y por lo menos uno de los átomos de carbono en dicha

10



fracción está sustituida con Y o no está sustituida con Y,

15

R₁₆ es un átomo de hidrógeno o un grupo CO₂ alquilo (C₁-C₄);

R₁₇ y R₁₈ son independientemente entre sí grupos alquilo (C₁-C₄) o grupos fenilo;

20

R₁₉ es CH₂-COOH o un derivado funcional del mismo;

E es alquíleno (C₁-C₄) o fenileno

25

opcionalmente el alquíleno (C₁-C₄) se sustituye con CO₂-alquilo, CH₂-CO-alquilo, CONH₂, o CONHCH₂-CO₂-alquilo,

opcionalmente el fenileno se sustituye con CO₂-alquilo,

en las que los grupos alquilo presentan 1 a 4 átomos de carbono;

30

G es NH o S;

Y es un grupo funcional que puede unirse a un grupo amino libre del péptido (extremo N) o con el espaciador, y

Z' es S o O.

35

5. Conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según la reivindicación 1, en el que el metal radionúclido para la formación de imágenes se selecciona de entre el grupo que comprende ^{133m}In, ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga, ⁵²Fe, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ¹¹¹In, ⁹⁷Ru, ²⁰³Pb, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁵¹Cr, ^{52m}Mn, ¹⁵⁷Gd, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br y ⁸²Br.

40

6. Conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según la reivindicación 1, en el que el metal radionúclido para radioterapia se selecciona de entre el grupo que comprende ¹⁸⁶Re, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ⁶⁹Er, ¹²¹Sn, ¹²⁷Te, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁸⁸Au, ¹⁹⁹Au, ¹⁶¹Tb, ¹⁰⁹Pd, ¹⁸⁸Rd, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁷⁷As, ¹⁶⁶Dy, ¹⁴⁹Ho, ¹⁵¹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁹Gd, ¹⁷²Tm, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹²⁵I, ¹²³I, ²¹³Bi, ²²⁵Ac, ¹²⁹I y ^{177m}Sn.

45

7. Conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según la reivindicación 1, en el que el espaciador B unido al extremo N de C presenta la fórmula general II:

II B₁-B₂

50 en la que

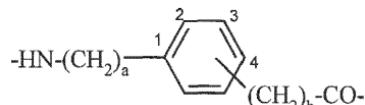
B₁ es un enlace covalente o un aminoácido natural o un aminoácido no natural o una diamina lineal o una diamina cíclica,

B₂ es un enlace covalente o un aminoácido natural o un aminoácido no natural o un ácido carboxílico lineal o un ácido carboxílico cíclico,

5 con la condición de que tanto B₁ como B₂ no puedan ser enlaces covalentes simultáneamente y de que, cuando B₁ sea una diamina, B₂ sea un ácido carboxílico.

8. Conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según la reivindicación 7, en el que el aminoácido no natural es un compuesto que presenta cualquiera de las fórmulas generales III, IV, V o VI, en el que

III



10

en la que

a es un número entero de 0 a 3,

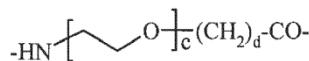
15

b es un número entero de 0 a 3,

y los patrones de sustitución relativa u opcionalmente 1,2-, 1,3- o 1,4-;

IV

20



en la que

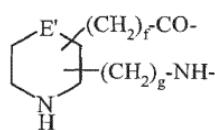
c es un número entero de 1 a 24,

25

d es un número entero de 1 a 6;

V

30



en la que

35

E' es NH o CH₂,

f es un número entero de 0 a 6,

40

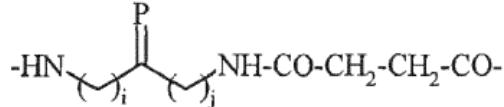
g es un número entero de 0 a 6;

45

cuando E' es CH₂, entonces el anillo de 6 miembros se sustituye opcionalmente en cualquier posición de carbono del anillo de 6 miembros en el mismo carbono del anillo o en carbonos diferentes,

cuando E' es NH, entonces el anillo de 6 miembros se sustituye opcionalmente en cualquier posición de carbono del anillo de 6 miembros en el mismo átomo de carbono del anillo o en diferentes átomos de carbono y/o en el átomo de nitrógeno con la condición de que f o g sea un número entero igual o superior a 1;

VI



50

en la que

- 5 i es un número entero de 1 a 6,
 j es un número entero de 1 a 6,
 P es O o H₂,
 preferentemente,
 i es un número entero de 1 a 3,
 j es un número entero de 1 a 3,
 P es O.
- 10 9. Conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, con la condición de que el conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina presente la fórmula general (I'):
- 15 (I') [A'- $(B)_n$]_x-C
 en la que
- 20 se incluye A' en lugar de A y presenta el mismo significado que A con la excepción de que es un quelante de metal libre de metal radionúclido.
- 25 10. Composición farmacéutica que comprende cualquiera de los conjugados de antagonista de péptido análogo de la bombesina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 11. Utilización de cualquiera de los conjugados de antagonista de péptido análogo de la bombesina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la unión a receptores de bombesina, preferentemente al receptor de péptido liberador de gastrina (PLG) y/o para la inhibición de receptores de bombesina, preferentemente el receptor de péptido liberador de gastrina (PLG).
- 35 12. Procedimiento para preparar cualquiera de los conjugados de antagonista de péptido análogo de la bombesina según la reivindicación 1, que comprende la etapa de:
- radioqulear el conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina que presenta la fórmula general (I') como se ha definido anteriormente con un metal radionúclido o átomo de metal adecuado.
- 40 13. Conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la utilización en un procedimiento para la formación de imágenes de receptores de bombesina, preferentemente un receptor de PLG que expresan las células tumorales y/o los vasos tumorales y peritumorales en un paciente, que comprende las etapas de:
- administrar a un paciente una cantidad radiofarmacéutica eficaz de dicho conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina; y
 - formar imágenes del metal radionúclido en el paciente.
- 45 14. Utilización de una cantidad radiofarmacéuticamente eficaz de un conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un agente de formación de imágenes para la formación de imágenes de receptores de bombesina, preferentemente un receptor de PLG que expresan las células tumorales y/o los vasos tumorales y peritumorales.
- 50 15. Utilización según la reivindicación 14, en la que dichas células tumorales se refieren a cánceres seleccionados de entre el grupo que comprende:
- cáncer de próstata, incluyendo las metástasis
 - cáncer de mama, incluyendo las metástasis
 - tumores estromales gastrointestinales
 - carcinomas pulmonares de células pequeñas
 - carcinomas de células renales,
 - tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos,
 - cánceres de células escamosas de cabeza y cuello,
 - neuroblastomas, y
 - carcinomas de células escamosas esofágicos,
- 55 y en la que
- 60 dichos vasos tumorales y peritumorales se refieren a cánceres que son seleccionados de entre el grupo que comprende:

- cánceres ováricos,
- cánceres endometriales, y
- cánceres pancreáticos.

- 5 16. Utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir las enfermedades relacionadas con células tumorales y/o vasos tumorales y peritumorales.
- 10 17. Utilización según la reivindicación 16, en la que dichas enfermedades relacionadas con células tumorales se seleccionan de entre el grupo que comprende:
- cáncer de próstata, incluyendo las metástasis,
 - cáncer de mama, incluyendo las metástasis,
 - 15 - tumores estromales gastrointestinales,
 - carcinoma pulmonar de células pequeñas,
 - carcinomas de células renales,
 - tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos,
 - cánceres de células escamosas de cabeza y cuello,
 - 20 - neuroblastomas, y
 - carcinomas de células escamosas esofágicos,
- 25 y en la que dichas enfermedades relacionadas con vasos tumorales y peritumorales se seleccionan de entre el grupo que comprende:
- cáncer de próstata, incluyendo las metástasis, y
 - cáncer de mama, incluyendo las metástasis.
- 30 18. Utilización del conjugado de antagonista de péptido análogo de la bombesina según la reivindicación 9 y un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante aceptables para el radiomarcaje de un quelante de metal en un kit para la preparación de un agente radioterapéutico o de un agente radiofarmacéutico de formación de imágenes que comprende un vial que contiene una cantidad predeterminada de dicho conjugado.

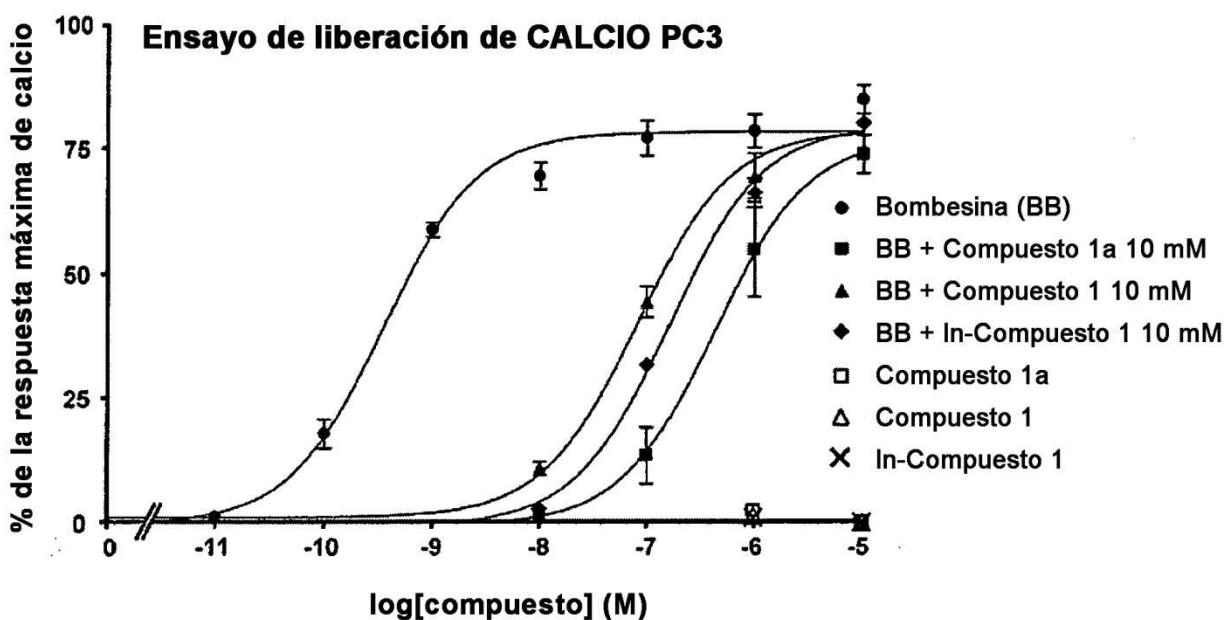


Fig.1

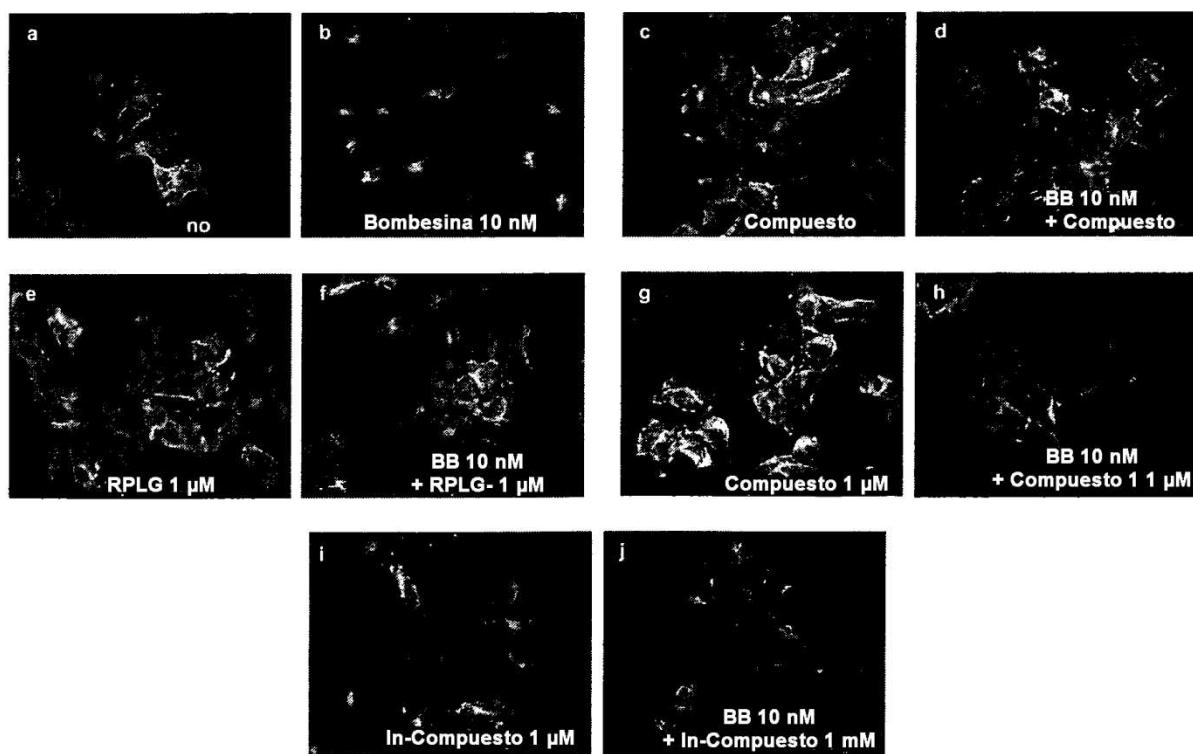


Fig. 2

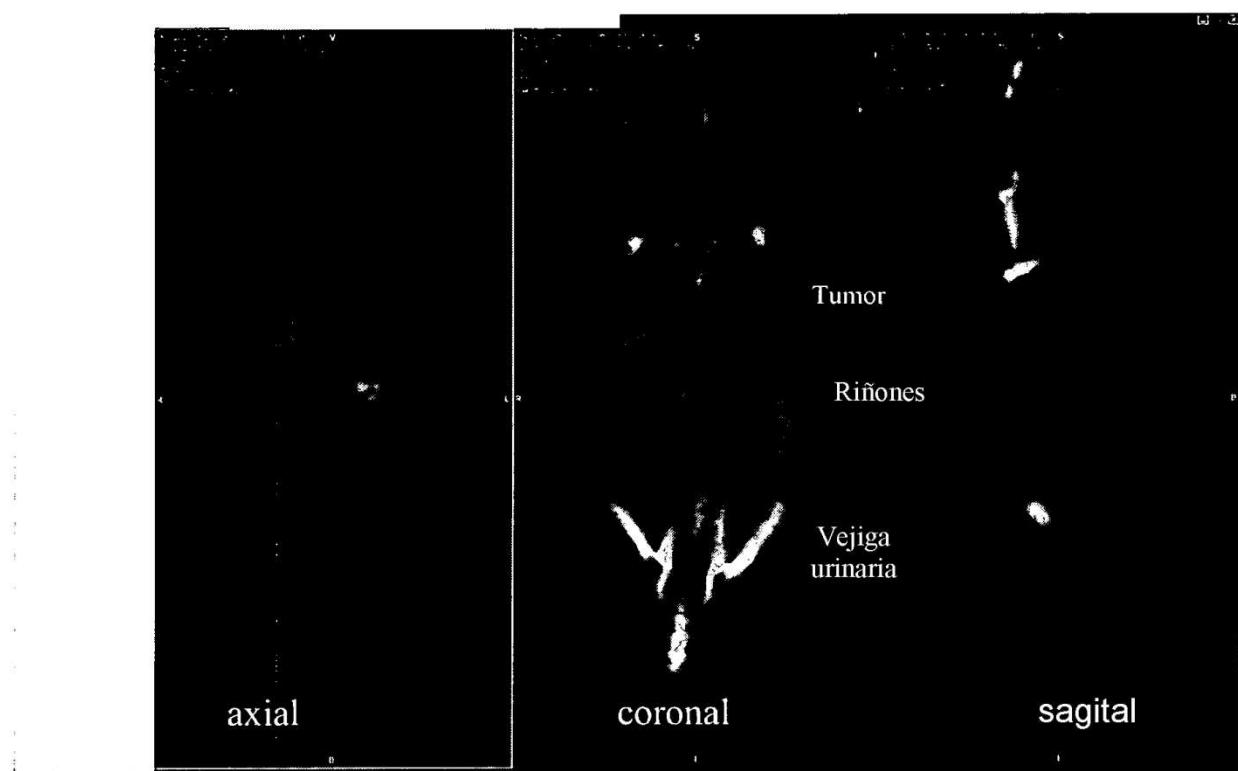


Fig. 3a

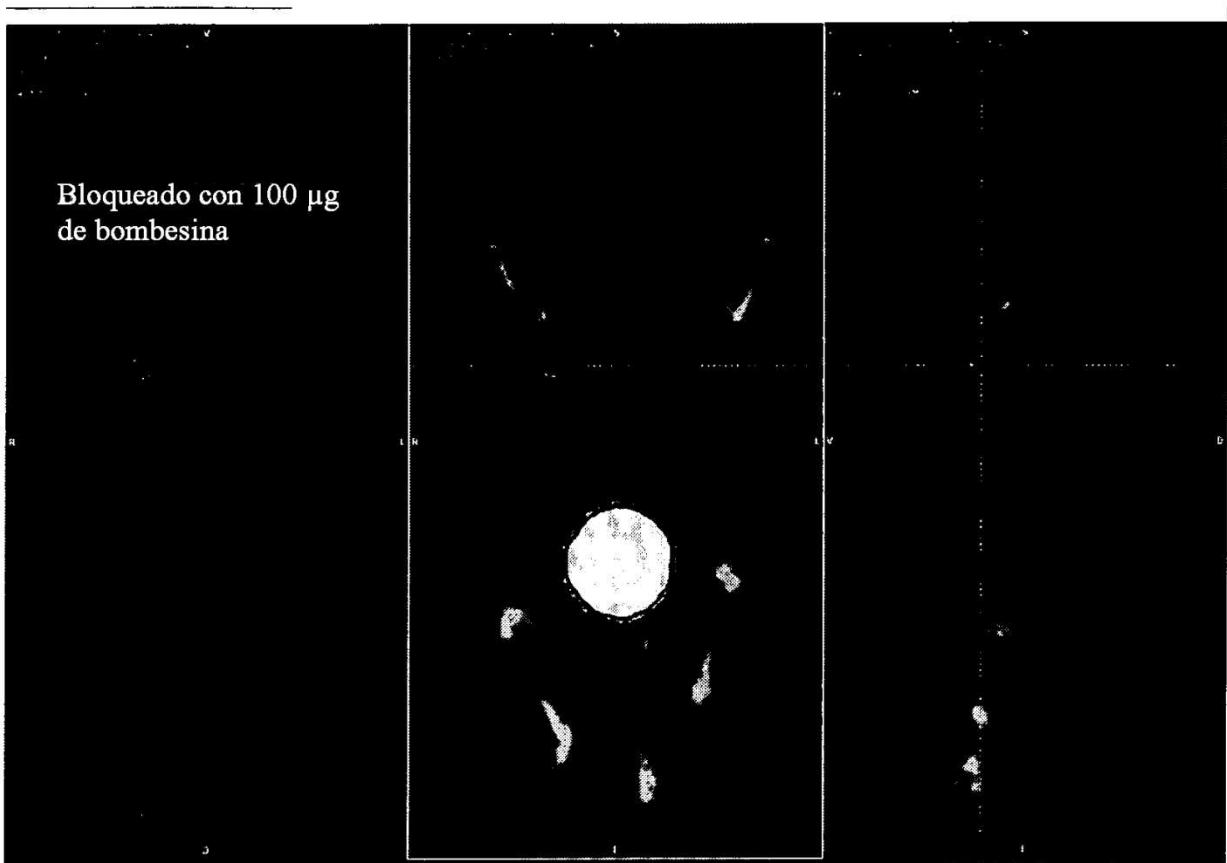


Fig. 3b

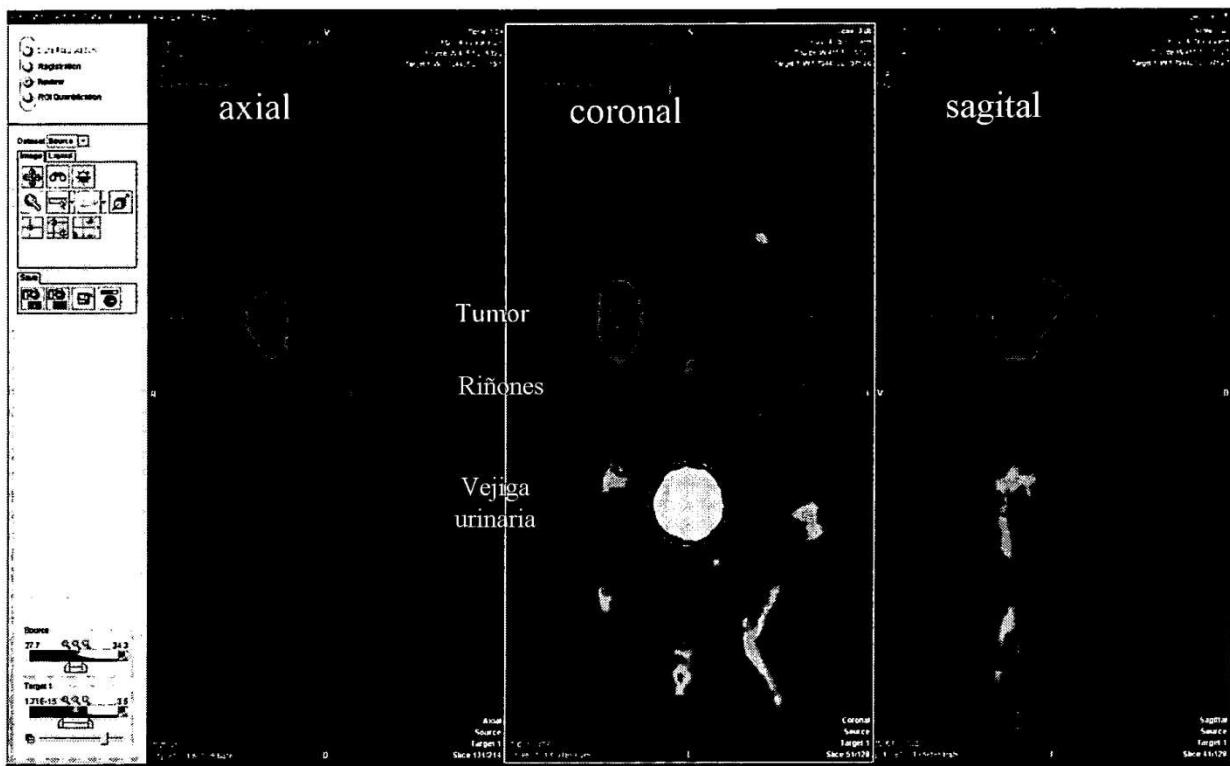


Fig. 4a

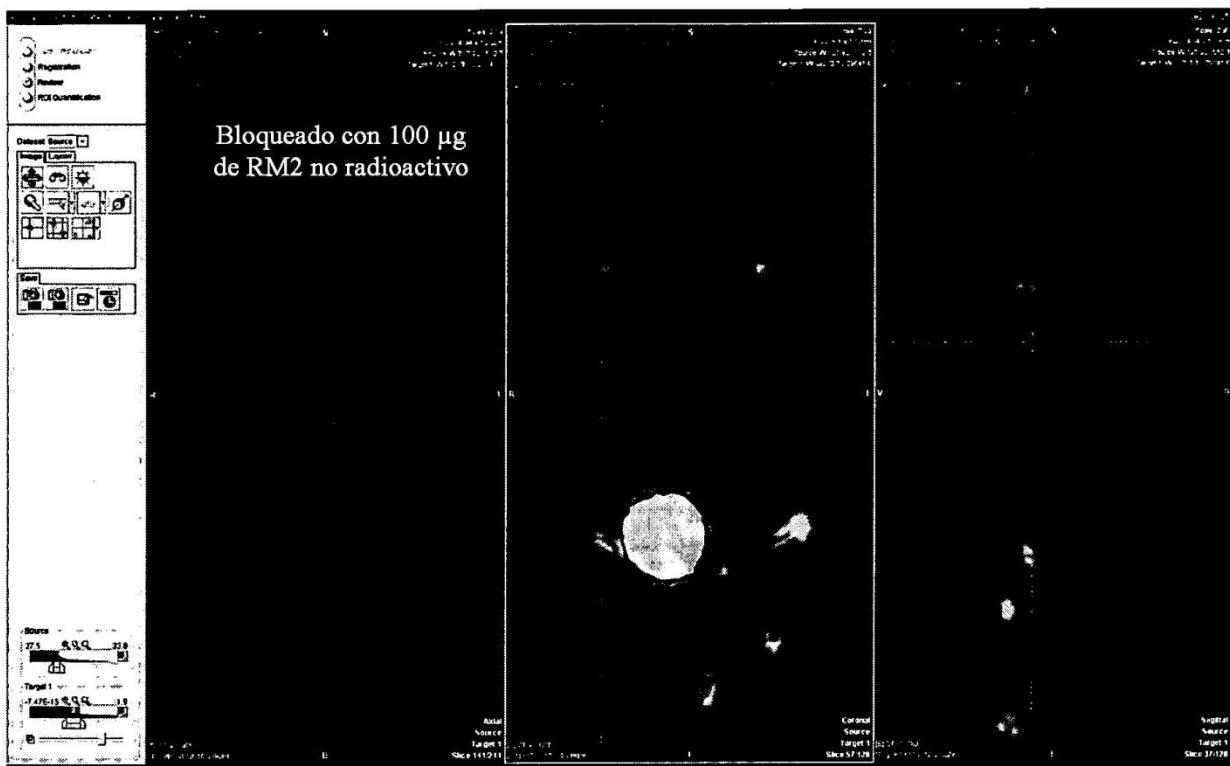
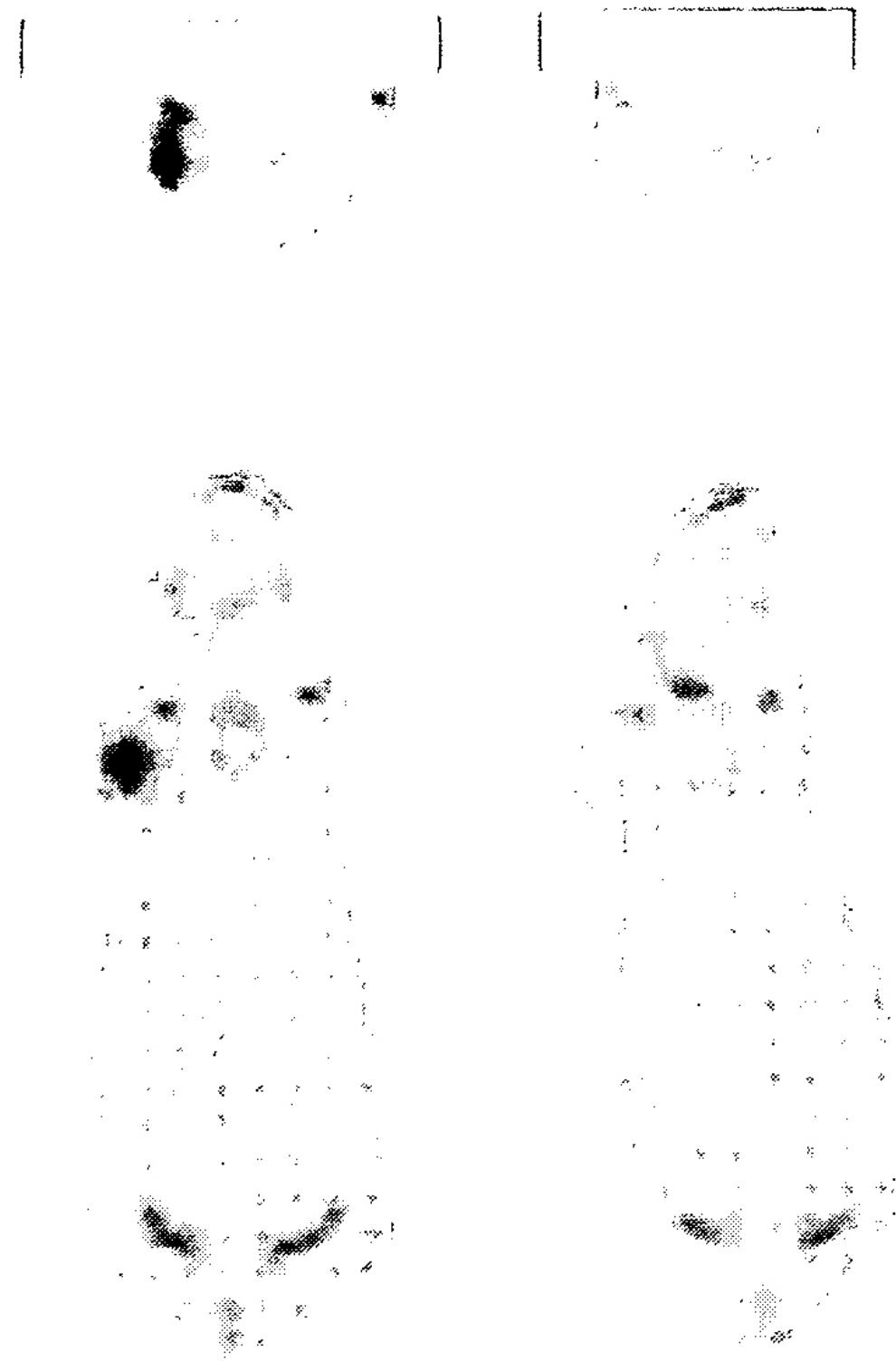


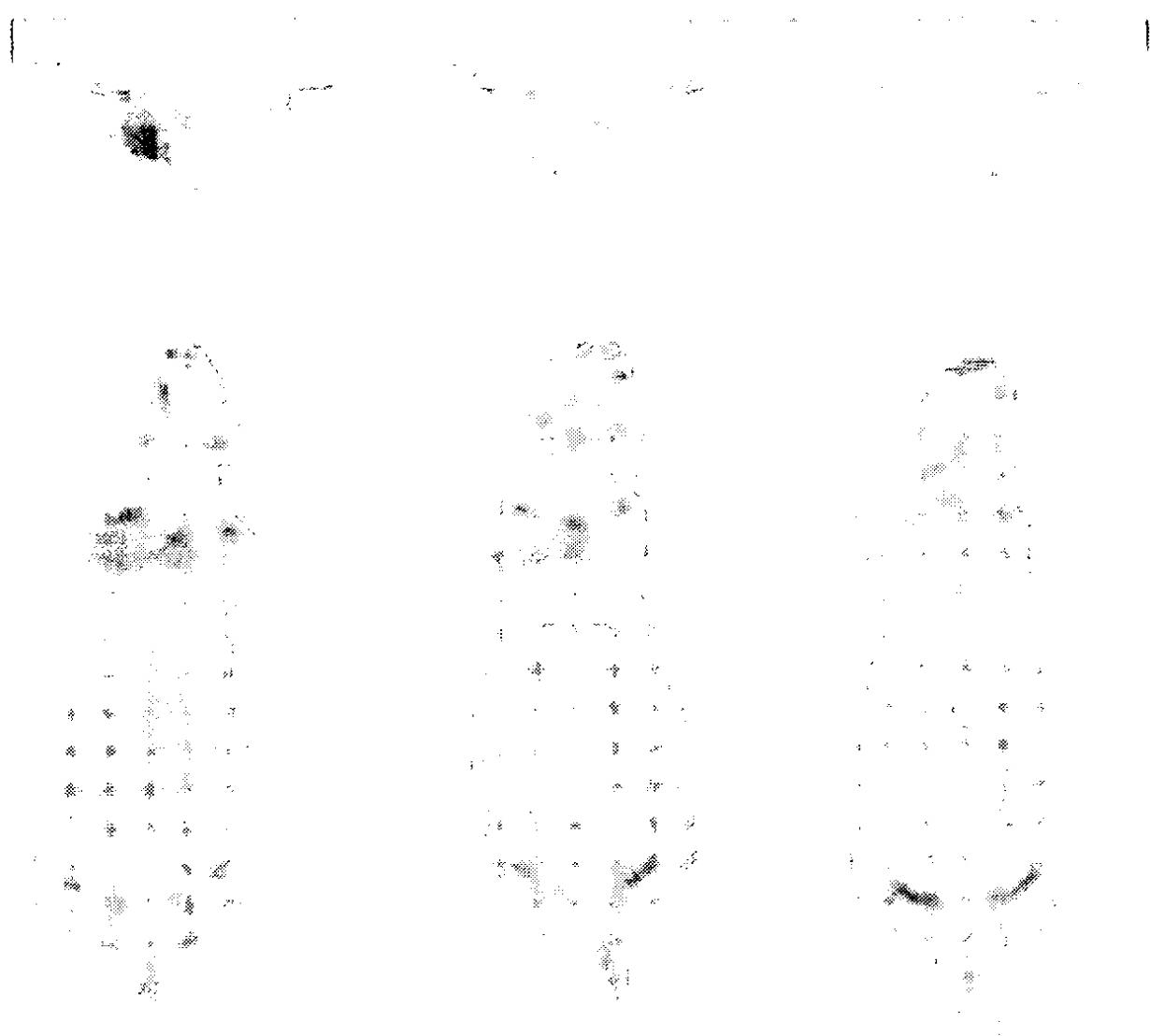
Fig. 4b



12 h pi

Bloqueado

Fig. 6



12 h pi 18 h pi Bloqueado
Fig. 8

ES 2 615 805 T3

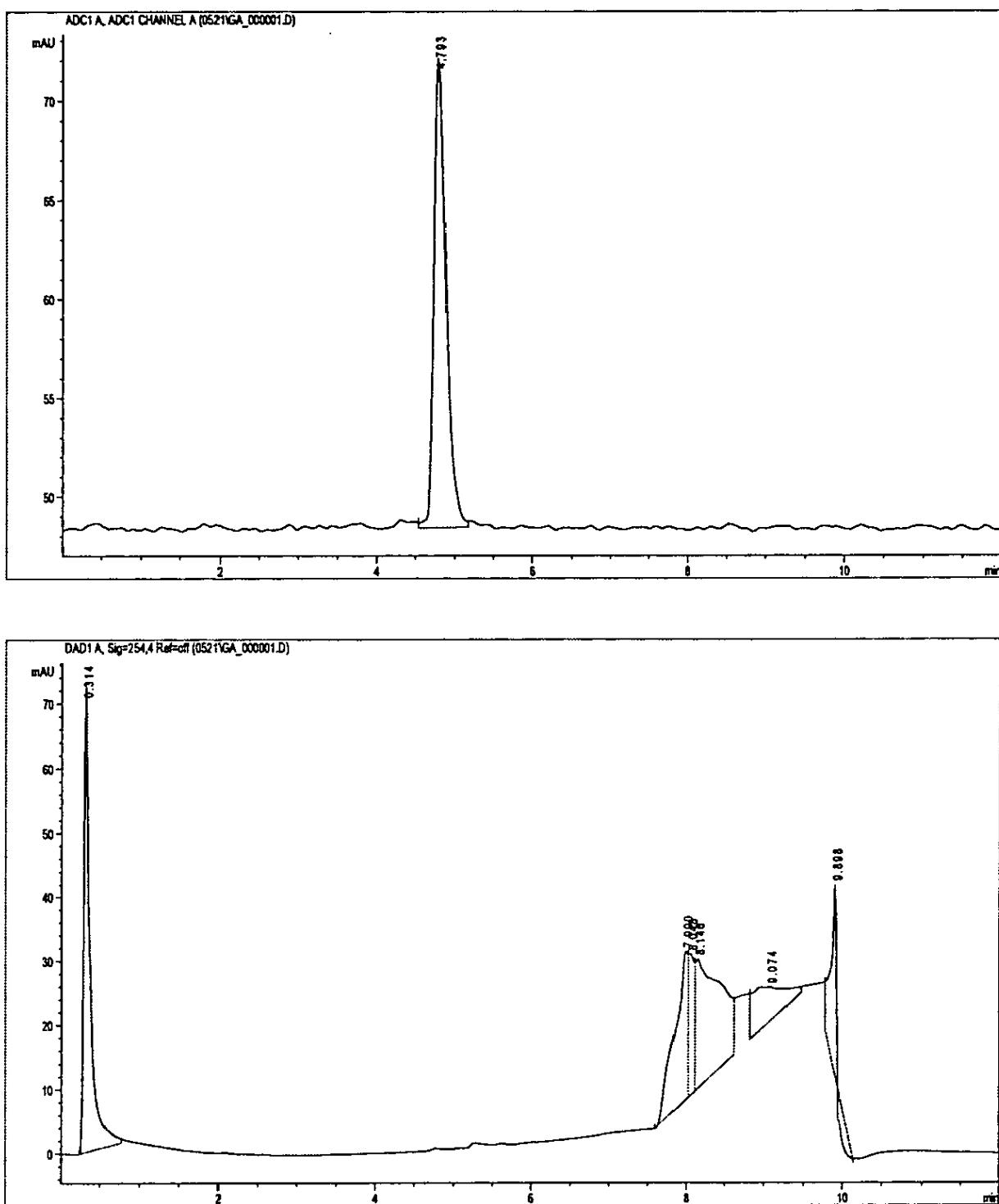


Fig. 9

ES 2 615 805 T3

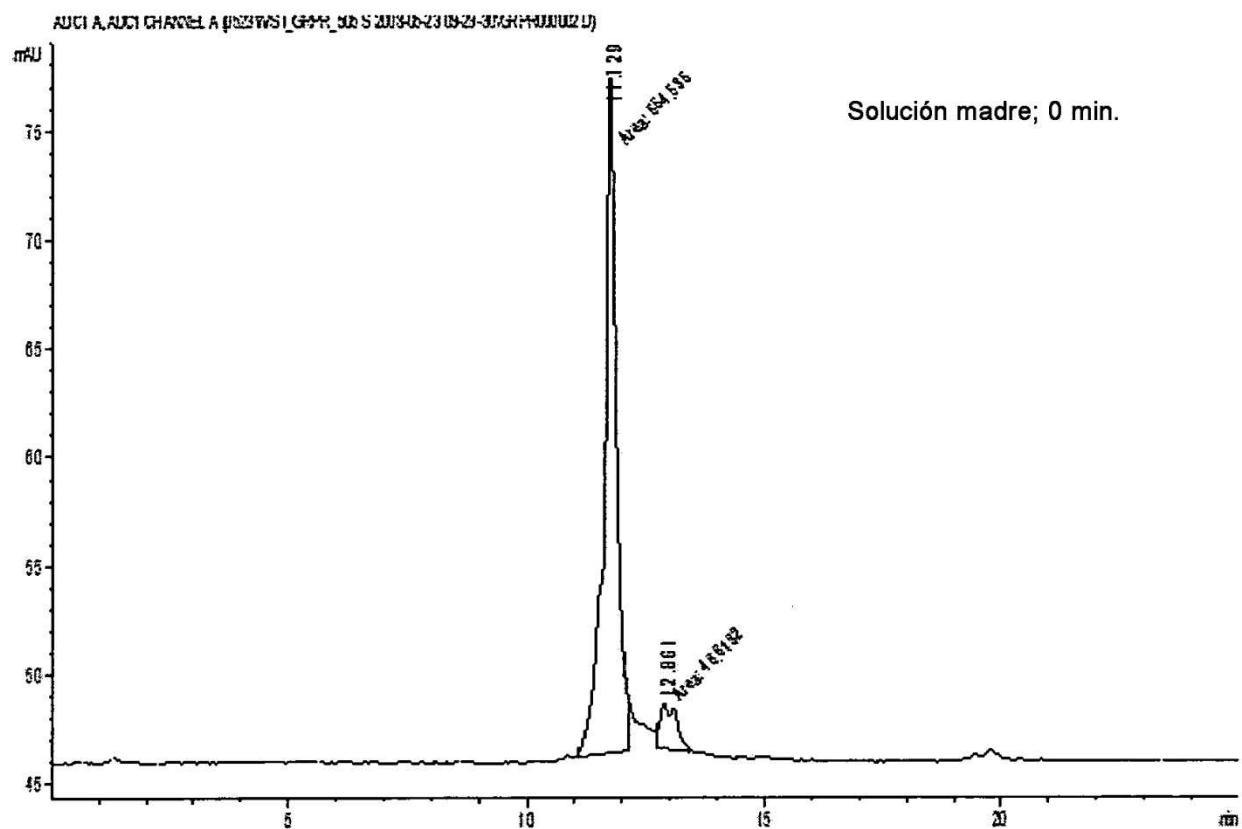
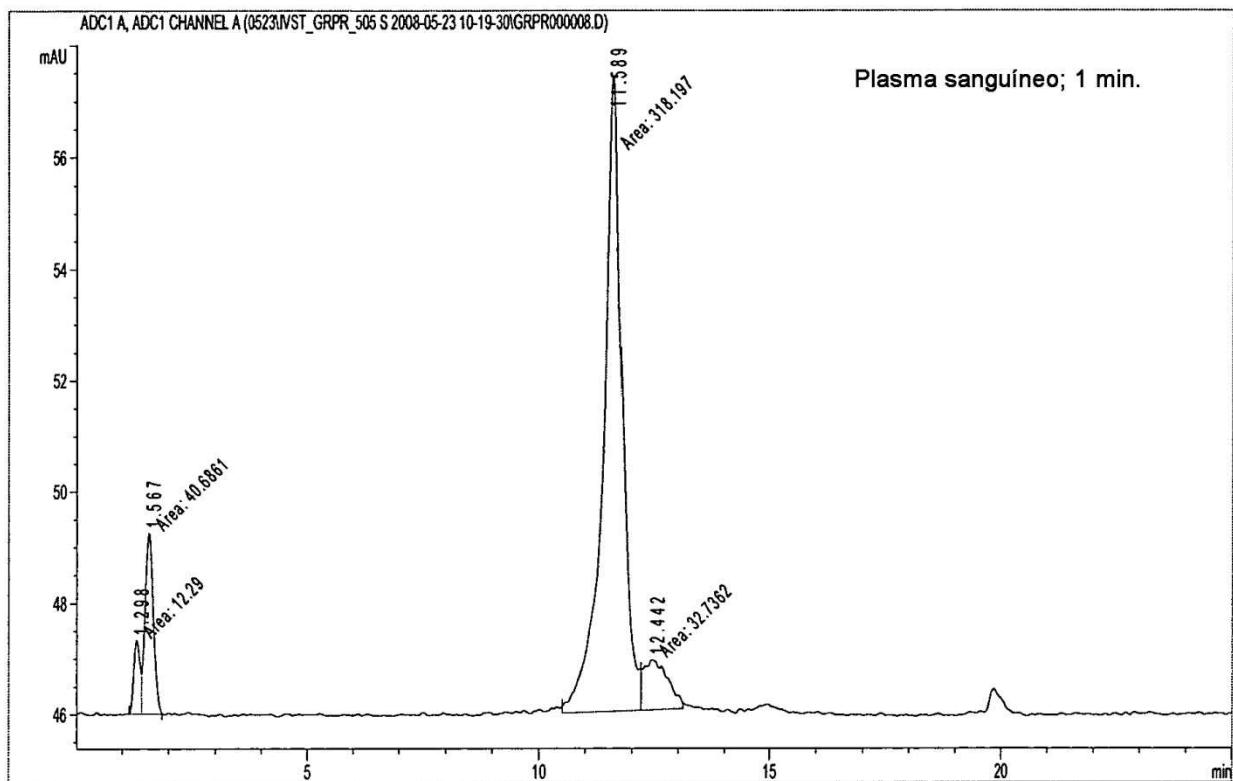


Fig. 10a



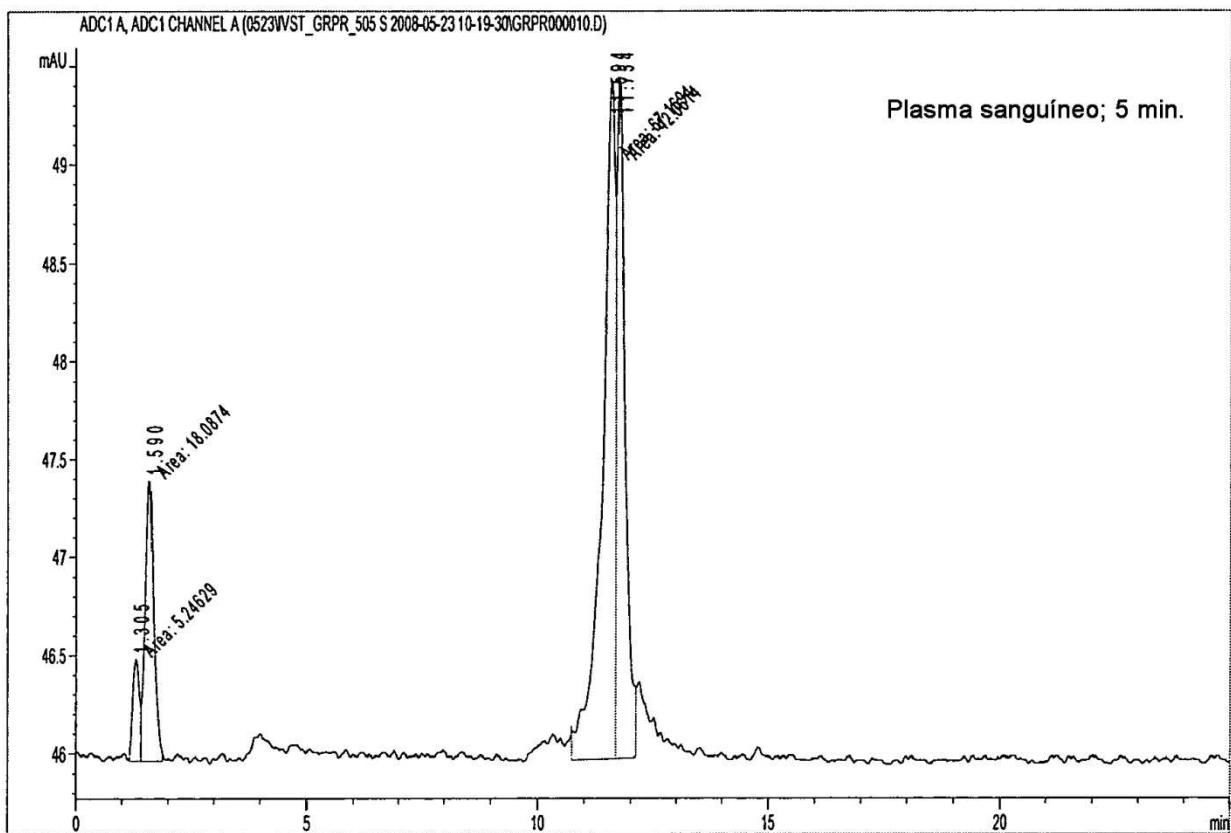


Fig. 10c

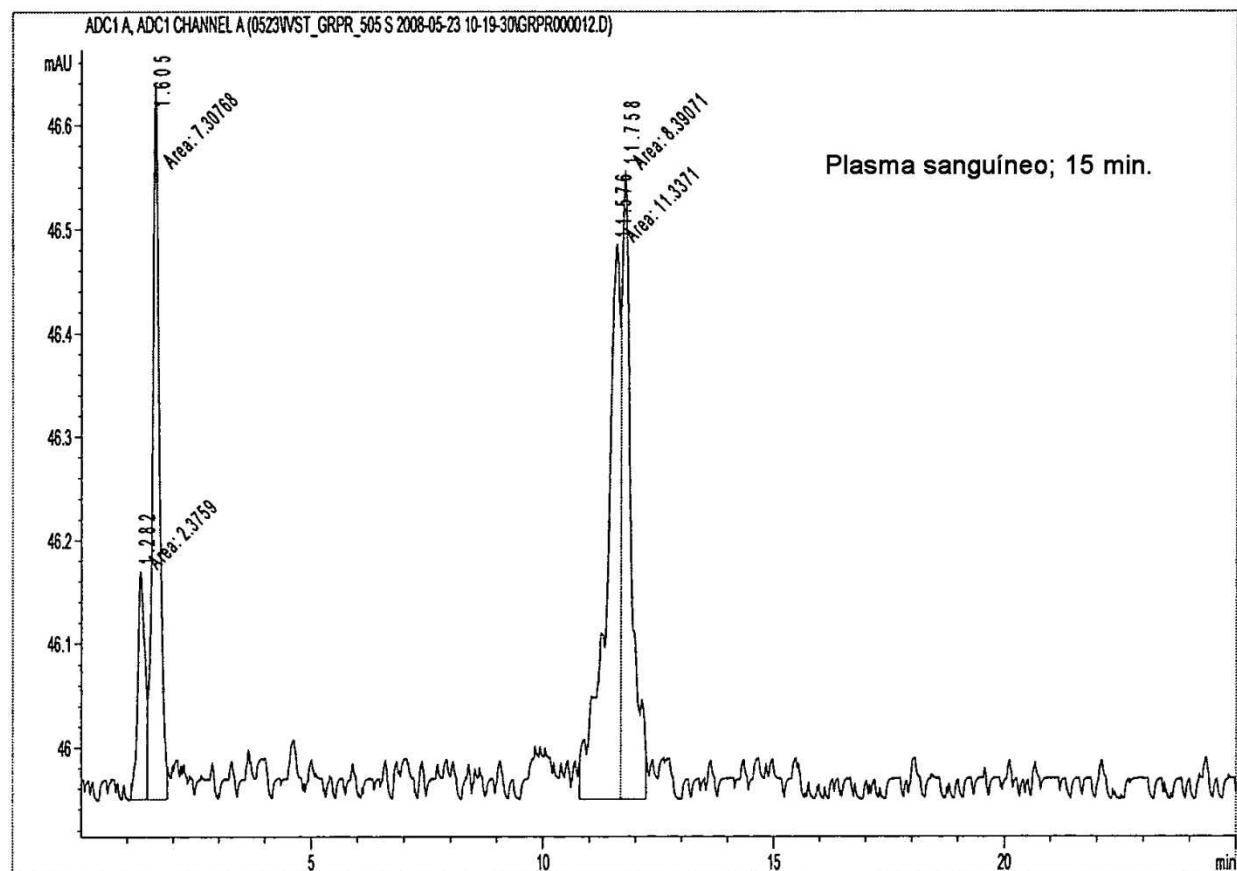


Fig. 10d

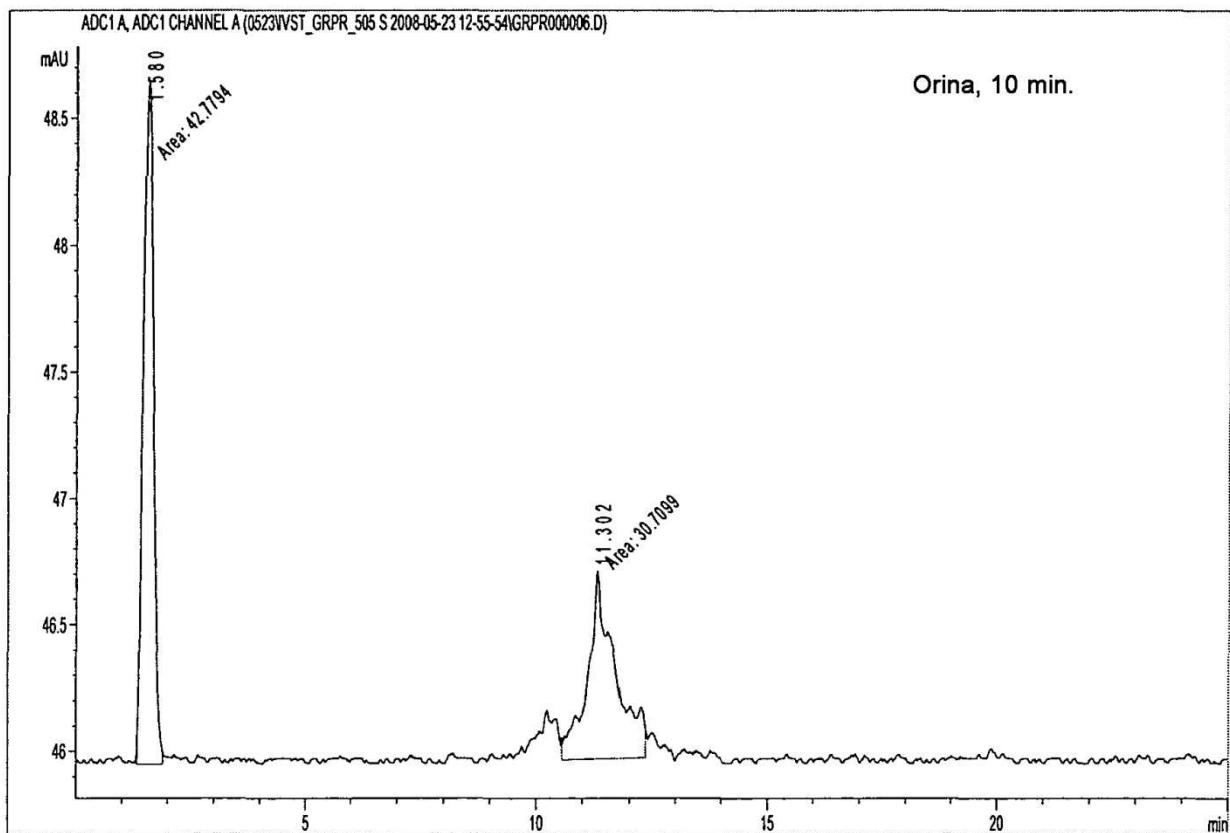


Fig. 10e

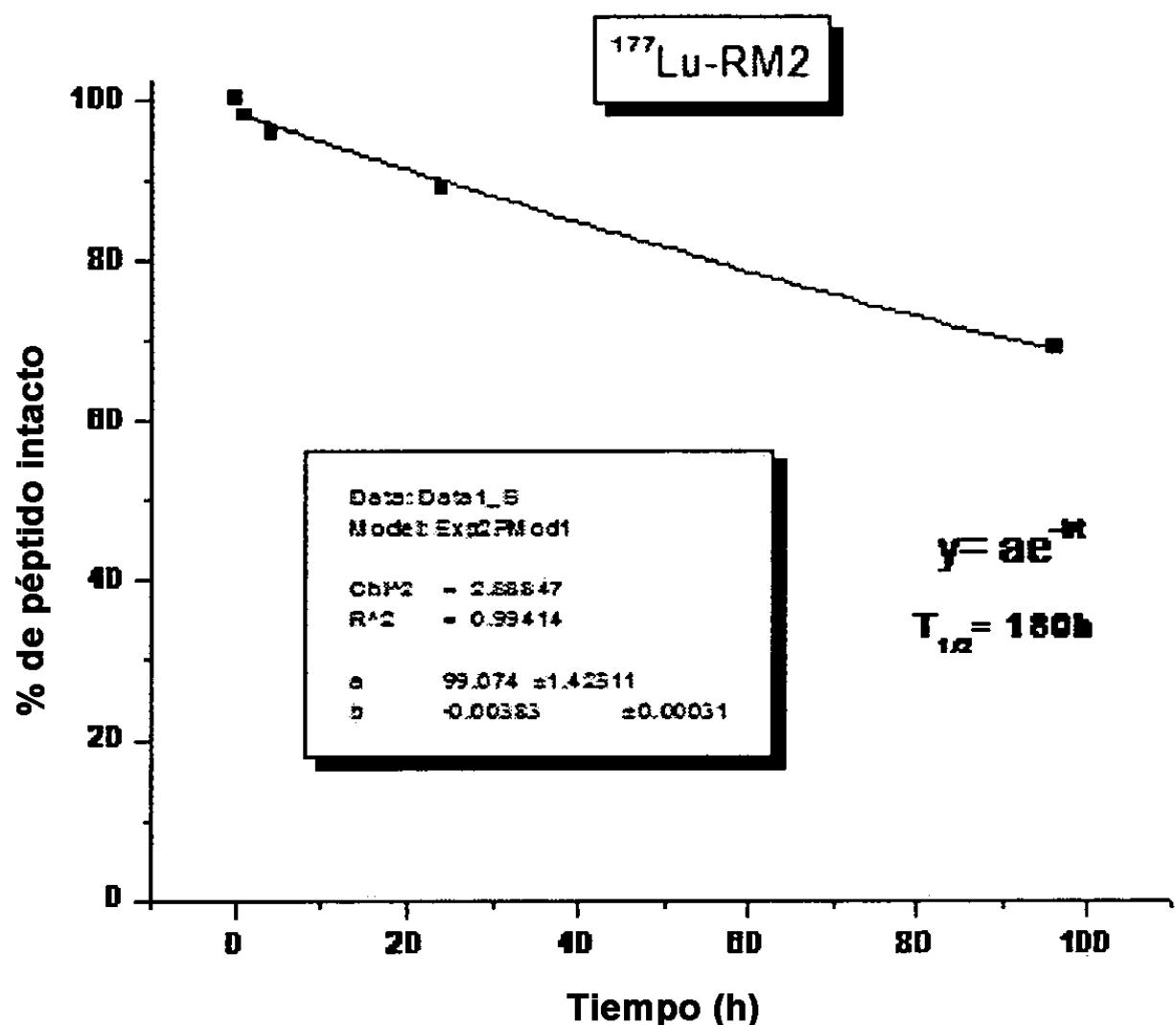


Fig. 11

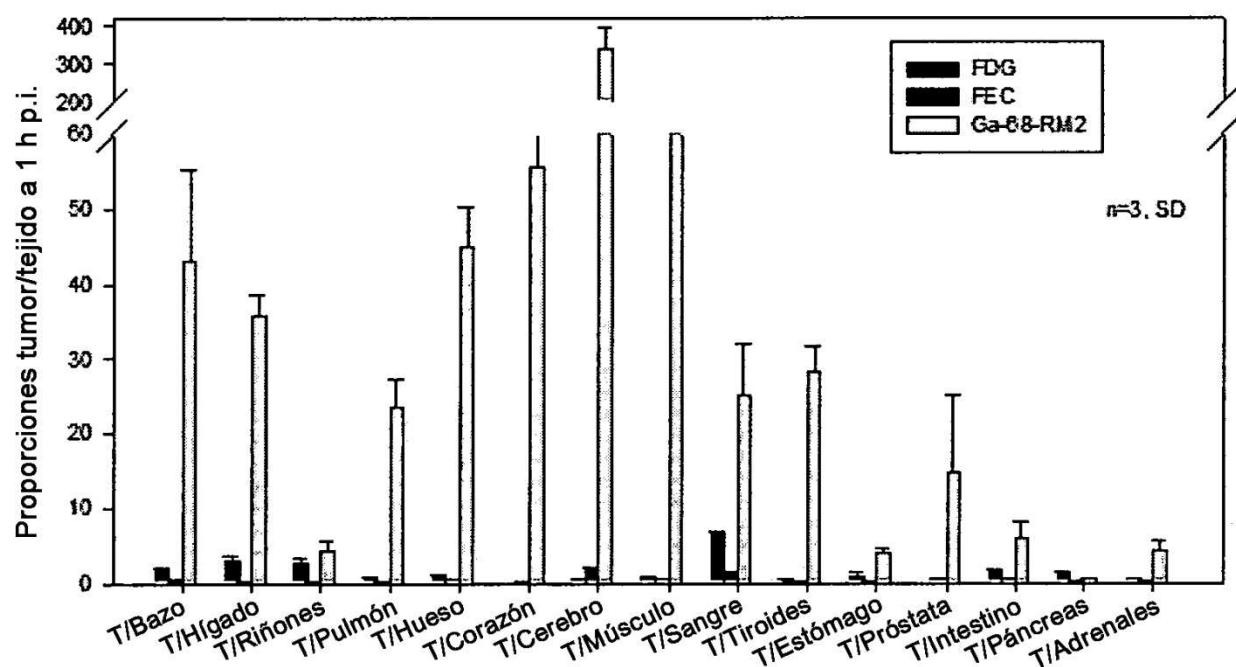


Fig 12