

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 388**

51 Int. Cl.:

A61K 51/04 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2015** **E 15156714 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 3061464**

54 Título: **Disoluciones radiofarmacéuticas con propiedades ventajosas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2018

73 Titular/es:
SCIENCONS AS (100.0%)
Gullhaugveien 7
0484 Oslo, NO

72 Inventor/es:
LARSEN, ROY HARTVIG

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 657 388 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

Disoluciones radiofarmacéuticas con propiedades ventajosas

5 **Campo técnico de la invención**

La presente divulgación se refiere a una disolución radiofarmacéutica que comprende ^{224}Ra y un complejo que puede depurar ^{212}Pb y/o ^{212}Bi . Esta disolución puede usarse con fines médicos, incluyendo el tratamiento de cáncer. Aspectos adicionales de la divulgación se refieren a kits y métodos para proporcionar disoluciones específicas.

10

Antecedentes de la invención

La terapia dirigida con radionucleidos de partículas alfa es prometedora como modalidad terapéutica contra enfermedades malignas y no malignas. Los radionucleidos emisores alfa son altamente citotóxicos y las partículas alfa producidas son de alta energía lineal, lo que produce una alta cantidad de ionización a lo largo de un intervalo corto, provocando la destrucción del ADN por un alto grado de roturas irreparables de dobles cadenas.

15

Por tanto, es importante, cuando se usan radionucleidos emisores alfa, que alcancen la diana y no se liberen del compuesto de direccionamiento y que no produzcan nucleidos hijos de vida más larga que se alejen por difusión del nucleido madre, ya que esto puede causar toxicidad en tejidos remotos.

20

Hay relativamente pocos emisores alfa considerados para aplicaciones médicas. Es un desafío en el campo encontrar un radionucleido con semivida adecuada, propiedades de desintegración, propiedades químicas y productos de desintegración que sean adecuados para el desarrollo de tratamientos médicos.

25

El radio fue muy importante para el desarrollo de las ciencias de la radioquímica y también lo usaron los pioneros de la radiooncología para tratar cáncer con braquirradioterapia (es decir, semillas o agujas que emiten radiación ubicadas dentro o cerca de tumores. Inicialmente se usó ^{226}Ra con una semivida ($t_{1/2}$) de 1600 años. Más tarde se usó ^{224}Ra ($t_{1/2} = 3,66$ días), como productos inyectables de cloruro de radio disuelto, durante varias décadas en Alemania para el tratamiento paliativo de la espondilitis anquilosante (AS) debido a la propiedad osteófila natural del mismo, el más pesado de los elementos alcalinotérreos.

30

Aunque se reintrodujo después del desarrollo de métodos de purificación mejorados durante un breve periodo del año 2000, su uso se abandonó finalmente de manera parcial debido al temor de efectos tardíos y la aparición de nuevas opciones de tratamiento para AS. Por tanto, hoy en día no se usa ^{224}Ra como producto radiofarmacéutico y no se considera entre los posibles candidatos para la terapia con radiación alfa por los expertos principales en el campo.

35

Sin embargo, hay investigaciones en curso sobre el uso de hilos cargados con ^{224}Ra para terapia de difusión de radón/braquirradioterapia intratumoral local pero que no usan disoluciones acuosas de ^{224}Ra para terapia. J. Nanopart Res (2013) 15:2082 da a conocer un método para proporcionar una disolución que contiene ^{224}Ra en la que se incuban nanozeolitas marcadas con ^{224}Ra con suero sanguíneo humano. Recientemente, a otro isótopo de radio, ^{223}Ra , en forma de un producto inyectable de sal disuelta, se le ha concedido autorización de comercialización como tratamiento contra las metástasis óseas de cáncer de próstata resistente a castración.

45

Cuando se compara ^{223}Ra ($t_{1/2} = 11,4$ días) con ^{224}Ra ($t_{1/2} = 3,6$ días) ambos tienen, en principio, semividas relevantes para usos radiofarmacéuticos que permiten una producción centralizada y envío al usuario final y ambos tienen tres progenies emisoras alfa en sus cadenas de desintegración y las series producen una cantidad similar de partículas alfa (figuras 1 y 2) con una energía alfa total de aproximadamente 26-28 MeV para las respectivas cadenas.

50

Cuando se comparan las cadenas de desintegración, las progenies de ^{223}Ra de los elementos Rn, Pb y Bi tienen semividas significativamente más cortas que reducen el problema de captación de nucleidos hijos en células y tejidos no diana. Estas diferencias son particularmente importantes para las progenies de plomo ya que pueden acumularse en células y tejidos hematopoyéticos y en los riñones, respectivamente. En la serie de ^{223}Ra , ^{211}Pb ($t_{1/2} = 36,1$ min) provocaría una exposición de tejido normal mucho menor en comparación con ^{212}Pb ($t_{1/2} = 10,6$ horas) de la serie de ^{224}Ra . A menos que se purifique ^{224}Ra a partir de ^{212}Pb , poco antes de la inyección, ^{223}Ra tendría una exposición de tejido normal significativamente menor a partir de las progenies. Tal purificación no es práctica puesto que requeriría que se realizaran procedimientos laboriosos en el hospital en el que está usándose el producto o en el que se restringen geográficamente la producción y el uso. Es por eso por lo que el intervalo de tiempo para el uso de ^{224}Ra , que había sido previamente proporcionado por Altmann Therapie, Salzgitter, Alemania, para AS, era de solamente 6 horas. Podría usarse 3 horas antes o tres horas después del momento de calibración. Probablemente en gran medida debido a esta vida útil corta del producto (además de un aumento de la competencia con los nuevos fármacos para AS) y, por consiguiente, las restricciones de logística y suministro, se ha abandonado el producto.

55

60

65

Actualmente, no se usa disolución de ^{224}Ra para inyección a pacientes. En su lugar, están desarrollándose

generadores de ^{224}Ra basados en intercambiadores de iones para la extracción de ^{212}Pb para el uso de ^{212}Pb en radioinmunoterapia. El plomo-212 es por sí mismo un emisor beta pero se desintegra al emisor alfa ^{212}Bi y, por tanto, se considera adecuado como generador *in vivo* para terapia con partículas alfa.

- 5 Por tanto, actualmente se considera ^{224}Ra meramente como un nucleido generador para el ^{212}Pb útil desde el punto de vista médico. Debido a la semivida relativamente corta de ^{212}Pb , se espera que sea el más adecuado para el tratamiento contra enfermedades compartimentales en las que se inyecta directamente el radioinmunoconjugado en la región, por ejemplo, cavidad intraperitoneal (i.p.) en la que una alta concentración de producto puede seleccionar como diana ascitis maligna y micrometástasis dentro de la cavidad. La semivida de 10,6 horas de ^{212}Pb puede ser
10 beneficiosa puesto que sólo se filtra una baja cantidad de la cavidad i.p. antes de que la radioactividad se haya desintegrado.

15 Cuando se considera el radio para terapia contra enfermedades óseas, debe conservarse en un estado catiónico ya que esto garantizará que el radio, como el denominado "afín a volumen" que es, se incorporará en los minerales óseos provocando retención de los nucleidos hijos. Esto es particularmente importante con ^{224}Ra ya que algunos de los nucleidos hijos, en particular ^{212}Pb , tienen semividas sustanciales que permiten redistribución transorgánica si se deja libre en líquidos fisiológicos como sangre, saliva o líquido linfático. La tabla 1 (figura 4) enumera la radiación principal de la cadena de desintegración de ^{224}Ra .

20 Las autoridades sanitarias alemanas desarrollaron una monografía sobre el uso de ^{224}Ra en espondilitis anquilosante hace aproximadamente 10 cuando Altmann Therapie (Salzgitter, Alemania) hizo un esfuerzo por reintroducir la disolución de ^{224}Ra como tratamiento contra la espondilitis anquilosante basándose en un método de producción patentado que produce un producto altamente purificado.

25 En la cadena de desintegración de ^{224}Ra , se produce el producto de desintegración ^{212}Pb ($t_{1/2} = 10,6$ horas). Tiene una biodistribución diferente en comparación con el nucleido madre ^{224}Ra cuando se inyecta conjuntamente en pacientes. Esto provoca menos actividad inicial en los tejidos diana y más actividad en los tejidos no diana como células sanguíneas, en particular células y tejidos hematopoyéticos, y médula ósea y riñones. El número de átomos de ^{212}Pb en comparación con ^{224}Ra en un producto en equilibrio radioactivo es menor del 14%. Pero, debido a que
30 ^{224}Ra se transfiere rápidamente desde la sangre hasta el esqueleto o se excreta, y ^{212}Pb se retiene sustancialmente en células y tejidos hematopoyéticos, el impacto toxicológico de ^{212}Bi es importante. La única manera de solucionar este problema mediante el conocimiento actual en el campo sería usar ^{224}Ra poco tiempo después de la purificación tal como se sugiere, es decir, antes de haya tenido lugar un crecimiento significativo de ^{212}Pb .

35 Se ha descrito el uso de depuradores para productos de desintegración en investigación radiofarmacéutica experimental: Jones *et al* (1996) estudiaron la administración oral durante varios días de los agentes quelantes de ditioil no seleccionados como diana ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS) y ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) para mejorar el aclaramiento de ^{206}Bi de los riñones en ratones y encontraron un aclaramiento del riñón mejorado con DMPS. Su objetivo era usar quelatos orales como posibles adyuvantes para
40 reducir o evitar la radiotoxicidad en radioinmunoterapia alfa con ^{212}Bi o ^{212}Pb anti-receptor de interleucina-2 (IL-2R). Jaggi *et al.*, (2005) usaron terapia de quelación oral para reducir la acumulación renal de ^{213}Bi producido a partir de ^{225}Ac . Su objetivo era aumentar la excreción del producto de desintegración no deseado. No añadieron el agente quelante al producto radiofarmacéutico sino que simplemente describen su uso como medicamento oral en el agua potable antes y después de la inyección del producto radiofarmacéutico.

45 En cuanto a la terapia ósea, ^{223}Ra se considera más apropiado que ^{224}Ra porque ^{223}Ra tiene nucleidos hijos con semividas mucho más cortas y, por tanto, menos problema de relocalización. Se ha aprobado recientemente el radio-223 para la terapia de pacientes con metástasis óseas resistentes a hormonas de cáncer de próstata.

50 Previamente se ha sometido a prueba sal de ^{224}Ra disuelta en la terapia contra el cáncer, pero se ha abandonado debido a propiedades desfavorables e ineficacia. Se declaró que, debido a la corta semivida de ^{224}Ra y sus nucleidos hijos inyectados, se irradia(n) el/los tejido(s) blando(s). En otras palabras, en el caso de ^{224}Ra , la semivida de los nucleidos hijos, en particular ^{212}Pb , es relativamente larga en comparación con los nucleidos madre y se produce más exposición de tejidos blandos. Por tanto, en el campo se conoce que ^{224}Ra tiene nucleidos hijos
55 desfavorables que limitan su uso en disoluciones radiofarmacéuticas. Además, en una revisión reciente por expertos sénior en el campo, no se enumeró ^{224}Ra entre los radionucleidos considerados para terapia radiofarmacéutica con emisores de partículas alfa.

60 Recientemente, el concepto de células tumorales circulantes (CTC) ha recibido una atención considerable ya que las CTC pueden desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de metástasis tumorales. Se sabe que los cánceres que producen metástasis óseas como por ejemplo, cánceres de próstata, mama, pulmón y mieloma múltiple pueden tener unas cuantas células cancerosas circulantes viables en la sangre que pueden haberse desprendido de los tumores primarios o metastásicos. Esto significa que incluso si las metástasis óseas se tratan, pueden formarse nuevas lesiones por el asentamiento de CTC en los huesos u otros tejidos.

65 El radio-223 usado contra metástasis óseas hoy en día es un osteófilo puro y no aborda el problema de las CTC. Por

tanto, existe la necesidad en el campo de productos terapéuticos óseos farmacéuticos alfa de un producto que también pueda abordar las CTC.

La generación de nucleidos hijos tanto en los productos inyectables como *in vivo* es un problema potencial para ^{224}Ra y en menor medida para ^{223}Ra , ya que la primer progenie en las dos series de desintegración para ambos es radón que es altamente difusivo. Sin embargo, los datos de la bibliografía indican que esto es menos problemático cuando se genera *in vivo* puesto que el radio es un osteófilo de volumen y se incrusta en la matriz ósea. También ayuda que la captación en el esqueleto de radio intravenoso se produce casi de manera instantánea, y la eliminación intestinal y, en menor grado, urinaria, se produce rápidamente, lo que conduce a una eliminación de la sangre en el plazo de minutos tras la inyección. Debe mencionarse que la eliminación urinaria está probablemente más pronunciada en roedores en comparación con seres humanos en donde la eliminación fecal es la principal vía. Tal como notifican Nilsson *et al* (2005), se produce una reducción del 88% del radio en la sangre a los 10 minutos tras la inyección. Cuando se considera el radio localizado en el esqueleto, para ^{223}Ra se notificó equilibrio de ^{211}Bi y ^{223}Ra en hueso tras unas pocas horas. Para ^{224}Ra , basándose en datos con animales y extrapolación a seres humanos adultos, se encontró mediante dos modelos diferentes una fracción de ^{212}Pb con respecto a ^{224}Ra de 0,88 y 1,0, es decir, retención casi completa de los nucleidos hijos. Estos datos indican una alta retención de los nucleidos hijos en hueso para tanto ^{223}Ra como ^{224}Ra . Para ^{224}Ra , una contribución significativa a la captación en tejidos blandos de la progenie, procedería, por tanto, probablemente de nucleidos hijos inyectados conjuntamente. Por tanto, resulta imperativo desarrollar métodos para controlar los nucleidos hijos, al menos ^{212}Pb , en productos inyectables de ^{224}Ra .

Esto se ha logrado mediante las nuevas disoluciones de ^{224}Ra descritas en el presente documento.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una disolución radiofarmacéutica que comprende ^{224}Ra y un agente complejante que puede depurar al menos ^{212}Pb , para su uso como medicamento; el agente complejante comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en agentes quelantes acíclicos, agentes quelantes cíclicos, criptandos, éteres corona, porfirinas o polifosfonatos cíclicos o no cíclicos, DOTMP, EDTMP, bisfosfonato, pamidronato conjugado con DOTA o TCMC. En otra realización de la presente invención, ^{212}Pb y/o ^{212}Bi está complejado mediante EDTMP osteófilo. En otra realización de la presente invención, el agente complejante está conjugado con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína sintética, péptido, vitamina. En otra realización de la presente invención, el agente complejante es el agente quelante TCMC conjugado con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína sintética, péptido, vitamina.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un kit que comprende un primer vial que comprende una disolución radiofarmacéutica de la presente invención, y un segundo vial que comprende una disolución de neutralización para ajustar el pH y/o la isotonicidad de la disolución radiofarmacéutica antes de la administración a un paciente.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un kit que comprende un primer vial que comprende una proteína o péptido marcado con quelato, un segundo vial que comprende una disolución de ^{224}Ra .

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a una disolución radiofarmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento de enfermedades óseas. En una realización de la presente invención, la enfermedad ósea se selecciona del grupo que consiste en metástasis óseas de cánceres de mama, próstata, riñones, pulmones, huesos, o mieloma múltiple, o enfermedades no cancerosas que provocan calcificación no deseada incluyendo espondilitis anquilosante.

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de enfermedad maligna o no maligna mediante la administración de una disolución radiofarmacéutica de la presente invención a un individuo que lo necesita.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para proporcionar una disolución de ^{224}Ra que comprende un complejo proteico o complejo peptídico que comprende mezclar la proteína marcada con quelato, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, o péptido con una disolución que comprende ^{224}Ra .

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la desintegración de ^{224}Ra y nucleidos hijos.

La figura 2 muestra la desintegración de ^{223}Ra y nucleidos hijos.

La figura 3A muestra la biodistribución en ratones desnudos de ^{224}Ra y ^{212}Pb de progenie en una disolución sin agente quelante. La figura 3B muestra la biodistribución en ratones desnudos de disolución de ^{224}Ra que contiene

EDTMP como agente quelante para la ^{212}Pb de progenie. La figura 3C muestra la biodistribución en ratones desnudos de disolución de ^{224}Ra que contiene TCMC-trastuzumab (Herceptin) como agente quelante para ^{212}Pb de progenie.

5 La figura 4 muestra la tabla 1. Principales propiedades de radiación de la serie de ^{224}Ra . ¹Promedio por transformación de ^{224}Ra debido a ramificación. Sólo se consideran los rayos X o gamma por encima del 1% de abundancia efectiva. Aporta una energía efectiva total de aproximadamente 26,5 MeV de alfa de 0,7 MeV de beta por desintegración completa de ^{224}Ra y nucleidos hijos.

10 La figura 5 muestra la tabla 2. Crecimiento de ^{212}Pb a partir de una fuente de ^{224}Ra puro de 10 MBq. Cambios en el nivel de actividad. Actividad de inicio de ^{224}Ra puro de 10 MBq.

La figura 6A muestra la tabla 3 A. Perfiles cromatográficos de capa fina (CCF) de ^{212}Pb en una disolución de ^{224}Ra en equilibrio con nucleidos de progenie sin y con agentes complejantes. Parte 1: Fosfonatos y tampón de formulación (FB).

La figura 6B muestra la tabla 3 B: Perfiles cromatográficos de capa fina (CCF) de ^{212}Pb en una disolución de ^{224}Ra en equilibrio con nucleidos de progenie sin y con agentes complejantes. Parte 2: La tabla 3 B muestra perfiles de CCF para ^{212}Pb en presencia de conjugados de anticuerpo-TCMC o DOTA y anticuerpo sin agente quelante.

20 La figura 7 muestra la tabla 4. Razones de captación* para ^{212}Pb para hueso frente a sangre y hueso frente a riñones.

A continuación se describirá la presente invención en más detalle.

25

Descripción detallada de la invención

Algunas abreviaturas usadas

30 DOTMP - ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra(metilenfosfónico)

EDTMP - ácido etilendiaminatetra(metilenfosfónico)

35 EDTA - ácido etilendiamina-tetraacético

p-SCN-Bn-DOTA - ácido 2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético

DOTA - ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético y también se usa para ácido bencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético conjugado con anticuerpo monoclonal

40

p-SCN-Bn-TCMC - 2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-tetra-(2-carbamonilmetil)-ciclododecano

TCMC - 1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-tetra-(2-carbamonilmetil)-ciclododecano y también se usa para bencil-1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-tetra-(2-carbamonilmetil)-ciclododecano conjugado con anticuerpo monoclonal

45

AcM - anticuerpo monoclonal

En lo siguiente, se usan las mismas abreviaturas para ácidos, sales o versiones parcial o completamente disociadas de los agentes quelantes.

50

Ha sido un hallazgo inesperado que es posible complejar fuertemente nucleidos hijos en presencia de radio con compuestos complejantes sometidos a prueba, EDTMP y anticuerpo monoclonal conjugado con los agentes quelantes TCMC y DOTA, y al mismo tiempo mantener el radio principalmente como catión no complejoado totalmente dirigible al hueso.

55

Una disolución radiofarmacéutica

Un objeto de la presente invención es proporcionar una disolución radiofarmacéutica que comprende ^{224}Ra y un complejo que puede depurar al menos ^{212}Pb .

60

En el presente contexto, se define "depuración" como al menos el 50% unido según perfiles de cromatografía en capa fina (CCF), separación por concentración en centrífuga o biodistribución.

65 Esto significa, como ejemplo, al menos el 50% menos de captación sanguínea de ^{212}Pb con un agente quelante molecular pequeño. Con un agente quelante conjugado con anticuerpo, en el que la captación sanguínea no es un indicador fiable, al menos el 50% unido según análisis de CCF.

En una realización de la presente invención está al menos el 60% unido.

En otra realización de la presente invención está al menos el 70% unido.

5

En otra realización de la presente invención está al menos el 80% unido.

En otra realización de la presente invención está al menos el 85% unido.

10

En otra realización de la presente invención está al menos el 90% unido.

El compuesto o compuestos también puede depurar más radionucleidos que ^{212}Pb . El complejo comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en agentes quelantes acíclicos, agentes quelantes cíclicos, criptandos, éteres corona, porfirinas o polifosfonatos cíclicos o no cíclicos, DOTMP, EDTMP, bisfosfonato, pamidronato conjugado con DOTA o TCMC. En una realización de la presente invención, el complejo está a una concentración de 1 ng/ml a 1 g/ml. En otra realización de la presente invención, el complejo está a una concentración de 100 ng a 10 mg/ml.

15

El complejo puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o más compuestos. En otra realización de la presente invención, ^{212}Pb y/o ^{212}Bi está complejado mediante EDTMP osteófilo.

20

En una realización, la disolución está en un volumen de 100 μl a 1000 ml, tal como de 500 μl a 100 ml, de 1 ml a 10 ml. En una realización de la presente invención, la radioactividad de la disolución es de 1 kBq a 1 GBq, tal como de 10 kBq a 100 MBq, tal como de 100 kBq a 10 MBq. En otra realización de la presente invención la radioactividad de la disolución es de 100 kBq a 100 MBq. En otra realización de la presente invención, el agente complejante está conjugado con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína sintética, un péptido, una hormona o derivado de hormona o una vitamina o derivado de vitamina, por ejemplo, biotina y folato.

25

En otra realización de la presente invención, el agente complejante es el agente quelante TCMC conjugado con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína sintética, un péptido, una hormona o derivado de hormona o una vitamina o un derivado de vitamina.

30

Con fines de dosificación, las disoluciones de ^{224}Ra administradas deben haberse almacenado durante algún tiempo, por ejemplo, 1 día o más preferiblemente al menos dos días, tal como 1-2 días o 1-3 días, para alcanzar el equilibrio entre ^{224}Ra y $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$. Esto garantizará razones de actividad de ^{212}Pb con respecto a ^{224}Ra de entre 0,83 y 1,14. Esto puede lograrse, por ejemplo, por el fabricante simplemente conservando el producto durante un día más o menos antes del envío.

35

Es importante mantener el radio como principalmente un catión no complejado, o débilmente complejado, ya que esto garantiza una captación máxima en los huesos y metástasis óseas y también garantiza excreción favorable de producto eliminado principalmente por medio de los intestinos.

40

Al añadir agente complejante a una disolución de radio, el nucleido hijo radioactivo puede hacerse osteófilo o afín al tumor y aumentar el potencial terapéutico de la disolución de radio en lugar de ser un peligro para la salud. Aunque debe ser un agente complejante que no afecte negativamente a las propiedades osteófilas del radio. Por ejemplo, EDTMP puede depurar ^{212}Pb producido en la disolución de radio durante el transporte y almacenamiento entre la planta de producción y los hospitales en los que el producto va a administrarse.

45

Aunque es posible reducir la susceptibilidad añadiendo inhibidores radiolíticos, proteínas o péptidos que seleccionan como diana tumores a menudo son más susceptibles a sufrir radiólisis y deben proporcionarse probablemente en un formato de kit mediante el que se añaden de unas pocas horas a unos pocos minutos antes de la administración de disoluciones de ^{224}Ra con semividas relativamente largas.

50

Se sabe en el campo que calixarenos y EDTA pueden, hasta cierto punto, complejar radio y también complejar plomo y bismuto. Sin embargo, en el trabajo actual se han encontrado agentes quelantes que dejarían el radio principalmente sin complejar o débilmente complejado, tal como se determina mediante mediciones de biodistribución *in vivo*, mientras que pueden, rápidamente y con estabilidad relevante, complejar el nucleido hijo más longevo ^{212}Pb . La complejación selectiva puede usarse para hacer que al menos el plomo sea osteófilo o afín al tumor mientras se conservan las propiedades favorables del radio en cuanto al tratamiento de enfermedades escleróticas, como metástasis óseas. El complejo de ^{212}Pb que selecciona como diana hueso o células tumorales genera el emisor alfa ^{212}Bi a partir de la desintegración de ^{212}Pb . Por tanto, el emisor beta ^{212}Pb se usa como una fuente alfa indirecta para irradiar las células o el tejido seleccionados como diana. Otros quelatos potenciales que podrían ser adecuados para la depuración de nucleidos hijos de ^{224}Ra además de TCMC y DOTA incluyen, pero no se limitan a, porfirinas, DTPA y derivados de DTPA y también DOTA unido a carboxilo.

55

60

65

- El plomo-212 es claramente la progenie más longeva de ^{224}Ra y es el más importante a complejar, ya que es un generador *in vivo* del emisor alfa efímero ^{212}Bi . Si se capta un quelato de ^{212}Pb en el hueso o en células tumorales, ^{212}Bi también se retendrá probablemente en la diana. En una disolución de ^{224}Ra en equilibrio con progenies, habrá
- 5 más de 10 veces de átomos de ^{212}Pb frente a átomos de ^{212}Bi . Por tanto, la cantidad de radiación generada a partir de los átomos de ^{212}Bi en estas disoluciones es escasa y probablemente no es de importancia toxicológica en comparación con las series de desintegración de ^{224}Ra y ^{212}Bi . La cantidad de ^{212}Bi es comparable a la del ^{211}Pb que produce indirectamente una partícula alfa en la serie de ^{223}Ra y esto no ha sido un problema significativo para el registro y uso clínico de ^{223}Ra en equilibrio con progenies.
- 10 Sin embargo, si también se necesitase un alto grado de quelación de ^{212}Bi en un producto inyectable, sería necesario, al menos en algunos casos, añadir una agente estabilizante como NaI o HI puesto que el bismuto en disoluciones acuosas tiende a existir en un estado menos adecuado para la quelación.
- 15 Cuando se comparan con productos farmacéuticos alfa aprobados actualmente para el tratamiento de metástasis óseas, es decir, ^{223}Ra , las disoluciones novedosas descritas en el presente documento podrían dar, en una de las realizaciones, un producto con propiedades mejoradas para el tratamiento de metástasis óseas puesto que puede hacerse que el nucleido hijo seleccione como diana células cancerosas circulantes y, hasta cierto punto, también metástasis de tejidos blandos. Esto puede evitar la recidiva de recolonización de cáncer del esqueleto debido a CTC.
- 20 Otro aspecto es que la semivida más corta de ^{224}Ra frente a ^{223}Ra puede en realidad ser beneficiosa ya que el radio está incrustado en la matriz ósea. Debido a la alta densidad del mineral óseo, el intervalo de partículas alfa se reduce fuertemente en el hueso frente a tejidos blandos. Especialmente en áreas de mineralización rápida como metástasis de cáncer óseas, el proceso de incrustación puede ser significativo cuando se usa un producto
- 25 farmacéutico alfa afín a volumen.
- Por tanto, ^{224}Ra podría mejorar la dosis del tumor puesto que, en promedio, estará menos incrustado en el momento de la desintegración.
- 30 Las enfermedades para las que pueden usarse las disoluciones de ^{224}Ra novedosas incluyen, pero no se limitan a, cánceres primarios y metastásicos, enfermedades autoinmunitarias y arteriosclerosis. El producto puede administrarse por vía intravenosa o local, incluyendo por vía intraperitoneal, o en entornos de perfusión de extremidades.
- 35 Los agentes quelantes usados en las disoluciones novedosas pueden ser acíclicos así como agentes quelantes cíclicos y criptandos, éteres corona, porfirinas o polifosfonatos cíclicos o no cíclicos incluyendo DOTMP y EDTMP. Además puede usarse un bisfosfonato, por ejemplo, pamidronato, conjugado con DOTA, TCMC o similar como depurador en la disolución de ^{224}Ra .
- 40 Podría argumentarse que la cantidad de ^{212}Pb en la disolución de ^{224}Ra terapéutica puede ser de moderada a escasa (es decir, en equilibrio de aproximadamente 1,1 veces la de ^{224}Ra). Si se asume una dosificación similar de ^{224}Ra como se hace con ^{223}Ra en pacientes pero corregida para la diferencia de semivida, la dosis administrada sería de aproximadamente 150 kBq por kg de peso corporal.
- 45 En equilibrio, esto se traduciría en una dosificación de conjugado de ^{212}Pb -anticuerpo de 11,5 MBq en 5 litros de sangre en un paciente de 70 kg (si ^{212}Pb está quelado cuantitativamente). El número de células tumorales circulantes es normalmente de menos de 10 células por ml, por tanto, en 5 l de sangre hay menos de 50.000 células tumorales en total. Si sólo 1 de 100.000 de las moléculas de conjugado de ^{212}Pb -anticuerpo inyectadas se une a las
- 50 células tumorales, esto significaría al menos 0,0023 Bq por célula, equivalente a aproximadamente 127 átomos de ^{212}Pb unidos por célula, lo que sería altamente destructivo ya que se ha notificado que una media de 25 ^{212}Pb unidos a células por célula destruiría el 90% de una población celular.
- Previamente, se sugirió combinar radio y fosfonatos y más preferiblemente bisfosfonatos en el tratamiento de metástasis óseas de cáncer. Sin embargo, se sugirió usar los dos compuestos separados entre sí ya que era
- 55 preferible inyectarlos en diferentes momentos. La aplicación de fosfonatos no estaba indicada para la complejación de radionucleidos. El fin principal era usar cantidades farmacológicamente activas de fosfonatos como tratamiento óseo secundario a radio. Además, se prefirió usar bisfosfonatos no complejantes, por tanto, esto desaconseja usar EDTMP o similar como aditivo para disoluciones de radio para la complejación de nucleidos hijos. En aquel momento, era conocimiento común que EDTMP podía complejar metales alcalinotérreos, tal como se conocía en el
- 60 campo que ^{153}Sm -EDTMP puede provocar complejación de calcio en sangre y provocar hipocalcemia.
- Sin embargo, en el trabajo actual, se ha demostrado que cuando se usan cantidades modestas de EDTMP, es posible complejar ^{212}Bi y ^{212}Pb sin reducir significativamente las propiedades osteófilas de ^{224}Ra .
- 65 En el informe actual es la primera vez que se ha presentado la adición de un fosfonato complejante a una disolución de radio. Muestra que es posible obtener complejación selectiva de nucleidos hijos sin alterar significativamente las

propiedades de direccionamiento óseo del radio. Esto es importante puesto que aunque los fosfonatos complejantes son osteófilos, el radio muestra una capacidad de direccionamiento óseo incluso mayor que los fosfonatos. Por tanto, es altamente ventajoso que el marcaje de nucleidos hijos no provoque captación esquelética reducida del radio.

5 En cuanto a la selección como diana de huesos con fosfonatos, se conoce en el campo que radionucleidos como ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{227}Th y ^{225}Ac complejados con fosfonatos pueden seleccionar como diana hueso. En un informe previo, también se mostró que los radionucleidos ^{212}Pb y ^{212}Bi podían complejarse con EDTMP y DOTMP. Sin embargo, se realizó el marcaje con alto pH y también era necesaria purificación mediante intercambiador de iones tras el marcaje. Por tanto, esto desaconseja usar marcaje *in situ* en presencia de radio, sin afectar al radio, y sin purificación tal como se muestra en la solicitud actual. Por tanto, se presenta por el presente documento una manera novedosa de usar EDTMP como depurador para nucleidos hijos en disoluciones de ^{224}Ra que (1) mejora la dosis ósea por unidad de ^{224}Ra administrada, y (2) reduce fuertemente la captación de ^{212}Pb en células y tejidos hematopoyéticos provocando en efecto mejores razones de radiación diana con respecto a no diana.

10
15 Las disoluciones usadas para la complejación de nucleidos hijos y ^{224}Ra pueden contener inhibidores radiolíticos y otros modificadores adecuados para un producto inyectable médico conocido en el campo.

La disolución también puede ser una composición farmacéutica.

20 Habitualmente, una disolución tampón es un elemento importante de una composición farmacéutica, que en gran medida mantiene la integridad química del radioinmunoconjugado y es fisiológicamente aceptable para su infusión en pacientes.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende uno o más portadores y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

25 Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, tampones no tóxicos, cargas, disoluciones isotónicas, etc. Más específicamente, el portador farmacéutico puede ser, pero no se limita a, solución salina normal (0,9%), solución salina medio normal, lactato de Ringer, dextrosa al 5%, dextrosa al 3,3%/solución salina al 0,3%. El portador fisiológicamente aceptable puede contener un estabilizador antirradiolítico, por ejemplo, ácido ascórbico, que protege la integridad del producto radiofarmacéutico durante el almacenamiento y envío.

Kits

35 La disolución debe hacerse fisiológicamente adecuada para inyecciones o bien en una planta de producción centralizada o bien constituirse mediante un sistema de kit de normalmente 2-4 viales mediante lo cual es fisiológicamente adecuada para inyección tras la combinación de los viales del kit.

40 Un aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende un primer vial que comprende una disolución radiofarmacéutica de la presente invención, y un segundo vial que comprende una disolución de neutralización para ajustar el pH y/o la isotonicidad de la disolución radiofarmacéutica antes de la administración a un paciente.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende un primer vial que comprende un quelato conjugado con una proteína o péptido o mezclas de proteínas o péptidos, y un segundo vial que comprende una disolución de ^{224}Ra .

Puesto que la serie de desintegración de ^{224}Ra incluye un nucleido hijo de radón que puede difundir al aire, los viales que contienen los productos deben estar bien sellados para evitar el escape de ^{220}Rn .

50 Debido a la naturaleza altamente localizada de irradiación alfa, la radiólisis debe considerarse como un problema potencial y el producto radiofarmacéutico debe diseñarse para minimizar esto. Según el conocimiento en el campo, los anticuerpos radiomarcados son sensibles a la radiólisis y, por tanto, un sistema de kit puede ser ventajoso para disoluciones de ^{224}Ra que van a combinarse con anticuerpos conjugados con agentes quelantes para depurar ^{212}Pb y o ^{212}Bi .

55 Para un anticuerpo monoclonal, habitualmente es aconsejable mantener la propia dosis de la disolución radiofarmacéutica que produce partículas alfa por debajo de 0,5 kGy para evitar propiedades de unión reducidas debido a radiólisis. Por tanto, se recomienda un sistema de kit mediante el cual se añade anticuerpo conjugado con agente quelante a la disolución de ^{224}Ra (incluyendo nucleidos hijos) de unas pocas horas a 10 minutos antes de la inyección para disoluciones concentradas destinadas a envío lejano.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo conjugado con agente quelante se añade a la disolución de ^{224}Ra (incluyendo nucleidos hijos) de 30 min a 1 hora antes de la inyección.

65 En una realización de la presente invención, el anticuerpo conjugado con agente quelante se añade a la disolución de ^{224}Ra (incluyendo nucleidos hijos) de 1 min a 20 min antes de la inyección.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo conjugado con agente quelante se añade a la disolución de ^{224}Ra (incluyendo nucleidos hijos) de 1 min a 10 min antes de la inyección.

5 Un kit con una proteína o péptido marcado con quelato en un vial y una disolución de ^{224}Ra en otro vial mediante lo cual se mezcla el contenido de los dos de unas pocas horas a 30 minutos antes de la administración a un paciente para unir ^{212}Pb y/o ^{212}Bi al quelato.

10 En una realización de la presente invención, se mezcla el contenido de los dos de 30 min a 1 hora antes de la inyección.

En una realización de la presente invención, se mezcla el contenido de los dos de 1 min a 20 min antes de la inyección.

15 En realización de la presente invención, se mezcla el contenido de los dos de 1 min a 10 min antes de la inyección.

Opcionalmente, podría usarse un tercer vial que contiene un líquido usado para dilución y ajuste de la isotonicidad antes de la administración de la disolución radiofarmacéutica. Este tercer vial puede contener EDTMP que podría quelar ^{212}Bi , si fuera necesario.

20 Usos médicos

Los métodos y disoluciones novedosos descritos han resuelto de ese modo un problema principal para la aplicación de ^{224}Ra en medicina nuclear.

25 Por tanto, pueden tratarse dos tipos de enfermedades con las nuevas formulaciones:

30 1. Enfermedades escleróticas o solamente relacionadas con el hueso con radio y nucleido hijo complejado por un fosfonato.

35 2. Enfermedad relacionada con los huesos con componentes de tejido blando o de células diana circulantes por radio y nucleido hijo complejado con el conjugado de quelato-anticuerpo monoclonal o conjugados proteicos o peptídicos similares. Una realización especial de esto sería cuando ^{212}Pb está conjugado con un quelato proteico o peptídico y el ^{212}Bi está complejado por un osteófilo, por ejemplo, EDTMP.

Pueden usarse proteínas o péptidos con la presente invención incluyendo los que seleccionan como diana osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de tiroides.

40 Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una disolución radiofarmacéutica de la presente invención para su uso como medicamento.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a una disolución radiofarmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento de enfermedades óseas.

45 En una realización de la presente invención, la enfermedad ósea se selecciona del grupo que consiste en metástasis óseas de cánceres de mama, próstata, riñones, pulmones, huesos, o mieloma múltiple, o enfermedades no cancerosas que provocan calcificación no deseada incluyendo espondilitis anquilosante.

50 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método de tratamiento de enfermedad maligna o no maligna mediante la administración de una disolución radiofarmacéutica de la presente invención a un individuo que lo necesita.

Método de producción

55 En el presente documento se describen métodos novedosos posibles para producir una disolución de ^{224}Ra adecuada para tratar enfermedades óseas incluyendo cáncer primario o metastásico, usando producción centralizada y hasta varios días de envío y/o almacenamiento antes de la administración a pacientes.

60 Además, una disolución de este tipo puede dar una dosis de radiación tumoral inicial más alta en comparación con una disolución de ^{224}Ra puro, ya que los productos de desintegración darán una dosis adicional al tumor cuando se vuelven osteófilos o afines al tumor por los complejos quelantes mencionados anteriormente. Esto podría hacer que las disoluciones de ^{224}Ra fueran más potentes en la terapia contra el cáncer puesto que el nucleido madre puede seleccionar como diana la enfermedad ósea mientras que el nucleido hijo más longevo, mediante un complejo añadido, puede hacerse que busque y destruya células cancerosas circulantes en la sangre, alternativamente puede convertirse en un osteófilo más puro mediante complejación con fosfonato.

65

Los procedimientos y métodos novedosos presentados en el presente documento permiten la producción y el envío de ^{224}Ra con una vida útil más larga de días o incluso hasta una semana o más ya que el nucleido hijo "problemático" puede depurarse mediante quelatos afines a tumores y potenciar realmente las propiedades terapéuticas de las disoluciones de ^{224}Ra .

5 Este hallazgo es importante ya que ^{224}Ra se ha considerado menos útil, por ejemplo, para la terapia contra el cáncer contra metástasis óseas debido a los productos de desintegración con semividas sustanciales, en particular ^{212}Pb , que estará presente en cantidades significativas unas pocas horas tras la producción de una disolución de ^{224}Ra puro.

10 Eso se hace posible mediante las disoluciones farmacéuticas novedosas descritas en este caso en las que el ^{224}Ra selecciona como diana hueso y metástasis óseas mientras que puede hacerse que ^{212}Pb seleccione como diana células tumorales circulantes según el conjugado de quelato-anticuerpo usado. La disolución farmacéutica podría "hacerse a medida" según el tumor primario del que se originan las metástasis óseas. Existen varios anticuerpos con selectividad para diferentes antígenos expresados en, por ejemplo, cánceres de próstata, mama, pulmón, hueso, riñón, tiroides y mieloma múltiple.

15 Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para proporcionar una disolución de ^{224}Ra que comprende un complejo proteico o complejo peptídico que comprende mezclar la proteína o péptido marcado con quelato con una disolución que comprende ^{224}Ra .

20 Por tanto, la invención novedosa descrita en el presente documento puede usarse o bien como un osteófilo puro cuando se combina con EDTMP o similar, o bien si los pacientes tienen, o se sospecha que tienen, CTC que pueden medirse, como una combinación de tratamiento de metástasis óseas y CTC o metástasis de tejidos blandos, añadiendo de ese modo una nueva dimensión a los productos farmacéuticos alfa contra enfermedades relacionadas con los huesos, es decir, una actividad profiláctica adicional que evita el asentamiento de CTC viables en el esqueleto o tejidos blandos.

25 Los hallazgos novedosos y sorprendentes son los siguientes:

30 1. Pueden acondicionarse las disoluciones de radio con fosfonatos complejantes o anticuerpos conjugados con complejo sin provocar la complejación de radio y provocar captación ósea reducida de radio mientras se compleja ^{212}Pb y/o ^{212}Bi *in situ* sin la necesidad de purificación antes del uso.

35 2. Pueden complejarse eficazmente los nucleidos hijos producidos durante el envío y almacenamiento *in situ* produciendo una disolución de radio con propiedades de nucleidos hijos mejoradas.

40 La disolución de ^{224}Ra puede almacenarse o enviarse durante varios días y aún así la fracción principal del ^{212}Pb generado puede complejarse, es decir, al menos el 60%, más favorablemente al menos el 90% e incluso más favorablemente el 95-100%, según la cantidad de agente complejante añadida.

45 Esto es importante ya que proporciona a un producto radiofarmacéutico mejores razones de diana con respecto a no diana globales en comparación con formulaciones de radio existentes tal como se muestra en los siguientes ejemplos y permite el uso de disoluciones de ^{224}Ra que se han enviado y almacenado durante varios días. En efecto, desaconseja usar disoluciones recién preparadas de ^{224}Ra con sólo unas pocas horas de vida útil como en el método de Altmann Therapie, ya que puede ser ventajoso con el nuevo método que ^{212}Pb haya alcanzado el equilibrio o esté próximo al equilibrio, es decir, al menos 1 día o más, para obtener una razón reproducible y definida entre ^{224}Ra y ^{212}Pb en la disolución radiofarmacéutica administrada.

50 También se ha confirmado que otros complejos distintos de fosfonatos pueden marcarse con nucleidos hijos *in situ* en disoluciones de radio sin afectar significativamente al radio, por ejemplo, se añadieron conjugados de quelato-anticuerpo a la disolución de radio y mostraron un marcaje relevante de nucleidos hijos con una conservación significativa de la integridad química del radio, por tanto, es posible tener una disolución de radio mediante la cual uno o más de los nucleidos hijos está complejado con moléculas afines a tumores que producen una disolución farmacéutica con propiedades de direccionamiento biespecíficas, por ejemplo, radio que selecciona como diana la enfermedad ósea y un complejo de quelato con nucleidos hijos que seleccionan como diana un antígeno de célula tumoral en células tumorales circulantes, etc. Como realización especial un nucleido hijo puede estar complejado con un anticuerpo monoclonal y el otro con un fosfonato.

55 Una realización especial de la presente invención es una disolución con radio que contiene TCMC conjugado con una proteína o un péptido, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, mediante lo cual el anticuerpo selecciona como diana un antígeno en células de cáncer de mama, próstata, pulmón, riñón, hueso o mieloma múltiple. Si se deja durante de unos pocos minutos a unos pocos días, el ^{212}Pb generado se unirá principalmente al conjugado de TCMC-anticuerpo. Cuando se inyecta una disolución de este tipo en un paciente con cáncer, ^{224}Ra protegerá al hueso de la destrucción destruyendo células tumorales en la superficie del hueso y en el esqueleto y el anticuerpo marcado con ^{212}Pb destruirá células circulantes fuera del alcance de la radiación del radio. Por tanto, lo que antes

era un problema de nucleidos hijos libres con una biodistribución no deseada se convierte en una ventaja para la serie de ^{224}Ra mediante el uso de la presente invención. Es particularmente atractivo usar un antígeno de internalización como diana puesto que los conjugados de ^{212}Pb son especialmente eficaces como generador *in vivo* de emisores alfa en tales condiciones mediante lo cual el nucleido hijo emisor alfa ^{212}Bi queda encerrado en las células diana (Boudousq *et al.*, 2013).

En una realización, el producto radiofarmacéutico se envía listo para usar, por ejemplo, en un vial con un septo para retirar de la disolución con una jeringa o incluso como una jeringa precargada lista para usar. En una segunda realización, el producto puede enviarse en un formato de kit que consiste en un vial con disolución de ^{224}Ra , un segundo vial con una disolución de un agente quelante y opcionalmente una tercera disolución con un tampón de formulación para el ajuste de la concentración y/o el pH, etc. El agente quelante, mediante lo cual es un fosfonato, conjugado de agente quelante-anticuerpo o similar, se añade la disolución de Ra y se mezcla durante de unos pocos minutos a unas pocas horas, lo más preferiblemente de 5-60 minutos, antes de que se le añada al producto, si es necesario, un tampón de formulación, y se administre al paciente.

Ejemplos

Ejemplo 1. Cálculo del nivel de nucleidos hijos de ^{212}Pb a partir de la desintegración de ^{224}Ra en diversos puntos de tiempo.

Antecedentes. El ^{212}Pb producido tras la preparación de un producto radiofarmacéutico de ^{224}Ra puro puede ser un problema, puesto que tiene propiedades diferentes y no deseables en comparación con el nucleido madre. Por ejemplo, se sabe que el radio puede seleccionar como diana hueso y metástasis óseas, pero la progenie de plomo tiene acumulación no deseada en células y tejidos hematopoyéticos y en los riñones.

Método: Se calculó el crecimiento de ^{212}Pb a partir de una fuente de ^{224}Ra puro usando una calculadora de actividad universal.

Resultados: La tabla 2 muestra la cantidad de ^{212}Pb en diversos puntos de tiempo tras la producción de una disolución farmacéutica de ^{224}Ra puro y almacenamiento en un recipiente hermético.

Los datos muestran que está presente una cantidad significativa de nucleido hijo dentro de un margen de tiempo relativamente corto, lo que complica una posible producción centralizada y suministro de productos radiofarmacéuticos a base de ^{224}Ra . Sin embargo, cabe señalar que la razón de ^{212}Pb con respecto a ^{224}Ra en la disolución alcanza 1 tras 36 horas y después de eso aumenta gradualmente hasta aproximadamente 1,1 de lo cual permanece igual durante el resto del tiempo hasta la desintegración completa.

Ejemplo 2: Preparación de radionucleidos y recuento de muestras radiactivas.

En lo siguiente, se realizó todo el trabajo con las preparaciones radiactivas concentradas incluyendo evaporación de disolvente etc. en una caja de guantes. Se adquirió una fuente de ^{228}Th en HNO_3 1 M de un proveedor comercial. Se adquirió acResin de Eichrom Technologies LLC (Lisle, IL, EE.UU.) en forma de un cartucho precargado. Para usar un volumen de disolvente más pequeño, se extrajo aproximadamente el treinta por ciento de los materiales de un cartucho (cartucho 1) y se volvió a rellenar en una columna más pequeña (cartucho 2) hecha mediante una columna de filtración de 1 ml (Isolute SPE, Biotage AB, Uppsala, Suecia). Se usó una suspensión que representaba el 20% del contenido del cartucho original para la inmovilización de ^{228}Th en 500 microlitros de HNO_3 1 M a lo que se añadieron 500 microlitros de HCl 1 M y se incubó agitando el vial (vial de 4 ml, muestra de E-C, Wheaton, Millville, NJ, EE.UU.) durante al menos 4 horas. Al cartucho 2 se le añadió una pequeña cantidad (aproximadamente 0,1 ml) de acResin. Después de eso, se añadió una suspensión al cartucho 2 usando el material precargado como capa de recepción. Pudo eluirse radio del cartucho 2 en 2 ml de HCl 1 M. Se evaporó la disolución de radio de 2 ml hasta sequedad, usando un bloque calentador y purgando el vial con gas N_2 a través de una entrada y salida de tubo de teflón en el septo de caucho/teflón sobre el vial y conduciendo el vapor de ácido al interior de un vaso de precipitados de NaOH saturado mediante una corriente de gas N_2 .

Se resolvió el residuo en 0,5 ml de HNO_3 1 M y se cargó en un cartucho 3 que consistía en una columna Isolute de 1 ml rellena con aproximadamente 250 mg de intercambiador aniónico Dowex. Se lavó el cartucho 3 con 7 ml de HNO_3 1 M, que retiraron ^{212}Pb , y finalmente con 3-4 ml de HNO_3 8 M para eluir ^{224}Ra . Se evaporó el eluato de ^{224}Ra hasta sequedad, usando el bloque calentador y un flujo de gas N_2 , y pudo disolverse el residuo en HCl 0,1 M. Normalmente, pudo extraerse más del 70% del ^{224}Ra presente en la fuente de ^{228}Th y purificarse usando los métodos descritos.

Se contaron las muestras radiactivas en un contador Cobra II Autogamma (Packard Instruments, Downer Grove, IL, EE.UU.). Durante la extracción de ^{224}Ra a partir de la fuente de ^{228}Th , se usó un calibrador de dosis CRC-25R (Capintec Inc., Ramsey, NJ, EE.UU.).

Para determinar la distribución de ^{224}Ra , ^{212}Pb y ^{212}Bi en tiempo real en las muestras, se usó un detector HPGe

enfriado con nitrógeno líquido (GWC6021, Canberra Industries, Meriden CT, EE.UU.). Esto se combinó con un analizador de señal digital DSA 1000 y el software Genie 2000 (Canberra).

5 Ejemplo 3: Determinación de la tasa de recuento neta para ^{212}Pb en una mezcla de $^{212}\text{Pb}/^{224}\text{Ra}$ antes de que se alcance el equilibrio radioactivo.

Después de más de 3 días, es decir, "equilibrio", una muestra tendrá, con fines prácticos, 1,1 veces ^{212}Pb frente a ^{224}Ra .

10 Independientemente de si ^{212}Pb es mayor o menor que el equilibrio, puede suponerse que esto se alcanza después de 3 días desde que el excedente de ^{212}Pb se reduzca en el 99% y el crecimiento de ^{212}Pb a partir de ^{224}Ra sea prácticamente completo frente a "equilibrio".

15 El uso del contador Cobra II Autogamma con un ajuste de ventana de recuento de desde 70-80 KeV produce principalmente el ^{212}Pb con muy poca contribución de otros radionucleidos en la serie de ^{224}Ra . El radio-224 debe contarse indirectamente cuando ha desaparecido el ^{212}Pb inicial y se ha alcanzado el equilibrio entre ^{224}Ra y ^{212}Pb (después de aproximadamente 3 días). Este recuento indirecto requiere que la muestra se almacene en recipientes relativamente herméticos ya que de otro modo el ^{220}Rn puede escapar, impidiendo que se alcance el equilibrio de radionucleidos de 1,1 entre ^{212}Pb y ^{224}Ra .

20 Dado que el muestreo y recuento pueden estar separados por algo de tiempo, la tasa de recuento neta para ^{212}Pb puede ajustarse para la desintegración para determinar la tasa de recuento neta de ^{212}Pb en el momento del muestreo.

25 Ejemplo 4: Análisis de cromatografía en capa fina

Se realizó cromatografía en capa fina (CCF) usando tiras de cromatografía (n.º de modelo 150-772, Biodex Medical Systems Inc, Shirley, NY, EE.UU.). Se usó un vaso de precipitados pequeño con aproximadamente 0,5 ml de NaCl al 0,9% para colocar las tiras con un punto de muestra. A la tira se le añadieron normalmente 1-4 µl de muestra a aproximadamente el 10% por encima de la parte inferior de la tira. Después de que el frente del disolvente se hubiera movido hasta aproximadamente el 20% de la parte superior de la tira, se cortó la tira por la mitad y se colocó cada mitad en un tubo de ensayo de 5 ml para el recuento. En este sistema, el anticuerpo radiomarcado y radionucleido libre no migran desde la mitad inferior mientras que el radionucleido complejado con EDTA migra a la mitad superior. Se mezcló un tampón de formulación (FB) que consistía en albúmina sérica humana al 7,5% y EDTA 5 mM en DPBS y se ajustó a aproximadamente pH 7 con NaOH con los conjugados de anticuerpo en una razón de 2:1 durante al menos 5 minutos antes de la aplicación a la tira para determinar el radionucleido libre.

40 Se realizó el análisis del EDTMP sin el FB (tabla 3 A). Se midió el marcaje de radionucleido con EDTMP mediante la cantidad de migración a la mitad superior de las tiras. El DOTMP migró escasamente en este sistema y, por tanto, estas disoluciones tuvieron que tratarse con FB para medir el radionucleido libre en la mitad superior de la tira (tabla 3 A).

Ejemplo 5: Quelación *in situ* de ^{212}Pb en disoluciones de ^{224}Ra .

45 Inicialmente, se neutralizaron disoluciones de ^{224}Ra en HCl 0,1 M con NaOH 1 M y se añadió el EDTMP a la disolución para obtener un pH ligeramente por debajo del neutro. En experimentos posteriores, se usó una razón de 10:1 de ^{224}Ra en HCl 0,1 M y acetato de amonio 5 M antes de la adición de los agentes quelantes, dando como resultado un intervalo de pH de 5,5 - 7 para las reacciones. Se sometieron a prueba tiempos de reacción de 30 minutos a varios días, a temperatura ambiente, para EDTMP con buen rendimiento de marcaje (normalmente por encima del 90% según CCF) cuando se usaron concentraciones de EDTMP de aproximadamente 4-8 mg/ml en disoluciones de reacción. Por tanto, EDTMP parece ser un buen depurador para ^{212}Pb *in situ* en disoluciones de ^{224}Ra . En cuanto a DOTMP, el marcaje fue menos eficaz con aproximadamente el 70% de marcaje para 7 mg/ml a temperatura ambiente y aproximadamente 1 h de tiempo de reacción. El rendimiento de marcaje de DOTMP puede mejorarse ajustando la concentración de agente quelante o tiempo de reacción, etc. Debe indicarse que experimentos posteriores que usaban tampones de EDTMP y acetato de amonio mostraron un buen marcaje con ^{212}Pb también en disoluciones de radio de pH 5,5 a 7 tal como se determina mediante cromatografía en capa fina (tabla 3 A).

60 Se sometió a prueba la depuración a largo plazo dejando una disolución de ^{224}Ra con EDTMP (aproximadamente 6 mg/ml) tamponada a aproximadamente pH 6 con acetato de amonio, durante 7 días a temperatura ambiente. Se realizó el análisis del perfil de distribución de ^{212}Pb mediante el uso de CCF tal como se describió. Resultados: Se halló al menos el 93% de la actividad en la mitad superior de la tira de CCF correspondiente a la actividad asociada a EDTMP tras 7 días. En conclusión, es posible quelar eficazmente ^{212}Pb generado *in situ* en disolución de ^{224}Ra mediante EDTMP. Por tanto, es posible preparar disoluciones de ^{224}Ra listas para usar con un agente quelante osteófilo que depura ^{212}Pb *in situ* obteniendo así una disolución de ^{224}Ra con vida útil mejorada para su uso como producto radiofarmacéutico de direccionamiento óseo.

Como alternativa, puede usarse un kit de marcaje mediante lo cual se añade EDTMP a disoluciones de ^{224}Ra de varios días de unos pocos minutos a unas pocas horas antes de la administración. Un kit de marcaje de este tipo también permitirá una producción centralizada de ^{224}Ra , ya que el kit puede ser muy simple de usar para disoluciones de ^{224}Ra de varios días a más de una semana tras la fecha de producción para ^{224}Ra . En un experimento con una disolución de ^{224}Ra de 8 días en HCl 0,1 M y acetato de amonio 0,5 M, se añadió EDTMP a una concentración de aproximadamente 7 mg/ml. Después de 10 minutos y 1 hora en reposo a temperatura ambiente, los análisis de CCF mostraron que el 91% y el 93%, respectivamente, del ^{212}Pb estaba asociado con el EDTMP. Se sometieron a prueba disoluciones de EDTMP de hasta 4 meses y se encontró que eran funcionales, por tanto EDTMP parece idóneo para usarse en un formato de kit.

Ejemplo 6: Biodistribución en ratones de ^{224}Ra con cantidades significativas de ^{212}Pb con y sin EDTMP.

El principal objetivo era estudiar la biodistribución de los radionucleidos inyectados con o sin EDTMP. Se usaron una disolución que contenía EDTMO y una solución salina de control, respectivamente, de ^{224}Ra en equilibrio con radionucleidos hijos. Materiales y métodos: Se realizaron experimentos con animales según las regulaciones europeas para animales usados con fines científicos. Los ratones desnudos crecieron completamente y tenían una edad de más de 6 meses. Se dividió en dos una disolución 0,1 M de 3 días que contenía ^{224}Ra . A una fracción se le añadió EDTMP y NaOH 1 M para ajustar el pH a aproximadamente 8, hasta una concentración final de 5 mg de EDTMP por ml (disolución A). Se ajustó la otra fracción mediante NaOH 1 M a aproximadamente pH 7 (disolución B). Cada disolución se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de jeringa de 13 mm 0,2 μm Acrodisc (Pall Life Science, Port Washington, NY, EE.UU.) con membrana Supor. Después de eso, se administraron 100 μl con aproximadamente 20 kBq de ^{224}Ra mediante inyección en la vena de la cola a cada ratón.

Resultados: Tal como se muestra en la figura 3A y B, hubo una mejora significativa en la distribución de ^{212}Pb cuando se añadió EDTMP. Se redujo significativamente la captación de tejido blando y sangre mientras que el direccionamiento óseo fue similar a ^{212}Pb libre. Por tanto, las razones de hueso con respecto a tejido blando mejoraron enormemente para ^{212}Pb añadiendo EDTMP a la disolución de ^{224}Ra . No hay ningún cambio significativo en la distribución de ^{224}Ra cuando se añade EDTMP tal como se muestra en la figura 3A y B. Conclusión: La adición de EDTMP a disoluciones de ^{224}Ra mejora la biodistribución de ^{212}Pb sin cambios significativos en la biodistribución de ^{224}Ra .

Ejemplo 7: Marcaje de anticuerpo conjugado con agente quelante con ^{212}Pb *in situ* en disolución de ^{224}Ra .

Antecedentes: Resulta ventajoso desde un punto de vista logístico que el producto radiofarmacéutico pueda producirse en una unidad de producción centralizada y enviarse al usuario final. El agente quelante debe depurar el ^{212}Pb generado para minimizar la inyección de ^{212}Pb libre cuando se usa ^{224}Ra .

Métodos: Se produjo y se purificó ^{224}Ra tal como se describió en el ejemplo 2. Se prepararon anticuerpos monoclonales marcados con TCMC y DOTA usando anticuerpos purificados con un concentrador centrífugo (Vivaspin 4 o 20, MWCO de 50000, Sartorius Stedim, Goettingen, Alemania) y se añadió tampón carbonato 150 mM, pH 8,5-9. El anticuerpo tenía una concentración de normalmente 20-30 mg/ml y se añadió p-SCN-Bn-TCMC o p-SCN-Bn-DOTA (Macrocyclics Inc, Dallas, Tx, EE.UU.) usando razones de anticuerpo con respecto a agente quelante de 1:9 ó 1:5, respectivamente. Tras al menos dos horas de incubación a temperatura ambiente, se finalizó la reacción añadiendo glicina 0,1 M en tampón carbonato (pH de aproximadamente 8,5) e incubación adicional durante 10 minutos antes de la purificación e intercambio de tampón en NaCl al 0,9% usando un concentrador centrífugo (Vivaspin). Se usaron concentraciones de agente quelante-anticuerpo de 15-35 mg/ml en NaCl al 0,9% como disoluciones madre.

A un tubo Eppendorf de 2 ml se le añadieron normalmente 40 μl de ^{224}Ra en HCl 0,1 M, 5 μl de acetato de amonio 5 M, 5-10 μl , (15-30 mg/ml) de anticuerpo marcado con TCMC o DOTA en cloruro de sodio al 0,9%. Se sometió a prueba este método para 4 conjugados de anticuerpo diferentes incluyendo los de trastuzumab (Herceptin), rituximab, cetuximab y anticuerpo monoclonal murino OI-3. Se determinó que el pH estaba en el intervalo de 5,4-6,0 aplicando 1 μl sobre un papel de pH (n.ºs 1.09564.0003 y 1.09556.003 de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y leyendo el color. Se realizó la reacción a temperatura ambiente.

En algunos de los experimentos, se hizo reaccionar en paralelo una disolución de control con los mismos componentes excepto porque el anticuerpo no contenía TCMC o DOTA, usando las mismas condiciones. Tras 30 y 100 minutos, se retiraron 5 μl y se mezclaron con 10 μl de un tampón de formulación (FB) que consistía en albúmina sérica humana al 7,5% y EDTA 5 mM en DPBS. Después de al menos 10 minutos, se retiraron 1-4 μl de la mezcla de producto/FB y se colocaron sobre una tira de cromatografía en capa fina (Biodex). Se realizó el mismo procedimiento con la disolución de control. Se eluyeron las tiras en disolución de NaCl al 0,9% y cuando el frente del disolvente alcanzó casi la parte superior, se retiró la tira, se cortó por la mitad y se contaron la parte inferior y superior por separado en un contador gamma Cobra II (tal como se describió anteriormente).

65

Resultados: Se presentan los perfiles de capa fina en la tabla 3 B. Normalmente, se encontró más del 90% de la actividad en la mitad inferior de la tira de capa fina para el conjugado de anticuerpo con TCMC y DOTA. En el control, normalmente se encontró más del 97% de la actividad en la mitad superior de la tira. Esto muestra que tanto los anticuerpos conjugados con TCMC como con DOTA pueden ser depuradores eficaces para ^{212}Pb en disolución de ^{224}Ra . Usando una unidad de filtración centrífuga con un corte de 37 kDa, también se demostró que ^{224}Ra en la disolución de reacción podía separarse eficazmente de los conjugados de TCMC o DOTA lavando con disolución de NaCl al 0,9%. Usando 2 ml y concentrado hasta 0,25 ml, se retiró > 85% del radio del conjugado de ^{212}Pb -DOTA-anticuerpo, por tanto, muestra que los conjugados de anticuerpo con TCMC y DOTA pueden depurar ^{212}Pb sin complejar significativamente ^{224}Ra . En conclusión, es posible usar conjugado de anticuerpo con TCMC o DOTA para depurar ^{212}Pb en disolución de ^{224}Ra permitiendo, por tanto, la producción de una disolución farmacéutica con propiedades de direccionamiento dobles, es decir, un conjugado de ^{224}Ra osteófilo y de ^{212}Pb afín a antígeno.

En un experimento de seguimiento, se tamponó una disolución de ^{224}Ra , a la que se le añadió conjugado de anticuerpo monoclonal chOI-3 (OI-3 quimérico) marcado con TCMC (hasta aproximadamente 1,5 mg/ml), a aproximadamente pH 5,5 con acetato de amonio y se mantuvo durante 7 días a temperatura ambiente. Después de eso, se retiraron las muestras y se mezclaron 1:2 con tampón de formulación (tal como se describió) y tras 5 minutos o más se aplicaron sobre tiras de CCF tal como se describió. Se encontró que, en promedio, se conservó el 95,6% con la proteína (mitad inferior de la tira). En conclusión, se depura ^{212}Pb eficazmente *in situ* en disolución de ^{224}Ra a lo largo de varios días mediante anticuerpo marcado con TCMC. Por tanto, muestra que es posible una producción centralizada que requiere almacenamiento y envío durante varios días para disoluciones de ^{224}Ra con conjugado de quelato-anticuerpo.

Ejemplo 8: Experimento de unión a células con anticuerpo monoclonal radiomarcado en mezcla con ^{224}Ra

La línea celular de osteosarcoma humana OHS expresa Her-2 (relativamente débil) y MUC-18 (moderado). Por tanto, se usaron para evaluar la fracción de unión a células de trastuzumab conjugado con agente quelante y anticuerpos chOI-3 contra Her-2 y MUC-18, respectivamente. Se disolvió radio-224 en HCl 0,1 M y se dejó durante dos días para alcanzar el equilibrio con ^{212}Pb y ^{212}Bi . Para ajustar el pH, se añadieron 12 μl de acetato de amonio 5 M en agua libre de metales a 100 μl de ^{224}Ra en HCl 0,1 M y después de eso se añadieron 200 μg de trastuzumab marcado con TCMC. Después de 30 minutos, la cromatografía en capa fina confirmó que el agente quelante depuró más del 90% del ^{212}Pb . Se esterilizó mediante filtración la mezcla de reacción usando un filtro de jeringa de 13 mm y se sometió a prueba el producto para determinar la unión a células usando aproximadamente 10 millones de células en 0,2 ml de DPBS con BSA al 0,5%. Se bloquearon las células o bien mediante incubación con 20 μg del mismo anticuerpo durante 15 minutos (para medir la unión inespecífica) o bien se dejaron sin bloquear antes de añadir la disolución de reacción con aproximadamente 10 ng de conjugado de quelato-anticuerpo mezclado con radionucleido a cada tubo. Tras 1 hora de incubación, se contaron los tubos en el contador gamma Cobra II para determinar la actividad añadida. Después de eso, se lavaron las células tres veces con 0,5 ml de DPBS/BSA al 0,5% mediante mezclado en remolino, centrifugación y retirada del sobrenadante, y luego se midió la actividad unida a células en los tubos. Se determinó el porcentaje de conjugado de anticuerpo unido a células como unido tras lavar, dividido entre la actividad añadida por 100. Resultados: Cuando se corrigió la desintegración y la pureza radioquímica y se restó la unión inespecífica, se encontró que el 64,3-72,2% de los anticuerpos marcados con ^{212}Pb se unieron específicamente a las células. En este ensayo de un punto, esto indica propiedades de direccionamiento adecuadas del conjugado de ^{212}Pb -anticuerpo producido *in situ* en disoluciones de ^{224}Ra . Conclusión: Se muestra que los conjugados marcados con ^{212}Pb con propiedades de direccionamiento tumoral relevantes pueden producirse *in situ* en disoluciones de ^{224}Ra .

Ejemplo 9: Biodistribución en ratones de $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ con anticuerpo monoclonal marcado con TCMC.

Antecedentes: Para estudiar si podían usarse disoluciones de $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ para preparar productos coterapéuticos dirigidos a células tumorales y óseas. Materiales y métodos: A una disolución de ^{224}Ra de un día, tal como se describió en el ejemplo 6, se le añadieron NaOH, acetato de amonio 5 M y trastuzumab marcado con TCMC de la misma manera que en el ejemplo 7 y se almacenó durante la noche. A la disolución se le añadió agua libre de metales en un razón de 1:1, se esterilizó mediante filtración usando un filtro de jeringa de 13 mm 0,2 μm Acrodisc (Pall Life Science, Port Washington, NY, EE.UU.) con membrana Supor. Se verificó la capacidad de unión a células del componente de anticuerpo marcado con ^{212}Pb en la disolución de ^{224}Ra como en el ejemplo 8. Se realizaron experimentos con animales según las regulaciones europeas para animales usados con fines científicos. Se sacrificaron los animales y se extrajo sangre del corazón antes de que se diseccionaran. Se colocaron muestras de orina, sangre y tejido en tubos de 5 ml. Se midió el peso de los tubos antes y después de la adición de muestras para determinar el peso de muestra exacto. Se midió el contenido de radioactividad en el contador gamma Cobra. Se contaron las muestras poco después de la disección y de nuevo tras 3-4 días cuando se había alcanzado el equilibrio radioactivo para determinar el contenido de ^{212}Pb y ^{224}Ra , respectivamente.

Resultados: Se muestran los perfiles de biodistribución en la figura 3C. El ^{212}Pb mostró un perfil de distribución tal como se esperaba para un anticuerpo radiomarcado, es decir, alta actividad en sangre y tejidos ricos en sangre y baja actividad en fémur y cráneo. En comparación con ^{212}Pb libre (figura 3 A), el ^{212}Pb conjugado con TCMC-trastuzumab (Herceptin) tenía significativamente menos captación en fémur y cráneo mientras que el nivel de

actividad en sangre y órganos ricos en sangre fue mayor. Debe indicarse que la calidad de la distribución es diferente en sangre para ^{212}Pb libre y ^{212}Pb -TCMC-herceptin, ya que este último circula con un aclaramiento en sangre lento pero no se capta en las células sanguíneas como con el ^{212}Pb libre. El ^{224}Ra mostró una alta captación en fémur y cráneo y baja captación en sangre y fue muy similar a la encontrada en la biodistribución de la disolución de radio libre de agente quelante (figura 3 A).

En la tabla 4 se presentan las razones de captación para hueso frente a sangre y hueso frente a riñón para ^{212}Pb , ^{212}Pb -EDTMP y ^{212}Pb -TCMC-trastuzumab en disoluciones de ^{224}Ra . Las razones muestran razones mejoradas de hueso con respecto a sangre y de hueso con respecto a riñón para ^{212}Pb -EDTMP en comparación con ^{212}Pb no complejo. Sin embargo, para ^{212}Pb -TCMC-herceptin, las razones de hueso con respecto a sangre fueron menores que para ^{212}Pb libre. Esto se espera puesto que los anticuerpos monoclonales de tamaño macromolecular se aclaran lentamente de la sangre en comparación con la mayoría de los compuestos de pequeño peso molecular. Esto puede ser una ventaja cuando se seleccionan como diana células tumorales circulantes, ya que el tiempo de residencia aumentado en sangre potencia la probabilidad de unión a células diana en circulación. También debe indicarse que para partículas alfa de corto intervalo de radiación, el efecto del radionucleido unido a células puede ser mucho más fuerte que el de radionucleido circulante debido a la corta proximidad al ADN para el radionucleido asociado a células frente al radionucleido que circula libremente.

En conclusión: El anticuerpo monoclonal marcado con agente quelante puede depurar eficazmente ^{212}Pb sin reducir las propiedades osteófilas de ^{224}Ra en disoluciones radiofarmacéuticas que contienen los dos radionucleidos. Por tanto, muestra la posibilidad de obtener propiedades de direccionamiento dobles de $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ añadiendo agentes complejantes a las disoluciones, fortaleciendo de ese modo el potencial terapéutico de la disolución radiofarmacéutica y reduciendo la posible captación no deseada de ^{212}Pb en células y tejidos hematopoyéticos mientras se mantienen las propiedades osteófilas de ^{224}Ra .

Ejemplo 10: Un sistema de kit para evitar la radiólisis

Debido a la naturaleza altamente localizada de la irradiación alfa, debe considerarse la radiólisis como un problema potencial y el producto radiofarmacéutico debe diseñarse para minimizar esto. Según el conocimiento en el campo, los anticuerpos radiomarcados son sensibles a la radiólisis y, por tanto, un sistema de kit puede ser ventajoso para disoluciones de ^{224}Ra que van a combinarse con anticuerpos conjugados con agentes quelantes para depurar ^{212}Pb . Cuando ^{224}Ra está en equilibrio con las progenies, produce aproximadamente 28 MeV por desintegración de la serie completa. Por tanto, una disolución de 1 MBq/ml contiene $N = A/\lambda = 10^6 \text{ s}^{-1} / (0,693 / [3,64 \times 24 \times 3600 \text{ s}]) = 4,53 \times 10^{11}$ átomos de ^{224}Ra en donde N es el número de átomos y A es la actividad en Bq y λ es la constante de desintegración que es igual a $\ln 2 / t_{1/2}$ y $t_{1/2}$ es la semivida para ^{224}Ra .

La dosis de radiación, D, se define como energía por masa, es decir, J/kg en unidades del SI. Para la desintegración completa de 1 MBq de ^{224}Ra en 1 ml de líquido acuoso, equivaldría a $D = (4,53 \times 10^{11} \times 28 \text{ MeV} \times 1,6 \times 10^{-13} \text{ J/MeV}) / 10^{-3} \text{ kg} = 2029 \text{ Gy}$ es decir, en una semivida de 3,64 días una disolución de 1 MBq/ml de ^{224}Ra en equilibrio con nucleidos hijos estará expuesta a aproximadamente 1 kGy de irradiación propia. Para un anticuerpo monoclonal, se recomienda habitualmente mantener la dosis propia de la disolución radiofarmacéutica por debajo de 0,5 kGy para evitar propiedades de unión reducidas debido a radiólisis.

Por tanto, se recomienda un sistema de kit mediante el cual se añade anticuerpo conjugado con agente quelante, por ejemplo, mediante una jeringa a un vial que contiene la disolución de ^{224}Ra (incluyendo nucleidos hijos) de unas pocas horas a unos pocos minutos antes de que el producto se administre a un paciente, para disoluciones concentradas de ^{224}Ra con progenies adecuadas para envío a larga distancia.

Ejemplo de depuración de ^{212}Pb con conjugado de TCMC-anticuerpo monoclonal en una disolución de ^{224}Ra de 7 días. A una disolución de ^{224}Ra producida una semana antes se le añadió acetato de amonio al 10% y TCMC-rituximab (hasta una concentración final de aproximadamente 5 mg/ml) hasta un volumen final y pH de aproximadamente 0,1 ml y 5,5, respectivamente, y se mantuvo a temperatura ambiente durante la noche. Tras 18 horas, se retiró y se mezcló una muestra con tampón de formulación tal como se describió. Los análisis de CCF mostraron que el 91% de la actividad de ^{212}Pb estaba unida a proteína, es decir, en la mitad inferior de la tira de CCF tal como se determinó mediante recuento gamma. Esto demuestra que un kit con un vial que contiene una disolución de ^{224}Ra y un vial separado con una proteína marcada con agente quelante o similar puede combinarse y usarse para depurar ^{212}Pb en el ^{224}Ra varios días después de la fecha de producción de ^{224}Ra , preparando de ese modo un complejo de ^{224}Ra osteófilo con un ^{212}Pb afín al tumor, usando tiempos de reacción cortos para evitar la degradación radiolítica del producto. Se verificó que los reactivos, distintos de ^{224}Ra , podían almacenarse varias semanas o meses sin perder su función, por tanto, son muy adecuados para su uso en un formato de kit.

Ejemplo 11: Células tumorales circulantes

Las células tumorales circulantes podían dar lugar a nuevas lesiones tumorales en hueso o tejidos blandos y puede abordarse mediante la disolución radiofarmacéutica novedosa descrita en el presente documento.

5 Puede argumentarse que la cantidad de ^{212}Pb en la disolución de ^{224}Ra terapéutica puede ser de moderada a escasa (es decir, en equilibrio aproximadamente 1,1 veces la de ^{224}Ra). Si se asume una dosificación similar de ^{224}Ra como se hace con ^{223}Ra en pacientes pero corregida para la diferencia de semivida, aproximadamente 150 kBq por kg de peso corporal sería la dosis administrada. Esto es sólo un ejemplo y la dosificación puede diferir significativamente según la enfermedad y el nivel de efectos secundarios que sea aceptable.

10 En equilibrio, 150 kBq por kg de peso corporal se traduciría en una dosificación de conjugado de ^{212}Pb -anticuerpo de aproximadamente 11,5 MBq en 5 litros de sangre en un paciente de 70 kg. El número de células tumorales circulantes es normalmente menor de 10 células por ml, por tanto, en 5 l de sangre hay menos de 50000 células tumorales en total. Si sólo 1 de 100000 del conjugado de ^{212}Pb -anticuerpo inyectado se une a las células tumorales, esto significaría 0,0023 Bq por célula, equivalente a 127 átomos de ^{212}Pb unidos por célula, lo que sería altamente destructivo ya que se ha notificado que una media de 25 ^{212}Pb unidos a células por célula destruiría el 90% de una población celular.

15 El número de átomos unidos a una célula dependerá de la actividad específica del anticuerpo conjugado con ^{212}Pb y el número de antígenos disponibles en las células diana. Recientemente se evaluó TCMC-trastuzumab marcado con plomo-212 con una actividad específica de aproximadamente 37 MBq/mg (1 mCi/mg) en un estudio clínico.

20 Un anticuerpo monoclonal marcado con ^{212}Pb con una actividad específica de 37 MBq por mg tiene una razón de átomo de ^{212}Pb con respecto a molécula de anticuerpo de 1:1973, es decir, muy pocas moléculas de anticuerpo están realmente radiomarcadas. Para alcanzar un nivel de destrucción celular del 90% de ^{212}Pb de 25 átomos por célula, se necesitaría unir 49325 moléculas de anticuerpo por célula. Esto puede obtenerse ya que varios antígenos asociados a tumores se expresan en niveles que exceden esto. Además, desde un punto de vista químico, esto es plausible ya que es posible conjugar normalmente de 1 a 5 unidades de agente quelante por molécula de anticuerpo sin perder las propiedades de unión a antígeno, por lo que una fracción muy pequeña de los grupos de agente quelante está realmente ocupada por ^{212}Pb durante y después del radiomarcaje.

Referencias

- 30 Jaggi JS, Kappel BJ, McDevitt MR, Sgouros G, Flombaum CD, Cabassa C, Scheinberg DA. Efforts to control the errant products of a targeted *in vivo* generator. *Cancer Res.* 1 de junio de 2005; 65(11):4888-95.
- 35 Jones SB, Tiffany U, Garmestani K, Gansow OA, Kozak RW. Evaluation of dithiol chelating agents as potential adjuvants for anti-IL-2 receptor lead or bismuth alpha radioimmunotherapy. *Nucl Med Biol.* Febrero de 1996; 23(2):105-13.
- 40 Nilsson S, Larsen RH, Fosså SD, Balteskard L, Borch KW, Westlin JE, Salberg G, Bruland OS. First clinical experience with alpha-emitting radium-223 in the treatment of skeletal metastases. *Clin Cancer Res.* 15 de junio de 2005; 11(12):4451-9.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Disolución radiofarmacéutica que comprende ^{224}Ra y un agente complejante que puede depurar al menos ^{212}Pb , para su uso como medicamento; en la que el agente complejante comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en agentes quelantes acíclicos, agentes quelantes cíclicos, criptandos, éteres corona, porfirinas o polifosfonatos cíclicos o no cíclicos, DOTMP, EDTMP, bisfosfonato, pamidronato conjugado con DOTA o TCMC.
- 10 2. Disolución radiofarmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la disolución se encuentra en un volumen de 100 μl a 10 ml y la radioactividad es de 100 kBq a 100 MBq.
- 15 3. Disolución radiofarmacéutica para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que ^{212}Pb está complejado mediante EDTMP osteófilo.
- 20 4. Disolución radiofarmacéutica para su uso según las reivindicaciones 1-3, en la que el agente complejante está conjugado con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, una vitamina, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína sintética y un péptido.
- 25 5. Disolución radiofarmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el agente complejante es el agente quelante TCMC conjugado con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una vitamina, una proteína sintética y un péptido.
- 30 6. Disolución radiofarmacéutica que comprende ^{224}Ra y un agente complejante que puede depurar al menos ^{212}Pb para su uso en el tratamiento de enfermedades óseas; en la que el agente complejante comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en agentes quelantes acíclicos, agentes quelantes cíclicos, criptandos, éteres corona, porfirinas o polifosfonatos cíclicos o no cíclicos, DOTMP, EDTMP, bisfosfonato, pamidronato conjugado con DOTA o TCMC.
- 35 7. Disolución radiofarmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que la enfermedad ósea se selecciona del grupo que consiste en metástasis óseas de cánceres de mama, próstata, riñones, pulmones, huesos, o mieloma múltiple, o enfermedades no cancerosas que provocan calcificación no deseada incluyendo espondilitis anquilosante.
- 40 8. Disolución radiofarmacéutica que comprende ^{224}Ra y un agente complejante que puede depurar al menos ^{212}Pb , en la que dicho agente complejante es EDTMP.
- 45 9. Disolución radiofarmacéutica que comprende ^{224}Ra y un agente complejante que puede depurar al menos ^{212}Pb , en la que el agente complejante es:
- el agente quelante TCMC conjugado con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una vitamina, una proteína sintética y un péptido;
 - o
 - DOTA, DTPA y DOTA unido a carboxilo.
10. Método para producir una disolución radiofarmacéutica según la reivindicación 1, comprendiendo el método añadir un anticuerpo conjugado con agente quelante a la disolución de ^{224}Ra de 30 min a 1 hora antes de la inyección o 1 de min a 20 min antes de la inyección, o de 1 min a 10 min antes de la inyección.

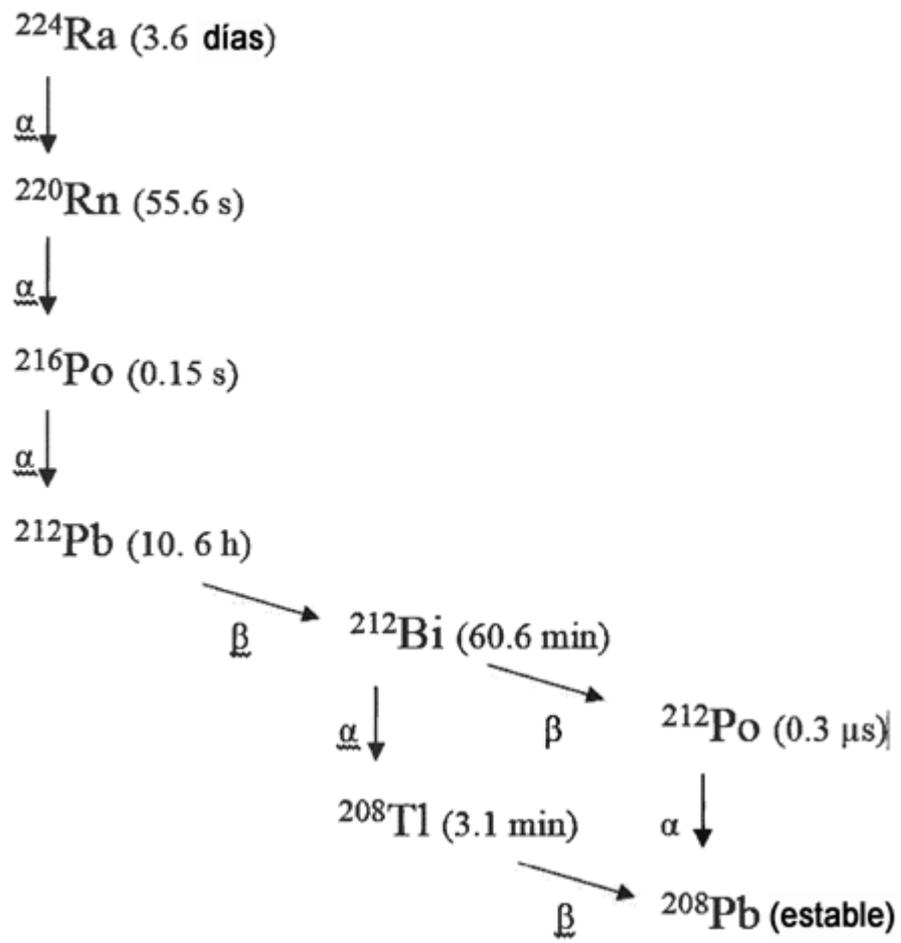


Fig. 1

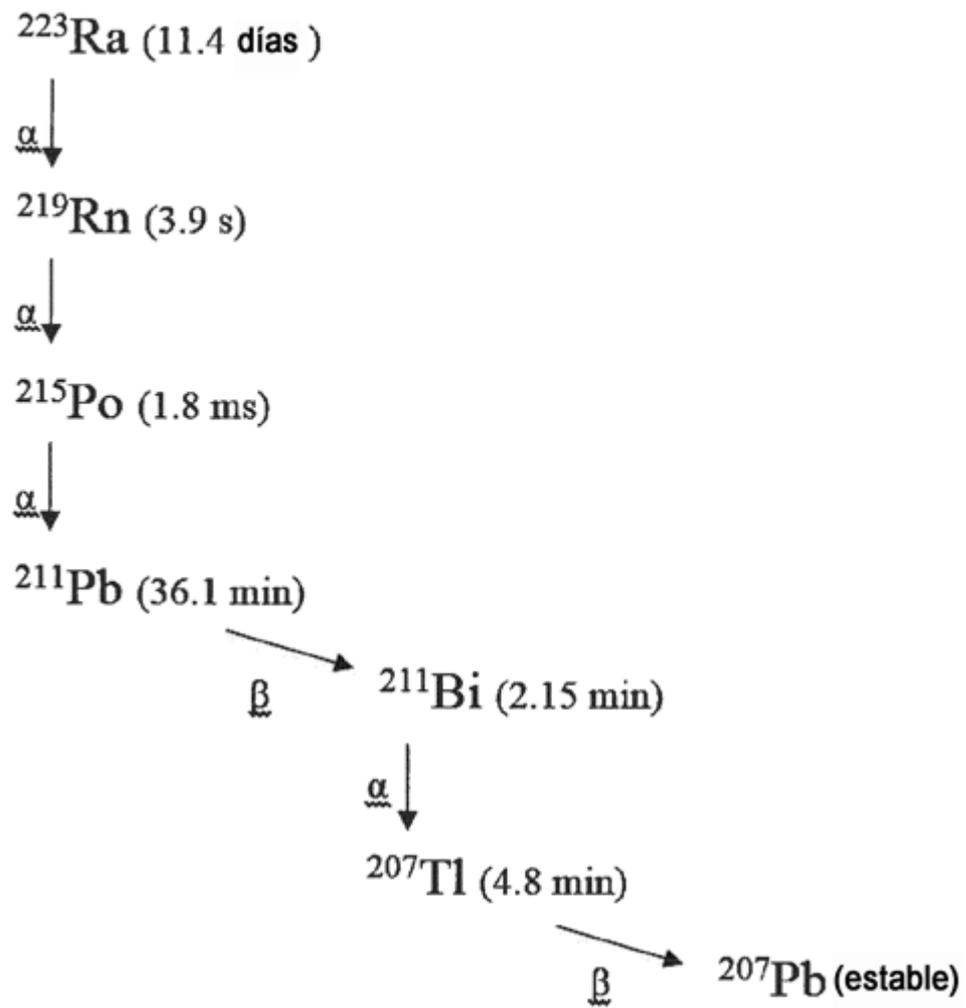


Fig. 2

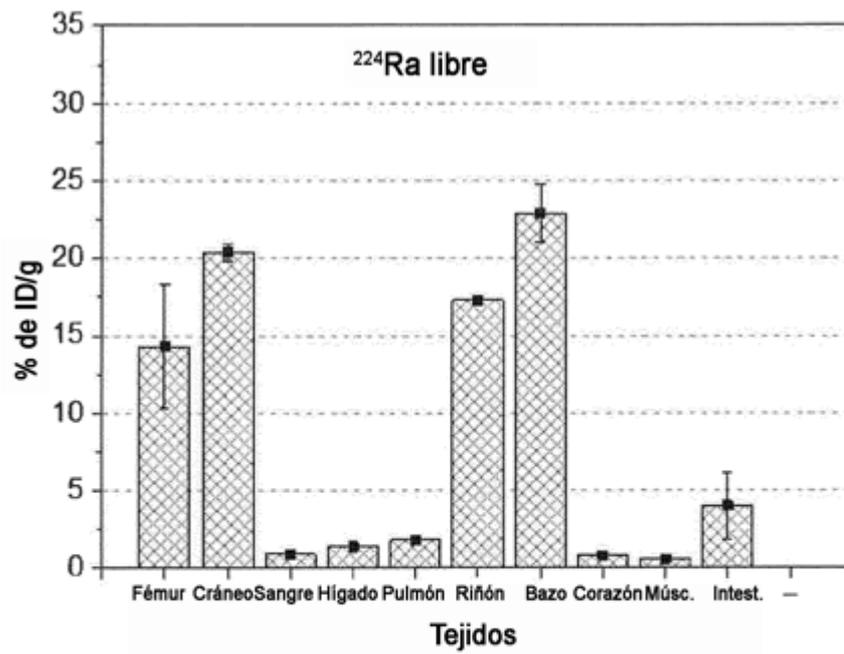
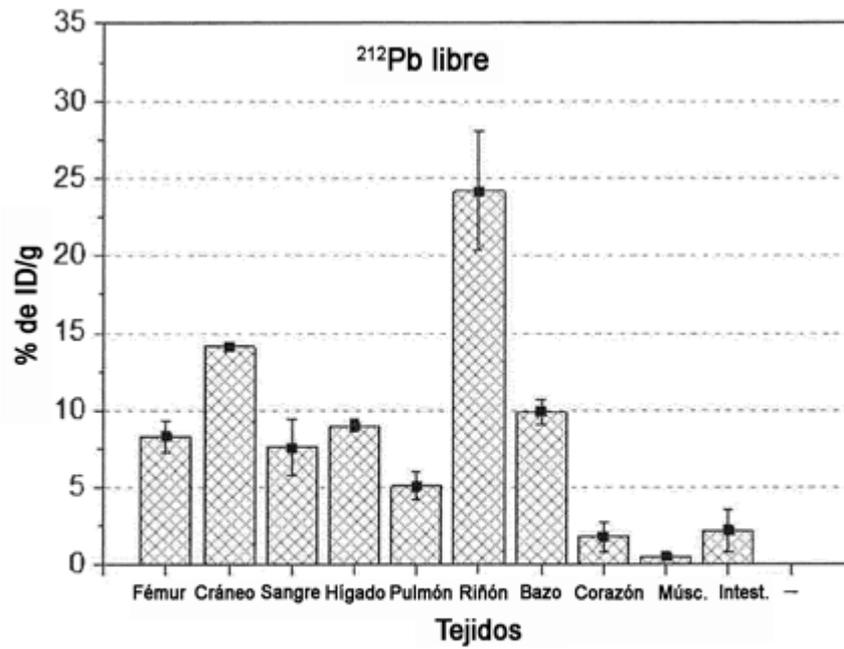


Fig. 3A

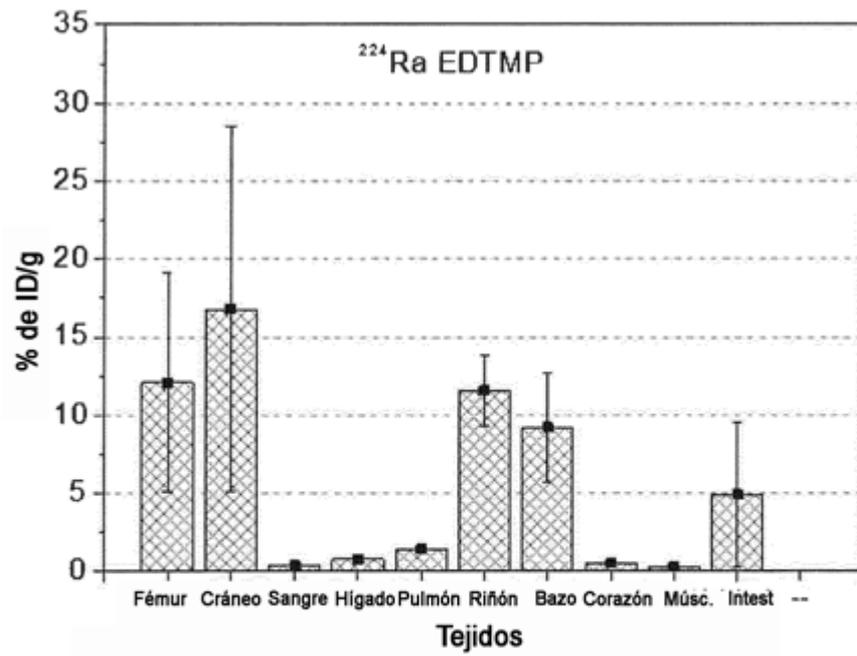
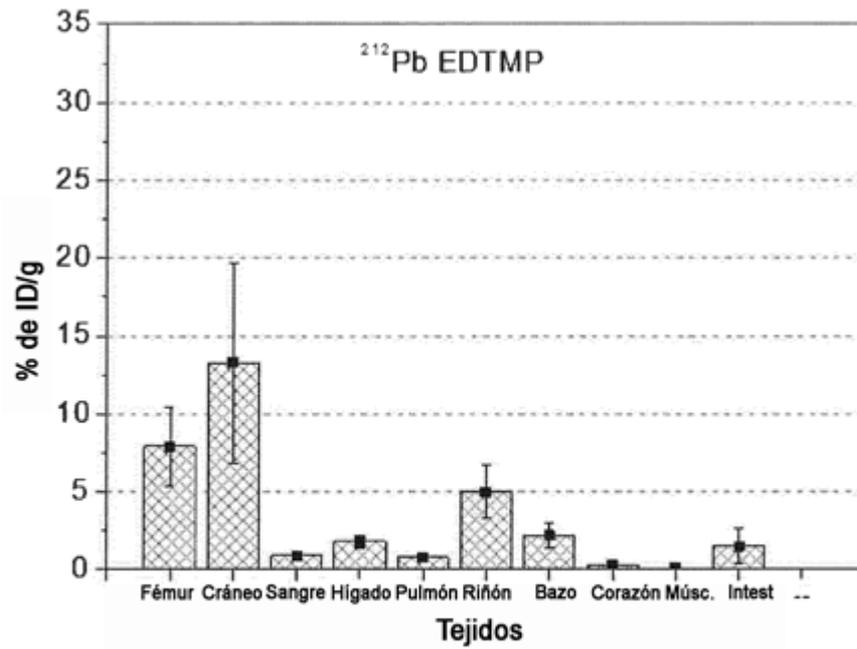


Fig. 3B

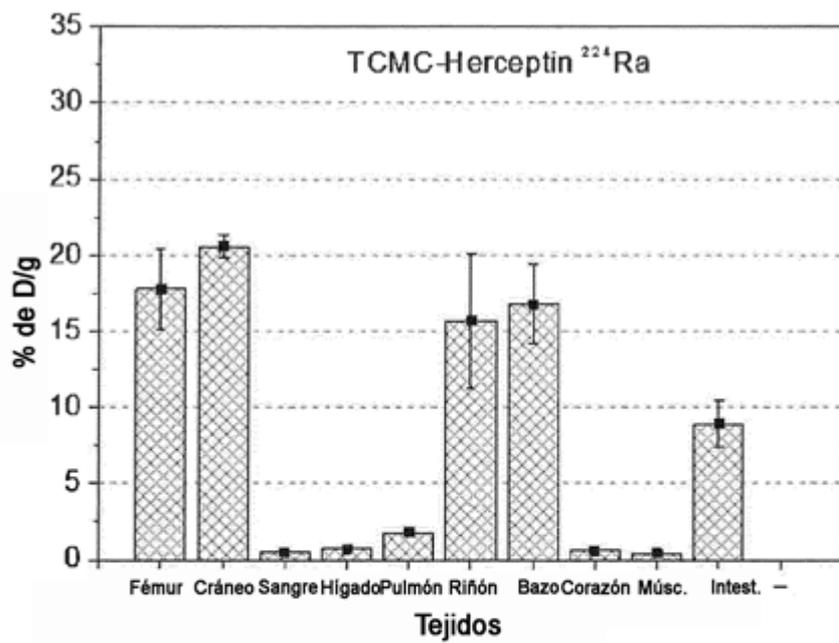
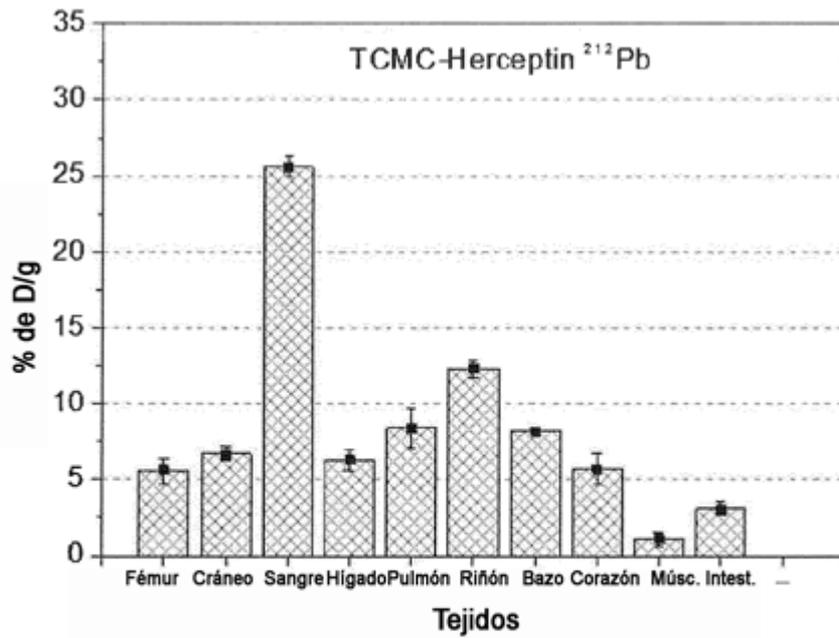


Fig. 3C

Radionucleido (semivida)	Alfas y betas (energía media en MeV)	Rayos X y gamma Energía y % de abundancia
²²⁴ Ra (3.6 días)	α 5.6	241 <u>keV</u> , 4.1%
²²⁰ Rn (55.6 s)	α 6.3	
²¹⁶ Po (145 ms)	α 6.8	
²¹² Pb (10.6 h)	β 0.1	75 <u>keV</u> , 10.3% 77 <u>keV</u> , 17.1% 87 <u>keV</u> , 6.0% 90 <u>keV</u> , 1.5% 239 <u>keV</u> , 43.6% 300 <u>keV</u> , 3.3%
²¹² Bi (10.6 h)	α 6.1×0.36 (2.2 MeV efectiva ¹) β 0.7×0.64 (0.4 MeV efectiva)	727 <u>keV</u> , 6.7% (4.3% efectiva)
²¹² Po (299 ns) (64% de ramificación)	α 8.8 (5.6 efectiva)	
²⁰⁸ Tl (3.1 min) (36% de ramificación)	β 0.6 (0.2 MeV efectiva)	75 <u>keV</u> , 3.4% (1.2% efectiva) 511 <u>keV</u> , 22.6% (8.1% efectiva) 583 <u>keV</u> , 85.0% (30.6% efectiva) 860 <u>keV</u> , 12.5% (4.5% efectiva) 2615 <u>keV</u> , 99.8% (35.9% efectiva)

Fig. 4

Punto de tiempo	0 h	2 h	6 h	12 h	24 h	36 h	2 días	3 días	1 semana
²²⁴ Ra (MBq)	10	9.8	9.5	9.1	8.3	7.5	6.8	5.7	2.7
²¹² Pb (MBq)	0	1.2	3.1	5.1	7.0	7.5	7.3	6.3	3.0
Razón de actividad de ²¹²Pb frente a ²²⁴Ra	0	0.12	0.33	0.56	0.84	1.0	1.1	1.1	1.1

Fig. 5

Muestra aplicada	^{224}Ra	$^{224}\text{Ra} + \text{FB}$	$^{224}\text{Ra} + \text{EDTMP}$	$^{224}\text{Ra} + \text{DOTMP}$	$^{224}\text{Ra} + \text{DOTMP} + \text{FB}$
Mitad superior de tira de CCF		> 97% de ^{212}Pb	> 95% de ^{212}Pb		
Mitad inferior de tira de CCF	> 97% de ^{212}Pb			>97% de ^{212}Pb	> 77% de ^{212}Pb

Fig. 6A

Muestra aplicada	^{224}Ra + TCMC-AcM + FB	^{224}Ra + TCMC-AcM + EDTMP	^{224}Ra + DOTA-AcM + FB
Mitad superior de tira de CCF			
Mitad inferior de tira de CCF	> 92% de ^{212}Pb	> 92% de ^{212}Pb	> 94% de ^{212}Pb

Fig. 6B

	Hueso frente a sangre	Hueso frente a riñón
^{212}Pb no complejoado	1.1	0.36
^{212}Pb -EDTMP	9.5	1.57
^{212}Pb -TCMC-Herceptin	0.22	0.46

Fig. 7