

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 184**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2012 PCT/EP2012/076196**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13092742**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12806053 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2795317**

54 Título: **Composición para su uso en un método para la selección de cánceres**

30 Prioridad:

20.12.2011 GB 201121914

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

17.07.2018

73 Titular/es:

GE HEALTHCARE LIMITED (100.0%)

Amersham Place

Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, GB

72 Inventor/es:

DALSGAARD, GRETHE, TANG y

WILSON, IAN, ANDREW

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 676 184 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

Composición para su uso en un método para la selección de cánceres

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la selección de pacientes de cáncer adecuados para tratamiento con terapias dirigidas a c-Met. La invención emplea agentes de imagenología que comprenden péptidos de unión a c-Met radiomarcados con ^{18}F adecuados para imagenología por tomografía de emisión de positrones (PET) *in vivo*.

Antecedentes de la invención

10 El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor de dispersión (SF), es un factor de crecimiento que está implicado en diversos procesos fisiológicos tales como curación de heridas y angiogénesis. La interacción de alta afinidad de HGF con su receptor (c-Met) está implicada en el crecimiento, invasión y metástasis tumorales.

Knudsen *et al.* han revisado el papel de HGF y c-Met en cáncer de próstata, con posibles implicaciones para imagenología y terapia [Adv. Cancer Res., 91, 31-67 (2004)]. Se describen anticuerpos anti-Met marcados para diagnóstico y terapia en los documentos WO 03/057155, EP 2127683 A1 y WO 2011/110642.

15 Se ha mostrado que c-Met está implicado en el crecimiento, invasión y metástasis tumorales en muchos cánceres humanos de origen epitelial. c-Met se expresa por la mayoría de carcinomas y su elevada expresión respecto al tejido normal se ha detectado en cánceres de: pulmón, mama, colorrectal, pancreático, de cabeza y cuello, gástrico, hepatocelular, de ovario, renal, glioma, melanoma y una serie de sarcomas. En carcinoma colorrectal (CCR), se ha detectado la sobreexpresión de c-Met en focos de cripta aberrantes displásicos, las lesiones preneoplásicas más
20 tempranas de la enfermedad. En el carcinoma espinocelular de cabeza y cuello, se ha informado que c-Met se expresa o sobreexpresa en aproximadamente un 80 % de los tumores primarios. En la metástasis de cáncer de próstata a hueso, se ha informado que c-Met se sobreexpresa en más del 80 % de las metástasis óseas.

25 En condiciones normales, c-Met se expresa en células epiteliales y se activa de forma paracrina por HGF derivado mesenquimáticamente. La activación de c-Met en células normales es un evento transitorio y está estrechamente regulado. En células tumorales, sin embargo, c-Met puede ser constitutivamente activo. En el cáncer, la estimulación de c-Met aberrante puede conseguirse mediante amplificación/sobreexpresión de c-Met, activación de mutaciones de c-Met (p.ej., alteraciones estructurales) y adquisición del control del crecimiento autónomo mediante la creación de bucles de señalización autocrinos. Además, una regulación negativa defectiva del receptor c-Met contribuirá también a la expresión aberrante de c-Met en la membrana celular. Aunque la sobreexpresión de c-Met es dependiente de
30 HGF (autocrina/paracrina), las alteraciones estructurales causadas por las mutaciones son independientes de HGF (p.ej., pérdida del dominio extracelular).

35 El documento WO 2004/078778 divulga polipéptidos o constructos peptídicos multiméricos que se unen a c-Met o a un complejo que comprende c-Met y HGF. Se describen aproximadamente 10 clases estructurales diferentes de péptido. El documento WO 2004/078778 divulga que los péptidos pueden marcarse con un marcaje detectable para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, o con un fármaco para aplicaciones terapéuticas. El marcaje detectable puede ser: una enzima, un compuesto fluorescente, un tinte óptico, un ion metálico paramagnético, un agente de contraste de ultrasonidos o un radionucleido. Se afirma que los marcajes preferidos del documento WO 2004/078778 son radiactivos o paramagnéticos, y lo más preferiblemente comprenden un metal que está quelado por un quelante metálico. El documento WO 2004/078778 afirma que los radionucleidos del mismo pueden seleccionarse de ^{18}F , ^{124}I ,
40 ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{77}Br , ^{76}Br , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{51}Cr , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{47}Sc , ^{167}Tm , ^{141}Ce , ^{111}In , ^{168}Yb , ^{175}Yb , ^{140}La , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{165}Dy , ^{166}Dy , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{186}Re , ^{203}Pb , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{214}Bi , ^{105}Rh , ^{109}Pd , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{198}Au y ^{199}Au . El documento WO 2004/078778 afirma (página 62) que los radionucleidos preferidos con fines de diagnóstico son: ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{111}In , prefiriéndose particularmente $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

45 El documento WO 2008/139207 divulga péptidos cíclicos de unión a c-Met de 17 a 30 aminoácidos que están marcados con un resto de imagenología indicador óptico adecuado para imagenología del cuerpo mamífero *in vivo* usando luz de verde a infrarrojo cercano de longitud de onda 600-1200 nm. Los péptidos de unión a c-Met comprenden la secuencia aminoacídica:

Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶;

en la que X¹ es Asn, His o Tyr;

50 X² es Gly, Ser, Thr o Asn;

X³ es Thr o Arg;

X⁴ es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X⁵ es Ser o Thr;

X⁶ es Asp o Glu;

y Cys^{a-d} son cada uno residuos de cisteína tales que los residuos a y b, así como c y d, se ciclan formando dos enlaces disulfuro separados. El indicador óptico del documento WO 2008/139207 es preferiblemente un tinte de cianina.

El documento WO 2009/016180 divulga péptidos cíclicos de unión a c-Met análogos a los del documento WO 2008/139207, en los que el indicador óptico es un tinte de benzopirilio. Se afirma que los agentes de los documentos
5 WO 2008/139207 y WO 2009/016180 son útiles para aplicaciones ópticas *in vitro* e *in vivo*, especialmente imagenología óptica *in vivo* del cuerpo humano. La imagenología óptica de cáncer colorrectal es una aplicación preferida.

El documento WO 2011/020925 divulga anticuerpos anti-c-Met y usos de los mismos. El documento WO 2011/020925 divulga que los anticuerpos pueden usarse para ayudar a determinar la susceptibilidad de un paciente al tratamiento
10 con anticuerpos anti-c-Met. El método implica el uso de un método *in vitro* (análisis inmunohistoquímico de una muestra tumoral) para determinar el estado de c-Met de un tumor. Este método, sin embargo, sigue basándose en la biopsia, con las desventajas descritas anteriormente.

Merchant *et al* [2011 ASCO Meeting; J. Clin. Oncol., resumen 10632, Supl. (2011)] divulgan un anticuerpo anti-c-Met (MetMab™) marcado con ⁷⁶Br o ⁸⁹Zr para imagenología molecular de c-Met en xenoinjertos de ratón. Se reseñó que
15 los agentes exhibían una rápida captación tumoral y una lenta aclaración.

Están en desarrollo agentes quimioterapéuticos farmacológicos dirigidos a c-Met ("terapias anti-Met") por una serie de organizaciones. Se espera que tales agentes se usen típicamente en enfermedad metastásica. Sin embargo, los resultados clínicos hasta la fecha sugieren que el pronóstico del paciente depende del conocimiento del estado de c-Met del tumor. También es posible que el estado de c-Met pueda ser predictivo de la respuesta a terapias anti-c-Met.
20 Actualmente, el estado de c-Met puede determinarse por análisis inmunohistoquímico (IHC) de una muestra de biopsia tomada del paciente, pero la biopsia es invasiva (suponiendo cierto riesgo para el paciente) y puede no dar como resultado una muestra representativa. Por tanto, existe un riesgo inherente de error de muestreo cuando se recoge principalmente tejido sano o, debido a la heterogeneidad tumoral, se toma una sección del tumor que no es representativa del perfil molecular de la parte más activa del tumor [N. Engl. J. Med., 366(10); 883-892 (2012)].
25 Además, la biopsia proporciona información solo sobre la muestra del tumor, no sobre el tumor del paciente y la carga metastásica tumoral en conjunto. Puesto que se espera que la terapia anti-Met sea usada como terapia de segunda o tercera línea, puede no estar disponible material de biopsia de calidad satisfactoria representativo del tumor no tratado, o podría no ser ya potencialmente representativo del perfil molecular del tumor. Generalmente, no se lleva a cabo un remuestreo por biopsia, ya que supone cierto riesgo de morbilidad, así como debido a los problemas descritos anteriormente.
30

En un estudio recientemente publicado [Cancer Discovery, 1(1); 44-53 (2011)], se exploró el valor de obtener nuevas biopsias en pacientes de CPNM pretratados con enfermedad avanzada (n= 139) y utilizando análisis de biomarcador instantáneos para la selección de tratamiento. Se encontró que asignar pacientes al tratamiento basándose en el perfil molecular aumentaba la probabilidad de un resultado clínico de tratamiento positivo. Aunque se informaba que el procedimiento de biopsia era bien tolerado en el ensayo, ocurrió neumotórax en un 11,5 % de los pacientes, conduciendo a la conclusión de que aunque volver a biopsiar los pacientes para la estratificación de tratamiento basada en biomarcadores es ventajosa, tiene riesgos.
35

En un ensayo de fase II de MetMAB™, un anticuerpo monoclonal que bloquea c-Met (Roche) [2011 ASCO Annual Meeting y http://www.roche.com/media/media_releases/med-cor-2011-05-19.htm], se distribuyeron aleatoriamente
40 pacientes de CPNM a:

- (i) MetMAB + erlotinib (inhibidor de EGFR); o
- (ii) placebo + erlotinib.

Se determinó el estado de c-Met por análisis IHC y FISH de muestras de archivo (aproximadamente un 50 % eran positivas por IHC). En el grupo de pacientes en conjunto (concretamente que incluye pacientes con alta y baja expresión de c-Met), no había diferencias entre los dos tratamientos. Cuando se analizaron los datos, basándose en el análisis por IHC retrospectivo de las muestras de biopsia de archivo, la supervivencia global mediana era de 12,6 meses en el grupo de MetMAB frente a 3,8 meses en el grupo de erlotinib (p= 0,002). Además, los pacientes con baja expresión de c-Met tratados con MetMAB en combinación con erlotinib tenían un peor resultado clínico en comparación con erlotinib solo. La recogida anticipada de biopsias antes del tratamiento no estaba incluida en el ensayo, y es desconocido si la puntuación de c-Met basada en las muestras de archivo era totalmente representativa de la población de estudio.
45
50

Oliner *et al.* [J Clin Oncol 30, Supl., res. 4005 (2012)] publicaron recientemente datos de un estudio en fase 2 del anticuerpo de HGF, rilotumumab (Amgen), en combinación con epirrubina, cisplatino y capecitabina (ECX) en pacientes con cáncer gástrico o de unión esofagagástrica localmente avanzado o metastásico. Los pacientes con tumores ricos en c-Met (> 50 % de células tumorales positivas), tenían una supervivencia global mediana mejorada cuando se trataban con la terapia de combinación en comparación con los pacientes tratados con placebo y ECX. A la inversa, los pacientes con tumores pobres en c-Met (≤ 50 % positivas) tenían tendencia a una supervivencia global favorable cuando se trataban con la terapia de combinación, en comparación con aquellos tratados con placebo y ECX. En el grupo de placebo y ECX, los pacientes con tumores ricos en c-Met tenían peor supervivencia global que
55
60 los pacientes con tumores pobres en c-Met.

Existe por lo tanto la necesidad de un método menos invasivo de valoración del estado de c-Met del tumor y/o carga de metástasis tumoral de un paciente, para determinar si el paciente individual se beneficiaría de la terapia anti-Met.

La presente invención

5 La presente invención se refiere a un péptido cíclico de unión a c-Met para uso en un método de determinación del estado de c-Met de un tumor o tumores de pacientes, para auxiliar en el proceso de decisión antes del inicio de la terapia de c-Met en cánceres tales como CPNM, cáncer colorrectal (CCR) y cáncer gástrico. Para la terapia anti-Met, el médico de tratamiento tendría que conocer el estado de c-Met del paciente (tumor y metástasis) antes de iniciar la terapia complementaria con inhibidor de c-Met. Para un paciente recién diagnosticado, puede ser posible conseguir la respuesta del análisis molecular de la biopsia de diagnóstico, pero para pacientes donde ha fallado la terapia estándar, si está disponible alguna muestra de archivo, puede no ser totalmente representativa del estado actual de la enfermedad.

El método auxilia al médico al determinar cuándo un paciente individual se beneficiaría de terapia anti-Met. De forma importante, el método ayuda también a excluir de tal tratamiento los pacientes donde la terapia anti-Met sería ineficaz o tendría un efecto negativo.

15 El método supone mucho menos riesgo para el paciente que la biopsia, y tiene la ventaja de proporcionar un modo de valorar la carga de c-Met total para todos los tumores y metástasis, incluyendo p.ej. la expresión de sitios tumorales que son difíciles de biopsiar, o sitios de metástasis anteriormente desconocidos. Por lo tanto, da una imagen mucho más completa del paciente que el análisis de muestras de biopsia (suponiendo incluso que están disponibles tales muestras). Además, el método se presta a repetir la imagenología a diferentes intervalos temporales, de modo que pueda usarse para monitorizar la terapia anti-Met.

MetMab™ exhibe una semivida de eliminación combinada de 8-12 días, de modo que no tiene una farmacocinética ideal para imagenología *in vivo*, puesto que la aclaración desde el fondo sería extremadamente lenta. En contraposición, los agentes de la presente invención permiten la imagenología al cabo de 1 hora de administración al paciente.

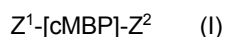
25 Se proporciona también un medio para monitorizar la terapia anti-Met. Se espera que este sea importante en la determinación de que una terapia dada se prueba exitosa para un paciente individual (y por ello merece la pena continuar) o no es eficaz, permitiendo un cambio más temprano a un tratamiento o medicación diferente.

Descripción detallada de la invención

30 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido cíclico de unión a c-Met para uso en un método para auxiliar en la determinación de si un paciente individual anteriormente diagnosticado con cáncer es susceptible de tratamiento con terapia anti-Met, comprendiendo dicho método:

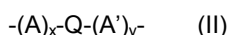
- (i) administración a dicho paciente individual de un agente de imagenología que comprende un péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con ¹⁸F;
- 35 (ii) imagenología usando tomografía de emisión de positrones (PET) en al menos un sitio de dicho cáncer con el agente de imagenología de la etapa (i);
- (iii) elaboración de una determinación a partir de la imagenología de la etapa (ii) de si hay una captación elevada de dicho agente de imagenología en dicho sitio o no;
- (iv) cuando la determinación de la etapa (iii) muestra una captación elevada, se considera que el cáncer sobreexpresa c-Met, y se determina que la terapia anti-Met es adecuada para dicho paciente;
- 40 (v) cuando la determinación de la etapa (iii) no muestra captación elevada, se considera que el cáncer no sobreexpresa c-Met, y se determina que la terapia anti-Met no es adecuada para dicho paciente;

en el que dicho péptido cíclico de unión a c-Met es un péptido cíclico de 18 a 30 unidades de fórmula I:



donde:

45 cMBP es de fórmula II



donde Q es la secuencia aminoacídica (SEQ-1):



en la que X¹ es Asn, His o Tyr;

50 X² es Gly, Ser, Thr o Asn;

X³ es Thr o Arg;

X⁴ es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X⁵ es Ser o Thr;

X⁶ es Asp o Glu;

y Cys^{a-d} son cada uno residuos de cisteína tales que los residuos a y b, así como c y d, se ciclan formando dos enlaces disulfuro separados;

- 5 A y A' son independientemente cualquier aminoácido distinto de Cys, con la condición de que al menos uno de A y A' está presente y sea Lys;

x e y son independientemente enteros de valor 0 a 13, y se eligen tales que $[x + y] = 1$ a 13;

Z¹ está enlazado con el extremo N de cMBP, y es H o M^{IG};

Z² está enlazado con el extremo C de cMBP y es OH, OB^C, o M^{IG},

- 10 donde B^C es un catión biocompatible;

cada M^{IG} es independientemente un grupo inhibidor del metabolismo, que es un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido cMBP;

- 15 en el que cMBP está marcado en el residuo Lys del grupo A o A' con ¹⁸F y en el que la terapia anti-Met funciona por la inhibición directa del receptor c-Met, la interferencia con la unión de HGF a c-Met o la inhibición de la actividad c-Met cinasa.

El término "c-Met" tiene su significado convencional, y hace referencia al receptor de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como MET. El HGF es también conocido como factor de dispersión (SF).

- 20 El término "paciente" hace referencia a un mamífero, preferiblemente el cuerpo mamífero intacto *in vivo*, y más preferiblemente a un sujeto humano. Se entiende por la frase "diagnosticado anteriormente con cáncer" que el paciente ya se ha diagnosticado positivamente con cáncer y preferiblemente la localización de al menos el sitio o sitios primarios de cáncer en ese paciente individual es conocida. El diagnóstico puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la materia. La frase incluye también lesiones precancerosas, donde el diagnóstico clínico es que la lesión se desarrollará hasta un cáncer y puede beneficiarse del tratamiento con terapia anti-Met.

- 25 Se entiende por la frase "susceptible de tratamiento" que el paciente individual padece una forma de cáncer en la que el tratamiento prolongará la esperanza de vida y/o reducirá el impacto de la afección cancerosa sobre el bienestar del paciente. La relación global de beneficio:riesgo de tomar la medicación para ese paciente individual es por tanto positiva (concretamente, beneficiosa).

- 30 Se entiende por el término "terapia anti-Met" quimioterapia en la que se suministra una medicación al paciente que comprende un agente que inhibe la señalización de HGF/c-Met mediante: inhibición directa del receptor (p.ej., un anticuerpo anti-c-Met); mediante inactivación de su ligando HGF (p.ej. AMG102, L2G7); mediante interferencia de la unión de HGF a c-Met (p.ej. NK4); o mediante inhibición de la actividad c-Met cinasa (p.ej. PHA-665752 y SU11274). La medicación puede administrarse mediante cualquier vía de administración adecuada. Como se usa en la presente memoria, el término "terapia anti-Met" excluye la radioterapia de rayo externo. Se describen a continuación tales terapias preferidas.

- 35 Se entiende por el término "agente de imagenología" un compuesto adecuado para imagenología *in vivo* del cuerpo mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un cuerpo mamífero intacto *in vivo*, y más preferiblemente es un sujeto humano. Preferiblemente, el agente de imagenología puede administrarse al cuerpo mamífero de manera mínimamente invasiva, concretamente sin un riesgo sanitario sustancial para el sujeto mamífero cuando se lleva a cabo con experiencia médica profesional. Tal administración mínimamente invasiva es preferiblemente administración intravenosa en una vena periférica de dicho sujeto, sin necesidad de anestésico local o general. El término "imagenología *in vivo*" como se usa en la presente memoria hace referencia a aquellas técnicas que producen de forma no invasiva imágenes de todo o parte de un aspecto interno de un sujeto mamífero.

- 40 Se entiende por el término "captación elevada" que la relación de diana:fondo para la señal del agente de imagenología tomada en la región de interés del cáncer respecto a tal señal en el fondo de tejido adyacente sea positiva. Es tal relación mínima de 1,1:1 con respecto a la relación de tumor:músculo o tumor:sangre.

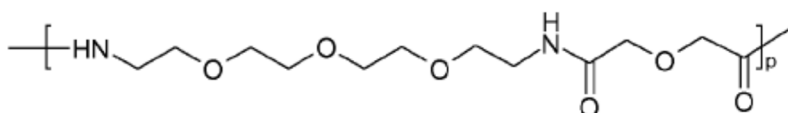
- 45 Se entiende por el término "péptido cíclico de unión a c-Met" un péptido que se une al receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, también conocido como c-Met (o simplemente MET). Son tales péptidos adecuados de la presente invención los péptidos cíclicos de 18 a 30 aminoácidos de fórmula I. Tales péptidos tienen una K_D aparente por c-Met de menos de aproximadamente 20 nM. La secuencia de cMBP de dichos péptidos comprende residuos de prolina, y es conocido que tales residuos pueden exhibir isomerización *cis/trans* del enlace amida del esqueleto. Los péptidos cMBP de la presente invención incluyen cualquiera de tales isómeros.

- 50 El grupo Z¹ sustituye al grupo amina del último residuo aminoacídico de cMBP, concretamente el extremo amino. Por tanto, cuando Z¹ es H, el extremo amino de cMBP termina en un grupo NH₂ libre del último residuo aminoacídico. El grupo Z² sustituye al grupo carbonilo del último residuo aminoacídico de cMBP, concretamente el extremo carboxi. Por tanto, cuando Z² es OH, el extremo carboxi de cMBP termina en el grupo CO₂H libre del último residuo

aminoacídico, y cuando Z^2 es OB^c , ese grupo carboxilo terminal está ionizado como un grupo CO_2B^c .

Se entiende por el término "catión biocompatible" (B^c) un contraión cargado positivamente que forma una sal con un grupo ionizado cargado negativamente, donde dicho contraión cargado positivamente es también no tóxico y por ello adecuado para administración al cuerpo mamífero, especialmente el cuerpo humano. Los ejemplos de cationes biocompatibles adecuados incluyen: los metales alcalinos sodio o potasio; los metales alcalinotérreos calcio y magnesio y el ion amonio. Son cationes biocompatibles preferidos sodio y potasio, lo más preferiblemente sodio.

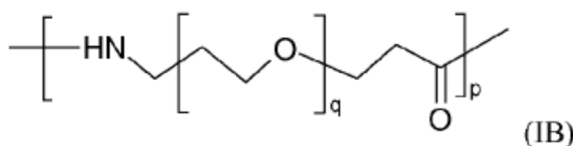
Se entiende por el término "grupo inhibidor del metabolismo (M^G)" un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido cMBP en cualquiera del extremo amino (Z^1) o extremo carboxi (Z^2). Tales grupos son bien conocidos por los especialistas en la materia y se eligen adecuadamente, para el extremo amino peptídico: de grupos N-acilados $-NH(C=O)R^G$, donde el grupo acilo $-(C=O)R^G$ tiene R^G elegido de grupos alquilo C_{1-6} o arilo C_{3-10} o comprende un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG). Para el extremo carboxi peptídico: carboxamida, éster *terc*-butílico, éster bencílico, éster ciclohexílico, aminoalcohol o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG). Son tales grupos PEG preferidos los biomodificadores de fórmula IA o IB:



(IA)

ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de fórmula IA

en la que p es un entero de 1 a 10. Como alternativa, puede usarse una estructura de tipo PEG basada en un derivado de ácido propiónico de fórmula IB:



(IB)

donde p es como se define para la fórmula IA y

q es un entero de 3 a 15.

En la fórmula IB, p es preferiblemente 1 o 2, y q es preferiblemente 5 a 12.

Son tales grupos M^G de extremo amino preferidos acetilo, benciloxycarbonilo o trifluoroacetilo, lo más preferiblemente acetilo.

Se entiende por el término "radiomarcado con ^{18}F " que el péptido cíclico de unión a c-Met tiene conjugado covalentemente con el mismo el radioisótopo ^{18}F . El ^{18}F está adecuadamente enlazado a través de un enlace C-F de fluoroalquilo o fluoroarilo, puesto que tales enlaces son relativamente estables *in vivo*, y por ello confieren resistencia a la escisión metabólica del radiomarcaje ^{18}F del péptido cMBP. El ^{18}F está preferiblemente enlazado a través de un enlace C-F de fluoroarilo. El ^{18}F puede estar enlazado directamente con uno de los aminoácidos de cMBP, pero está preferiblemente conjugado como parte de un sustituyente radiofluorado en cMBP. Dichos sustituyentes son preferiblemente de fórmula:



donde:

L es un grupo ligador sintético de fórmula $-(A)_m-$ en la que cada A es independientemente $-CR_2-$, $-CR=CR-$, $-C\equiv C-$, $-CR_2CO_2-$, $-CO_2CR_2-$, $-NR(C=O)-$, $-(C=O)NR-$, $-NR(C=O)NR-$, $-NR(C=S)NR-$, $-SO_2NR-$, $-NRSO_2-$, $-CR_2OCR_2-$, $-CR_2SCR_2-$, $-CR_2NR_2-$, $-CR_2O-N=$, $-CR_2O-NR-$, $-CR_2O-NH(CO)-$, un grupo cicloheteroalquileo C_{4-8} , un grupo cicloalquileo C_{4-8} , un grupo arileno C_{5-12} o un grupo heteroarileno C_{3-12} , un aminoácido, un azúcar o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG) monodispersado;

cada R se elige independientemente de H, alquilo C_{1-4} , alqueno C_{2-4} , alquino C_{2-4} , alcoxilquilo C_{1-4} o hidroxialquilo C_{1-4} ;

m es un entero de valor 1 a 20;

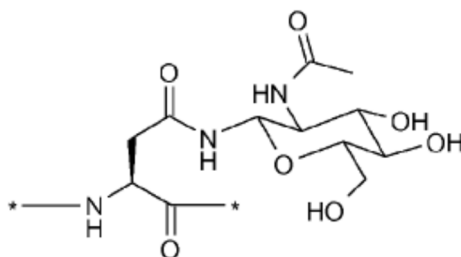
n es un entero de valor 0 o 1.

Se entiende por el término "aminoácido" un L- o D-aminoácido, análogo aminoacídico (p.ej., naftilalanina) o mimético de aminoácido que puede ser de origen natural o de origen puramente sintético, y puede ser ópticamente puro,

concretamente un solo enantiómero y por ello quiral, o una mezcla de enantiómeros. Se usan en la presente memoria las abreviaturas de tres letras o una letra convencionales para aminoácidos. Preferiblemente, los aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros. Se entiende por el término “mimético de aminoácido” análogos sintéticos de aminoácidos de origen natural que son isoésteres, concretamente se han diseñado para imitar la estructura estérica y electrónica del compuesto natural. Tales isoésteres son bien conocidos por los especialistas en la materia e incluyen, pero sin limitación, depsipéptidos, retroinversopéptidos, tioamidas, cicloalcanos o tetrazoles 1,5-disustituidos [véase M. Goodman, *Biopolymers*, 24, 137, (1985)].

Se entiende por el término “péptido” un compuesto que comprende dos o más aminoácidos, como se definen anteriormente, ligados por un enlace peptídico (concretamente, un enlace amida que liga la amina de un aminoácido con el carboxilo de otro).

Se entiende por el término “azúcar” un monosacárido, disacárido o trisacárido. Los azúcares adecuados incluyen:



glucosa, galactosa, maltosa, manosa y lactosa. Opcionalmente, el azúcar puede estar funcionalizado para permitir un fácil acoplamiento con aminoácidos. Por tanto, p.ej. un derivado de glucosamina de un aminoácido puede conjugarse con otros aminoácidos a través de enlaces peptídicos. El derivado de glucosamina de la asparagina (comercialmente disponible en NovaBiochem) es un ejemplo de esto:

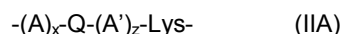
Cuando A y A' son “cualquier aminoácido distinto de Cys”, eso significa que el aminoácido adicional de los grupos A y A' carece de grupos tiol libres, en particular de residuos de Cys. Esto es debido a que un residuo de Cys adicional pondría en riesgo la redistribución de puentes disulfuro con los puentes disulfuro Cys^a-Cys^b y Cys^c-Cys^d de la secuencia Q, con la pérdida o reducción consiguiente de la afinidad de unión a c-Met.

Rasgos preferidos

En el método del primer aspecto, el cáncer es preferiblemente carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de mama, melanoma, glioma o sarcoma u otros cánceres de origen epitelial. El tumor del cáncer es preferiblemente un tumor sólido. Más preferiblemente, el cáncer es CPNM, cáncer colorrectal o cáncer gástrico. Lo más preferiblemente, el cáncer es CPNM.

Los péptidos cMBP preferidos de la presente invención tiene una K_D para unión de c-Met al complejo cMet/HGF de menos de aproximadamente 10 nM (basada en medidas del ensayo de polarización de fluorescencia), lo más preferiblemente en el intervalo de 1 a 5 nM, siendo menos de 3 nM lo ideal.

El péptido cMBP de fórmulas I y II es preferiblemente de fórmula IIA:



en la que A es como se define para la fórmula II,

z es un entero de valor 0 a 12 y [x + z]= 0 a 12,

y cMBP comprende solo un residuo de Lys.

Por tanto, en la fórmula IIA, el único residuo de Lys está localizado específicamente en el extremo C del cBP. Eso a su vez significa que el radiomarcaje ¹⁸F está preferiblemente localizado en posición C-terminal.

Q comprende preferiblemente la secuencia aminoacídica de SEQ-2 o SEQ-3:

Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶ (SEQ-2);

Ala-Gly-Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-Gly-Thr (SEQ-3).

En las SEQ-1, SEQ-2 y SEQ-3, X³ es preferiblemente Arg. En la fórmula I y la fórmula II, los grupos (A)_x o -(A')_y comprenden preferiblemente un péptido ligador que se elige de:

-Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4),

-Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5) o

-Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6).

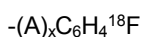
El péptido cMBP del primer aspecto tiene preferiblemente la secuencia aminoacídica (SEQ-7):

Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Lys.

5 Los agentes de imagenología preferidos de la presente invención tienen ambos extremos del péptido cMBP protegidos por grupos M^G, concretamente preferiblemente ambos Z¹ y Z² son M^G, que habitualmente serán diferentes. Tener ambos extremos peptídicos protegidos de este modo es importante para aplicaciones de imagenología *in vivo*, puesto que de otro modo se esperaría un metabolismo rápido con la pérdida consiguiente de afinidad de unión selectiva por c-Met. Cuando ambos Z¹ y Z² son M^G, preferiblemente Z¹ es acetilo y Z² es una amida primaria. Lo más
10 preferiblemente, Z¹ es acetilo y Z² es una amida primaria y el resto ¹⁸F está enlazado con la cadena lateral épsilon-amina de un residuo de lisina de cMBP.

El sustituyente radiofluorado -(L)_n-¹⁸F puede estar enlazado con el grupo alfa-amino del extremo N del péptido de unión a c-Met, o como alternativa, a la cadena lateral amino de cualquier aminoácido aminosustituido (p.ej., residuos de Lys). Adecuadamente, está enlazado con el grupo amina épsilon (ε) del residuo de Lys de cMBP.

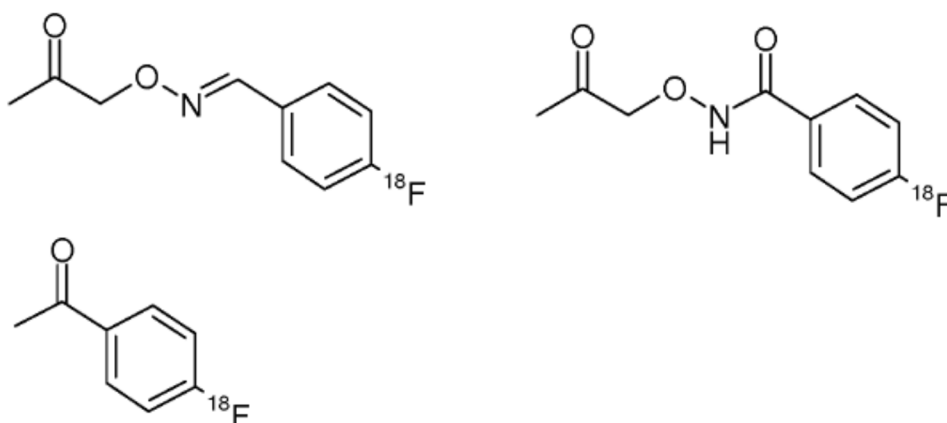
15 Los sustituyentes radiofluorados ejemplares -(L)_n-¹⁸F tienen n= 1, concretamente está presente un grupo ligador sintético como se define anteriormente. Más particularmente, tales sustituyentes comprenden el radiomarcaje ¹⁸F unido a un grupo fenilo, concretamente el sustituyente es de fórmula:



donde: A es como se define anteriormente,

x es un entero de valor 0 a 5.

20 Tales sustituyentes pueden surgir de la N-acilación del residuo amina de Lys con un éster activo fluorado, o la condensación de un derivado aminoxi del residuo amina de Lys con un benzaldehído fluorado, y son de fórmula:



El agente de imagenología del primer aspecto se proporciona preferiblemente como una composición de agente de imagenología que comprende:

- 25 (i) el péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con ¹⁸F como se define en el primer aspecto;
(ii) un péptido cíclico de unión a c-Met no marcado;

en la que dicho péptido cíclico de unión a c-Met tiene la misma secuencia aminoacídica en (i) y en (ii),

y en la que el péptido cMBP no marcado está presente en dicha composición a no más de 50 veces la cantidad molar de dicho péptido cMBP marcado con ¹⁸F.

30 Las realizaciones preferidas del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con ¹⁸F en la composición son como se describen anteriormente. El término "composición" tiene su significado convencional, concretamente una mezcla de los componentes especificados. La composición puede estar en forma sólida o líquida/disolución.

35 Se entiende por el término "no marcado" que el péptido cíclico de unión a c-Met es no radiactivo, concretamente no está radiomarcado con ¹⁸F o ningún otro radioisótopo. Pueden estar presentes uno o más de tales péptidos en la composición, y tales péptidos no marcados incluyen principalmente los precursores no radiactivos del cuarto aspecto (a continuación). El término "no marcado" excluye el péptido cíclico de unión a c-Met marcado con ¹⁹F, donde ¹⁹F está presente en el ¹⁸F-fluoruro usado para radiomarcarse dicho péptido cíclico de unión a c-Met y es por tanto un producto de la misma reacción de radiomarcaje. Como es conocido en la materia, si dos compuestos sustituidos con flúor difieren solo en los isótopos del átomo de flúor, se comportarían químicamente de manera casi idéntica, y por ello su
40 separación sería extremadamente difícil. El péptido cíclico de unión a c-Met no marcado o precursor tiene preferiblemente los grupos Z¹ y/o Z² ya enlazados.

Típicamente, el péptido cíclico de unión a c-Met no marcado está presente en dicha composición hasta 30, p.ej. hasta 20, o como alternativa menos de 10 veces la cantidad molar del correspondiente péptido marcado con ^{18}F . La composición puede estar en forma de disolución, en la que los componentes (i) y (ii) están ambos presentes en disolución. La disolución puede ser un disolvente biocompatible, o mezcla de dos o más de tales disolventes. Se describen a continuación tales disolventes biocompatibles ejemplares, y pueden comprender un disolvente acuoso.

El agente de imagenología del primer aspecto puede proporcionarse como una composición farmacéutica que comprende dicho agente de imagenología junto con un portador biocompatible, en una forma estéril adecuada para administración a mamífero. El "portador biocompatible" es un fluido, especialmente un líquido, donde el agente de imagenología puede suspenderse o preferiblemente disolverse, de tal modo que la composición sea fisiológicamente tolerable, concretamente pueda administrarse al cuerpo mamífero sin toxicidad o incomodidad indebidas. El portador biocompatible es adecuadamente un líquido portador inyectable tal como agua estéril, libre de pirógenos para inyección; una disolución acuosa tal como solución salina (que puede equilibrarse ventajosamente de modo que el producto final para inyección sea isotónico); una disolución tampón acuosa que comprende un agente de tamponación biocompatible (p.ej. tampón fosfato); una disolución acuosa de una o más sustancias de ajuste de la tonicidad (p.ej., sales de cationes plasmáticos con contraiones biocompatibles), azúcares (p.ej., glucosa o sacarosa), alcoholes de azúcar (p.ej., sorbitol o manitol), glicoles (p.ej. glicerol) u otros materiales de poliol no iónicos (p.ej., polietilenglicoles, propilenglicoles y similares). Adecuadamente, el portador biocompatible es agua libre de pirógenos para inyección, solución salina isotónica o tampón fosfato. El uso de un tampón es para controlar el pH. La composición puede mantenerse a un pH de o superior a 7,5, opcionalmente con etanol al 5-10 % v/v como solubilizante. La composición farmacéutica puede contener excipientes adicionales opcionales tales como: un conservante antimicrobiano, agente de ajuste del pH, carga, radioprotector, solubilizante o agente de ajuste de la osmolalidad.

Una composición de agente de imagenología particular comprende el péptido cMBP de SEQ-7 que tiene $Z_1=Z_2= \text{M}^{\text{G}}$ enlazados, y una combinación de radioprotector ácido *para*-aminobenzoico y radioprotector/solubilizante etanol en tampón acuoso. Un péptido de SEQ-7 en tales composiciones puede ser el péptido 1, y un péptido cMBP marcado con ^{18}F puede ser el compuesto 3. La concentración radiactiva puede ser menor de 350 MBq/ml, con una concentración de pABA de 2 mg/ml, y etanol aproximadamente al 5-10 % vol/vol, p.ej. 6,5-7,5 %

Los agentes de imagenología y el portador biocompatible pueden suministrarse cada uno en viales o recipientes adecuados que comprenden un envase sellado que permite el mantenimiento de la integridad estéril y/o la seguridad radiactiva, más opcionalmente un gas de espacio de cabeza (p.ej., nitrógeno o argón), mientras que permite la adición y extracción de disoluciones por jeringa o cánula.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en condiciones de fabricación aséptica (concretamente, en sala limpia), dando el producto estéril no pirogénico adecuado. Los componentes clave, especialmente los reactivos asociados más aquellas partes del aparato que entran en contacto con el agente de imagenología (p.ej. viales) son adecuadamente estériles. Los componentes y reactivos pueden esterilizarse mediante métodos conocidos en la materia incluyendo: filtración estéril, esterilización terminal usando p.ej. irradiación gamma, autoclave, calor seco o tratamiento químico (p.ej., con óxido de etileno). Se prevé esterilizar algunos componentes por adelantado, de modo que tengan que llevarse a cabo el mínimo número de manipulaciones. Sin embargo, como precaución, es mejor incluir al menos una etapa de filtración estéril como etapa final en la preparación de la composición farmacéutica.

Los agentes de imagenología del primer aspecto pueden prepararse mediante radiofluoración de un precursor adecuado. Tal precursor comprende:

- (i) el péptido cíclico de unión a c-Met de fórmula I en la que $Z^1=Z^2= \text{M}^{\text{G}}$; o
- (ii) un péptido cíclico de unión a c-Met funcionalizado con aminoxi.

Se entiende por el término "péptido cíclico de unión a c-Met funcionalizado con aminoxi" el péptido cíclico de unión a c-Met de fórmula I que tiene conjugado covalentemente con el mismo un grupo funcional aminoxi. Tales grupos aminoxi son de fórmula $-\text{O}-\text{NH}_2$, p.ej. $-\text{CH}_2\text{O}-\text{NH}_2$ y tienen la ventaja de que la amina del grupo aminoxi es más reactiva que un grupo amina de Lys en reacciones de condensación con aldehídos para formar éteres de oxima. Tales grupos aminoxi están adecuadamente enlazados con el residuo de Lys de cBMP, como se describe a continuación.

El precursor es no radiactivo y se diseña de modo que pueda obtenerse con alto grado de pureza química. Se diseña también de modo que, tras reacción con una fuente adecuada de ^{18}F , ocurra la reacción eficazmente con una pureza radioquímica satisfactoria (PRQ). La "fuente adecuada de ^{18}F " depende de la naturaleza del precursor. Cuando el precursor comprende el péptido de unión a c-Met no marcado de fórmula I, el grupo amina del residuo de lisina (Lys) del péptido no marcado se diseña para ser el sitio de radiomarcaje. Los extremos del péptido cMBP están protegidos, puesto que $Z^1=Z^2= \text{M}^{\text{G}}$. Tales péptidos de unión a c-Met y grupos Z^1/Z^2 ejemplares son como se describen en el primer aspecto. Por tanto, la fuente adecuada de ^{18}F se diseña para reaccionar lo más eficazmente posible con el grupo amina de lisina, preferiblemente la amina épsilon de Lys.

Para la preparación de una composición farmacéutica, se proporciona el precursor en forma estéril, p.ej. un sólido liofilizado. El precursor es adecuadamente un péptido de unión a c-Met funcionalizado con aminoxi.

Los péptidos de unión a c-Met de fórmula I, concretamente Z^1 -[cMBP]- Z^2 de la presente invención, pueden obtenerse mediante un método de preparación que comprende:

- (i) síntesis peptídica en fase sólida de un péptido lineal que tiene la misma secuencia peptídica que el péptido cMBP deseado y donde la Cys^a y Cys^b no están protegidas, y los residuos Cys^c y Cys^d tienen grupos protectores de tiol;
- 5 (ii) tratamiento del péptido de la etapa (i) con base acuosa en disolución, dando un péptido monocíclico con un primer enlace disulfuro que liga Cys^a y Cys^b;
- (iii) retirada de los grupos protectores de tiol de Cys^c y Cys^d y ciclación, dando un segundo enlace disulfuro que liga Cys^c y Cys^d, que es el producto peptídico bicíclico deseado Z¹-[cMBP]-Z².

Se entiende por el término “grupo protector” un grupo que inhibe o suprime reacciones químicas indeseables, pero que se diseña para ser suficientemente reactivo para poder escindir el grupo funcional en cuestión en condiciones suficientemente suaves que no modifiquen en resto de la molécula. Después de la desprotección, se obtiene el producto deseado. Los grupos protectores de amina son bien conocidos por los especialistas en la materia y se eligen adecuadamente de: Boc (donde Boc es terc-butiloxicarbonilo), Fmoc (donde Fmoc es fluorenilmetoxicarbonilo), trifluoroacetilo, aliloxicarbonilo, Dde [concretamente, 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo] o Npys (concretamente, 3-nitro-2-piridinsulfenilo). Son grupos protectores de tiol adecuados Trt (trilito), Acn (acetamidometilo), *t-Bu* (terc-butilo), *terc*-butilitio, metoxibencilo, metilbencilo o Npys (3-nitro-2-piridinsulfenilo). El uso de grupos protectores adicionales se describe en 'Protective Groups in Organic Synthesis', 4ª edición, Theodorora W. Greene and Peter G. M. Wuts, [Wiley Blackwell, (2006)]. Son grupos protectores de amina ejemplares Boc y Fmoc, p.ej. Boc. Son grupos protectores de amina ejemplares Trt y Acn.

Los Ejemplos 1 y 2 proporcionan detalles específicos adicionales. Se describen detalles adicionales de la síntesis peptídica en fase sólida en P. Lloyd-Williams, F. Albericio y E. Giraldo; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, 1997. Los péptidos cMBP se almacenan mejor en atmósfera inerte y se mantienen en un congelador. Cuando se usan en disolución, es mejor evitar un pH superior a 7, puesto que esto pone en riesgo la redistribución de los puentes disulfuro.

Los péptidos de unión a c-Met funcionalizados con aminoxi pueden prepararse mediante los métodos de Poethko *et al* [J. Nucl. Med., 45,892-902 (2004)], Schirmacher *et al* [Bioconj. Chem., 18, 2085-2089 (2007)], Solbakken *et al* [Bioorg. Med. Chem. Lett, 16, 6190-6193 (2006)] o Glaser *et al* [Bioconj. Chem., 19, 951-957 (2008)]. El grupo aminoxi puede conjugarse opcionalmente en dos etapas. En primer lugar, se conjuga el ácido aminoxicarboxílico protegido en N o éster activado con aminoxi protegido en N con el péptido de unión a c-Met. En segundo lugar, se desprotege el péptido de unión a c-Met funcionalizado con aminoxi protegido con N intermedio, dando el producto deseado (véanse los artículos de Solbakken y Glaser citados anteriormente). Los ácidos aminoxicarboxílicos protegidos en N tales como Boc-NH-O-CH₂(C=O)OH están comercialmente disponibles, p.ej., en Novabiochem.

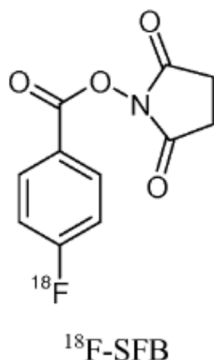
Los péptidos cíclicos de unión a c-Met radiomarcados con ¹⁸F pueden prepararse como sigue:

- (i) provisión del precursor como se describe anteriormente;
- 35 (ii) cuando dicho precursor comprende un péptido cíclico de unión a c-Met no marcado de fórmula I, en la que Z¹= Z²= M^G, reacción con un éster activado marcado con ¹⁸F o un ácido carboxílico marcado con ¹⁸F en presencia de un agente activador, dando el péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con ¹⁸F conjugado a través de un grupo de enlace amida con el residuo de Lys del cMBP de dicho péptido cíclico;
- (iii) cuando dicho precursor comprende un péptido cíclico de unión a c-Met funcionalizado con aminoxi, reacción con:
- 40 (a) un éster activado marcado con ¹⁸F o un ácido carboxílico marcado con ¹⁸F en presencia de un agente activador, dando el péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con ¹⁸F conjugado a través de un grupo de enlace de amida con la posición aminoxi de dicho péptido funcionalizado; o
- 45 (b) un aldehído marcado con ¹⁸F, dando el péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con ¹⁸F conjugado a través de un grupo de enlace oxima de éter con la posición aminoxi de dicho péptido funcionalizado.

Se entiende por el término “éster activado” o “éster activo” un derivado de éster del ácido carboxílico asociado que se diseña para ser un mejor grupo saliente, y por ello permite una reacción más fácil con nucleófilos tales como aminas. Son ejemplos de ésteres activos adecuados: N-hidroxisuccinimida (NHS); éster de sulfosuccinimidilo; pentafluorofenol; pentafluorotiofenol; *para*-nitrofenol; hidroxibenzotriazol y PyBOP (concretamente hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio). Son ésteres activos preferidos los ésteres de N-hidroxisuccinimida o pentafluorofenol, especialmente ésteres de N-hidroxisuccinimida.

Se entiende por el término “agente activador” un reactivo usado para facilitar el acoplamiento entre una amina y un ácido carboxílico para generar una amida. Tales agentes activadores adecuados son conocidos en la materia e incluyen carbodiimidas tales como EDC [*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida y *N,N'*-dialquilcarbodiimidas tales como diciclohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida; y triazoles tales como HBTU [hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametiluronio], HATU [hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametiluronio] y PyBOP [hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio]. Se dan más detalles en "March's Advanced Organic Chemistry", 5ª edición, páginas 508-510, Wiley Interscience (2001). Es uno de tales agentes activadores EDC.

60 Los ésteres activados marcados con ¹⁸F, tales como [¹⁸F]-SPB, pueden prepararse mediante el método de Glaser *et al*, y las referencias en el mismo [J. Lab. Comp. Radiopharm., 52, 327-330 (2009)] o el método automatizado de Marik *et al* [Appl. Rad. Isot., 65(2), 199-203 (2007)]:



los ácidos carboxílicos marcados con ^{18}F pueden obtenerse mediante el método de Marik *et al.* citado anteriormente.

5 Los aldehídos alifáticos marcados con ^{18}F de fórmula $^{18}\text{F}-(\text{CH}_2)_2\text{O}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_q\text{CH}_2\text{CHO}$, donde q es 3, pueden obtenerse mediante el método de Glaser *et al.* [Bioconj. Chem., 19(4),951-957 (2008)]. El ^{18}F -fluorobenzaldehído puede obtenerse mediante el método de Glaser *et al.* [J. Lab. Comp. Radiopharm., 52, 327-330 (2009)]. El precursor $\text{Me}_3\text{N}^+-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CHO}\cdot\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ se obtiene mediante el método de Haka *et al.* [J. Lab. Comp. Radiopharm., 27, 823-833 (1989)].

10 La conjugación de aldehídos marcados con ^{18}F con péptidos c-Met funcionalizados con aminoxi puede llevarse a cabo en presencia de un catalizador de anilina como se describe por Flavell *et al.* [J. Am. Chem. Soc., 130(28), 9106-9112 (2008)]. Aunque es posible usar péptidos aminoxi-c-Met protegidos (tales como compuesto 1) como precursores, el derivado aminoxi libre (tal como compuesto 2) es óptimo. Esto es debido a que la síntesis completa es más susceptible de automatización, mientras que con el precursor protegido, se requiere típicamente una etapa de desprotección manual.

La composición de agente de imagenología preferida puede obtenerse como sigue:

- 15 (i) preparación del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con ^{18}F ;
 (ii) separación cromatográfica del péptido cíclico de unión a c-Met no marcado del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con ^{18}F .

20 La separación cromatográfica de la etapa (ii) puede llevarse a cabo por HPLC o SPE (extracción en fase sólida) usando uno o más cartuchos de SPE. La SPE es mejor cuando se usa un sintetizador automatizado, y la HPLC es mejor en las demás circunstancias. El ejemplo 5 proporciona un método de HPLC adecuado para el compuesto 3 de la presente invención.

25 Cuando se proporciona el agente de imagenología como composición farmacéutica, el método para preparación puede llevarse a cabo usando un aparato sintetizador automatizado. Se entiende por el término "sintetizador automatizado" un módulo automatizado basado en el principio de operaciones unitarias como se describe por Satyamurthy *et al.* [Clin. Positr. Imag., 2(5), 233-253 (1999)]. El término "operaciones unitarias" significa que los procesos complejos se reducen a una serie de operaciones o reacciones sencillas, que pueden aplicarse a una serie de materiales. Tales sintetizadores automatizados se prefieren para el método de la presente invención, especialmente cuando se desea una composición radiofarmacéutica. Están comercialmente disponibles de una serie de suministradores [Satyamurthy *et al.* anteriormente], incluyendo: GE Healthcare; CTI Inc; Ion Beam Applications (Chemin du Cyclotron 3, B-1348 Louvain-La-Neuve, Bélgica); Raytest (Alemania) and Bioscan (EE.UU.).

30 En una realización preferida, cuando la determinación de la etapa (i) es que la terapia anti-Met es adecuada para dicho paciente, entonces se inicia o continúa la terapia anti-Met para dicho paciente.

La terapia anti-Met comprende preferiblemente:

- 35 a) un inhibidor de c-Met no proteico;
 b) un anticuerpo anti-Met;
 c) un anticuerpo anti-HGF;

o combinaciones de los mismos.

40 El término "no proteico" tiene su significado convencional. Tales inhibidores preferidos de c-Met son sintéticos. El término "sintético" tiene su significado convencional, concretamente artificial en contraposición con aislado de fuentes naturales, p.ej. del cuerpo mamífero. Tales compuestos tienen la ventaja de que su fabricación y perfil de impurezas pueden controlarse totalmente. El inhibidor de c-Met es preferiblemente una "molécula pequeña", concretamente tiene un peso molecular de menos de 2.000 dáltones, más preferiblemente menos de 1.500 dáltones, lo más preferiblemente menos de 1.000 dáltones.

45 Se entiende por la frase "fármaco que afecta indirectamente a la ruta de señalización de c-Met" un compuesto farmacológicamente activo que interfiere con la ruta de señalización de c-Met, anterior o posteriormente, de tal modo que tenga un efecto inhibidor/antagonista o agonista sobre la regulación, expresión o función de c-Met. Los ejemplos

ES 2 676 184 T3

de fármacos que afectarían indirectamente a la transcripción del gen *Apc* y la expresión posterior de *c-Met* son: inhibidores de β -catenina o inhibidores de $\text{NF}\kappa\text{B}/\text{IKK}$. Se proporcionan detalles adicionales de terapias anti-Met por Toschi *et al.* [Clin. Cancer Res., 14(19), 5941-5946 (2008)]. Se han aprobado dos terapias anti-Met (crizotinib y cabozantinib), y están actualmente más en desarrollo clínico (basado en: <http://clinicaltrials.gov/ct2/search> y resúmenes en diversas reuniones científicas) que son como sigue:

5

Compuesto	Compañía	Comentario
Xalkori®/Crizotinib/PF-02341066	Pfizer	Tratamiento de primera línea para CPNM con mutación ALK
Cabozantinib/XL-184/BMS-907351	Exelixis/Bristol-Myers-Squibb	Efecto sobre <i>c-Met/RET/VEGFR₂</i>
Tivantinib/ARQ-197	Arqule/Daiichi Sankyo/Kyowa Hakko	Molécula pequeña, estabiliza la conformación inactiva de <i>c-Met</i>
Rilotumumab/AMG 102	Amgen	AcM humano que bloquea la acción de HGF
MetMab/PRO143966	Genentech	AcM humanizado que bloquea la acción de HGF
Foretinib/GSK1363089/(XL-880)	GSK	Efecto sobre: <i>c-Met/AXL/VEGFR₂</i>
MGCD-265	MethylGene	Efecto sobre: <i>c-Met/VEGFR_{1,2,3}/Tie-2/Ron</i>
E7050	Eisai Inc.	Efecto sobre: <i>c-Met/VEGFR₂</i>
Ficlatuzumab/SCH 900105/AV299	AVEO Pharmaceuticals Inc/Schering Plough	AcM anti-HGF
INCB028060/INC280	Incyte Corporation/Novartis	Inhibidor de <i>c-Met</i> de molécula pequeña
AMG 208	Amgen	Inhibidor de <i>c-Met</i> de molécula pequeña
EMD 1214063	EMD Serono	Inhibidor de <i>c-Met</i> de molécula pequeña
EMD 1204831	EMD Serono	Inhibidor de <i>c-Met</i> de molécula pequeña
SAR 125844	Sanofi-Aventis	Inhibidor de <i>c-Met</i> de molécula pequeña
AMG 337	Amgen	Inhibidor de <i>c-Met</i> de molécula pequeña
LY-2801653	Eli Lilly	Inhibidor de <i>c-Met</i> de molécula pequeña
Amuvatinib/MP-470	SuperGen	Inhibidor de TK multidirigido y supresor de RAD51
PF-04217903	Pfizer	Inhibidor de <i>c-Met</i> cinasa
BMS-777607	Bristol-Myers Squibb	Inhibidor de <i>c-Met</i> de molécula pequeña
MK-2461	Merck	Inhibidor multidirigido compet. con AMP de <i>c-Met</i> activado
MK-8033	Merck	Inhibidor de <i>c-Met</i> de molécula pequeña
JNJ-38877605	Johnson & Johnson/Ortho Biotech	Inhibidor selectivo de Met
TAK-701	Millenium Pharmaceuticals, Inc.	AcM humanizado anti-HGF

El crizotinib está ahora en el mercado en varios países.

La terapia anti-Met puede suministrarse opcionalmente como parte de una terapia de combinación con un tratamiento adicional, donde el tratamiento adicional se elige de:

- 5 (i) un inhibidor de EGFR;
 (ii) un inhibidor de tirosina cinasa;
 (iii) un inhibidor de VEGF;
 (iv) fármacos de quimioterapia del cáncer estándares;
 (v) un inhibidor de β -catenina.

La imagenología y determinación de las etapas (ii) y (iii), respectivamente, del primer aspecto pueden llevarse a cabo en uno o más intervalos de tiempo después del inicio de dicha terapia para monitorización de la terapia.

10 En un método de monitorización, se anticipa que se llevarán a cabo múltiples imágenes de la región o regiones de interés del cáncer del paciente. Las técnicas de imagenología comparativa son conocidas en la materia, tales como sustracción de imágenes y/o análisis de las relaciones de tumor:fondo en diferentes puntos temporales, y pueden usarse entonces para auxiliar a la determinación de si el grado de sobreexpresión de c-Met ha cambiado en respuesta a terapia anti-Met u otras terapias que puedan afectar a la expresión de c-Met (p.ej., regulación positiva de c-Met en
 15 pacientes con fracaso de erlotinib en carcinoma pulmonar no microcítico [Cappuzz *et al.* *Annal.Oncol.*, 20: 298-304 (2009); Engelman, *et al.* *Science* 316, 1039-1043 (2007)], y regulación positiva de c-Met en respuesta a radiación ionizante que conduce a radiorresistencia [De Bacco *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 103(8), 645-61 (2011)]. La gestión del paciente puede cambiar entonces en términos de, p.ej., continuación de la terapia; cambio de la dosificación; cambio a una terapia anti-Met diferente; inicio de la terapia de combinación; cirugía electiva o terminación del curso de terapia.

20 Un barrido de partida que mida la expresión *in vivo* de c-Met seguido de un segundo barrido al cabo de un mes desde el inicio de la terapia tiene el potencial de ser indicativo de la respuesta definitiva a terapia, valorada en un punto temporal posterior midiendo el tamaño tumoral. La hipótesis es que una caída brusca de la expresión de c-Met después del inicio de la terapia es predictivo de respuesta a la terapia. La utilidad clínica de esto podría ser reducir el tiempo y el dinero gastado en la administración de una terapia inútil. Por tanto, los barridos secuenciales tienen el potencial de
 25 proporcionar una señal temprana de que la terapia anti-c-Met no consigue mantener un efecto antitumoral. En ese caso, la falta de cambio (o posiblemente elevación) de la expresión de c-Met tiene el potencial de predecir exacta y fiablemente el fallo de la terapia. Esto podría ser de gran utilidad, puesto que facilitaría un cambio rápido a una terapia alternativa que podría probarse más eficaz.

30 La invención se ilustra por los ejemplos no limitantes detallados a continuación. El ejemplo 1 proporciona la síntesis de un péptido cMBP de la invención que tiene grupos inhibidores del metabolismo ($Z^1=Z^2=Me$) en ambos extremos (péptido 1). El ejemplo 2 proporciona la síntesis de un precursor protegido de la invención (compuesto 1). El ejemplo 3 proporciona la síntesis de la contrapartida fluorada no radiactiva (concretamente ^{19}F) del péptido c-Met marcado con flúor (compuesto 3A). El ejemplo 4 proporciona la síntesis de un péptido c-Met ^{18}F -radiofluorado de la invención (compuesto 3B). El ejemplo 5 proporciona las condiciones de HPLC para la separación de péptidos de unión a c-Met
 35 marcados y no marcados.

El ejemplo 6 proporciona la biodistribución de un péptido marcado con ^{18}F de la invención (compuesto 3B) en un modelo tumoral animal. Los resultados muestran unión al receptor c-Met humano expresado en los tumores HT-29, y por ello utilidad para imagenología tumoral. El ejemplo 7 demuestra que la captación tumoral del ejemplo 6 es específica, puesto que la captación puede inhibirse mediante la coadministración de péptido de unión a c-Met marcado con ^{19}F no radiactivo (compuesto 3A).
 40

El ejemplo 8 demuestra también una captación hepática reducida en aproximadamente un 40 % en primates cuando se coadministra péptido de unión a c-Met marcado con ^{19}F . La coadministración de una versión redistribuida marcada con ^{19}F del péptido, que no tiene afinidad por el receptor de c-Met, no reducía significativamente la captación hepática. El hígado tiene un alto nivel de expresión de c-Met, y se cree por lo tanto que la reducción en la captación después de
 45 competición con cMBP marcado con ^{19}F representa la evidencia de unión a c-Met específica *in vivo*.

El ejemplo 9 proporciona la síntesis automatizada del compuesto 3B, incluyendo además el uso automatizado de purificación por cartucho de SPE. Los resultados muestran que el compuesto 3B puede obtenerse con alta pureza y rendimiento radioquímico satisfactorio usando este enfoque. El ejemplo 10 describe imagenología humana usando un agente de imagenología de la invención.

50 Abreviaturas.

Se usan las abreviaturas aminoacídicas de una letra o tres letras convencionales.

%id: porcentaje de dosis inyectada

Ac: acetilo

Acm: acetamidometilo

55 ACN: acetonitrilo

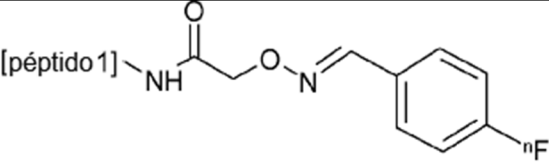
Boc: *terc*-butiloxicarbonilo

ES 2 676 184 T3

- DCM: diclorometano
 DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina
 DMF: dimetilformamida
 DMSO: dimetilsulfóxido
 5 EDC: *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida
 Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo
 HBTU: hexafluorofosfato de *O*-benzotriazol-1-il-*N,N,N,N*-tetrametiluronio
 HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
 HSPyU: hexafluorofosfato de *O*-(*N*-succinimidil)-*N,N,N',N'*-tetrametilenuronio
 10 NHS: *N*-hidroxisuccinimida
 NMM: *N*-metilmorfolina
 NMP: 1-metil-2-pirrolidinona
 pABA: ácido *para*-aminobenzoico
 Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
 15 PBS: solución salina tamponada con fosfato
 p.i.: después de inyección
 PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio
 SPE: extracción en fase sólida
 SUV: valores de captación estándares
 20 tBu: *terc*-butilo
 TFA: ácido trifluoroacético
 TIS: triisopropilsilano
 Trt: tritilo

Compuestos de la invención

Nombre	Estructura
Péptido 1	Puentes disulfuro en Cys4-16 y Cys6-14; Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH ₂ , o Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK-NH ₂
Compuesto 1	$[\text{péptido 1}] - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{N}(\text{H}) - \text{Boc}$
Compuesto 2	$[\text{péptido 1}] - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{NH}_2$

Nombre	Estructura
Compuesto 3	 <p data-bbox="384 432 616 461">n= 19 compuesto 3A;</p> <p data-bbox="384 479 611 508">n= 18 compuesto 3B</p>

donde: los compuestos 1, 2 y 3 están funcionalizados en el grupo amina épsilon de la Lys carboxiterminal del péptido 1; Boc= *tert*-butiloxicarbonilo.

Ejemplo 1: Síntesis del péptido 1

Etapa (a): síntesis del péptido lineal precursor protegido.

5 El péptido lineal precursor tiene la estructura:

Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂

Se ensambló la resina de peptidilo H-Ala-Gly-Ser(*t*Bu)-Cys(Trt)-Tyr(*t*Bu)-Cys(Acm)-Ser(*t*Bu)-Gly-Pro-Pro-Arg(Pbf)-Phe-Glu(O*t*Bu)-Cys(Acm)-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Tyr(*t*Bu)-Glu(O*t*Bu)-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Glu(O*t*Bu)-Gly-Thr(*t*Bu)-Gly-Gly-Gly-Lys(Boc)-polímero en un sintetizador peptídico Applied Biosystems 433A usando la química de Fmoc, partiendo de 0,1 mmol de resina Rink Amide Novagel. Se aplicó un exceso de 1 mmol de aminoácidos preactivados (usando HBTU) en las etapas de acoplamiento. Se incorporó Glu-Thr-seudoprolina (Novabiochem 05-20-1122) a la secuencia. Se transfirió la resina a un aparato burbujeador de nitrógeno y se trató con una disolución de anhídrido acético (1 mmol) y NMM (1 mmol) disueltos en DCM (5 ml) durante 60 min. Se retiró la disolución de anhídrido por filtración, se lavó la resina con DCM y se secó bajo corriente de nitrógeno.

Se llevó a cabo la retirada de los grupos protectores de cadena lateral simultánea a la escisión del péptido de la resina en TFA (10 ml) que contenía 2,5 % de TIS, 2,5 % de 4-tiocresol y 2,5 % de agua durante 2 horas y 30 min. Se retiró la resina por filtración, se retiró el TFA a vacío y se añadió dietiléter al residuo. Se lavó el precipitado formado con dietiléter y se secó al aire, procurando 264 mg de péptido bruto.

La purificación por HPLC preparativa (gradiente: 20-30 % de B durante 40 min, donde A= H₂O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ m C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 30 min) del péptido bruto procuró 100 mg de precursor lineal péptido 1 puro. Se analizó el producto puro por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 10 min, donde A= H₂O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ m C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 6,54 min). Se llevó a cabo la caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas con electropulverización (MH₂²⁺ calculada: 1464,6, MH₂²⁺ encontrada: 1465,1).

Etapa (b): Formación de puente disulfuro Cys4-16 monocíclico.

Cys4-16; Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂;

Se disolvió el precursor lineal de la etapa (a) (100 mg) en 5 % de DMSO/agua (200 ml) y se ajustó la disolución a pH 6 usando amoniaco. Se agitó la mezcla de reacción durante 5 días. Se ajustó entonces la disolución a pH 2 usando TFA y se retiró la mayoría del disolvente por evaporación a vacío. Se inyectó el residuo (40 ml) en porciones en una columna de HPLC preparativa para purificación de producto.

La purificación por HPLC preparativa (gradiente: 0 % de B durante 10 min, entonces 0-40 % de B durante 40 min, donde A= H₂O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ m C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 44 min) del residuo procuró 72 mg del precursor monocíclico compuesto 1 puro.

Se analizó el producto puro (como mezcla de los isómeros P1 a P3) por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 10 min, donde A= H₂O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ m C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 5,37 min (P1); 5,61 min (P2); 6,05 min (P3)). Se llevó a cabo la caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas con electropulverización (MH₂²⁺ calculada: 1463,6, MH₂²⁺ encontrada: 1464,1 (P1); 1464,4 (P2); 1464,3 (P3)).

Etapa (c): Formación de un segundo puente disulfuro Cys6-14 (péptido 1).

Se disolvió el precursor monocíclico de la etapa (b) (72 mg) en 75 % de AcOH/agua (72 ml) bajo una capa de nitrógeno. Se añadieron HCl 1 M (7,2 ml) e I₂ 0,05 M en AcOH (4,8 ml) en ese orden y se agitó la mezcla durante 45 min. Se

añadió ácido ascórbico 1 M (1 ml) dando una mezcla incolora. Se evaporaron la mayoría de los disolventes a vacío, se diluyó el residuo (18 ml) con agua/0,1 % de TFA (4 ml) y se purificó el producto usando HPLC preparativa.

La purificación por HPLC preparativa (gradiente: 0 % de B durante 10 min, entonces 20-30 de % B durante 40 min, donde A= H₂O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 de TFA, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 µm C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 43-53 min) del residuo procuró 52 mg de péptido 1 puro. Se analizó el producto puro por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 10 min, donde A= H₂O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 µm C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 6,54 min). Se llevó a cabo la caracterización de producto adicional usando espectroscopía de masas con electropulverización (MH₂²⁺ calculada: 1391,5, MH₂²⁺ encontrada: 1392,5).

Ejemplo 2: Síntesis del compuesto 1.

Se disolvieron ácido (Boc-aminoxil)acético (Sigma-Aldrich; 138 mg, 0,72 mmol), EDC (138 mg, 0,72 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (83 mg, 0,72 mmol) en DMF (1 ml). Se agitó la disolución durante 25 min y se añadió entonces a una disolución de péptido 1 (1,0 g, 0,36 mmol) en DMF (5 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 2 min. Se añadió entonces sim-colidina (239 µl, 1,80 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 3 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con agua (5 ml) y se purificó el producto por RP-HPLC preparativa.

Condiciones de HPLC: Sistema Waters Prep 4000, disolvente A= H₂O/0,1 % de TFA y disolvente B= ACN/0,1 % de TFA; gradiente 20-40 % de B durante 60 min; caudal= 50 ml/min; columna: Phenomenex Luna 10 µm C18 (2) 250 x 50 mm; detección: UV 214 nm. Rendimiento del compuesto 1 purificado: 690 mg (65 %). m/z encontrada: 1478,4, MH₂²⁺ esperada: 1478,1.

Ejemplo 3: Síntesis del compuesto 3A.

Etapa (a): Preparación de ácido *N*-(4-fluorobenciliden)aminoxilacético.

Se disolvieron ácido (Boc-aminoxil)acético (96 mg, 0,50 mmol) y 4-fluorobenzaldehído (53 µl, 0,50 mmol) en ácido fórmico (0,5 ml) y se agitó la mezcla de reacción durante 135 min. Se diluyó entonces la mezcla de reacción con 20 % de ACN/agua/0,1 % de TFA (7 ml) y se purificó el producto por RP-HPLC semipreparativa.

Condiciones de HPLC: Beckman System Gold; disolvente A= H₂O/0,1 % de TFA y disolvente B= ACN/0,1 % de TFA; gradiente 25-35% de B durante 40 min; caudal= 10 ml/min; columna: Phenomenex Luna 5 µm C18 (2) 250 x 21,2 mm; detección: UV 214 nm. Rendimiento: 92 mg (93 %).

Etapa (b): Preparación del compuesto 3A.

Se disolvieron ácido *N*-(4-fluorobenciliden)aminoxilacético [de la etapa (a), 43 mg, 0,22 mmol] y PyBOP (112 mg, 0,22 mmol) en DMF (2 ml). Se añadió una disolución de DIPEA (157 µl, 0,90 mmol) en DMF (10 ml) y se agitó la mezcla durante 1 min. Se añadió entonces la disolución a una disolución de péptido 1 (500 mg, 0,18 mmol) en DMF (10 ml) y se agitó la mezcla de reacción durante 30 min. Se diluyó entonces la mezcla de reacción con agua (20 ml) y se purificó el producto por HPLC preparativa.

Condiciones de HPLC como para el ejemplo 2, excepto: disolvente A= H₂O/0,1 % de acetato de amonio y disolvente B= ACN. Rendimiento: 291 mg (55 %) de material puro. m/z encontrada: 988,6, MH₃³⁺ esperada: 987,7.

Ejemplo 4: Síntesis del compuesto 3B a partir del compuesto 1.

Etapa (a): Desprotección del compuesto 1 dando el compuesto 2.

Se trató el compuesto 1 (7 mg, 2,37 µM) en un vial de reacción de 5 ml con agua (10 µl) y ácido trifluoroacético (190 µl) y se sumergió entonces en un vial sellado en un baño sónico durante 10 minutos. Se retiró entonces el TFA acuoso a vacío (aproximadamente 30 min), se reconstituyó el residuo en tampón citrato (pH 2,6, 1,7 ml) y se cargó en un módulo sintetizador automatizado (FastLab™, GE Healthcare Ltd) en posición 14.

Etapa (b) Síntesis y purificación de ¹⁸F-benzaldehído.

Se produjo [¹⁸F]-fluoruro usando un ciclotrón GEMS PETtrace con una diana de plata mediante la reacción nuclear [¹⁸O](p,n) [¹⁸F]. Se usaron volúmenes diana totales de 1,5-3,5 ml. Se atrapó el radiofluoruro en un cartucho Waters QMA (preacondicionado con carbonato) y se eluyó el fluoruro con una disolución de Kryptofix_{2.2.2} (4 mg, 10,7 µM) y carbonato de potasio (0,56 mg, 4,1 µM) en agua (80 µl) y acetonitrilo (320 µl). Se usó nitrógeno para conducir la disolución del cartucho QMA al recipiente de reacción. Se secó el [¹⁸F]-fluoruro durante 9 minutos a 120 °C bajo una corriente continua de nitrógeno y vacío. Se añadió benzaldehydotriflato de trimetilamonio, [Haka *et al*, J. Lab. Comp. Radiopharm., 27, 823-833 (1989)] (3,3 mg, 10,5 µM), en dimetilsulfóxido (1,1 ml) al [¹⁸F]-fluoruro secado y se calentó la mezcla a 105 °C durante 7 minutos, produciendo 4-[¹⁸F]-fluorobenzaldehído. La eficacia de marcaje fue del 69 ± 3 % de degradación corregida.

Se diluyó entonces la mezcla de marcaje bruta con disolución de hidróxido de amonio y se cargó en un cartucho MCX+ SPE (preacondicionado con agua como parte de la secuencia FASTlab). Se lavó el cartucho con agua, se secó con gas nitrógeno antes de la elución de 4-[¹⁸F]-fluorobenzaldehído de nuevo al recipiente de reacción en etanol (1 ml).

ES 2 676 184 T3

Aproximadamente un 13 % (corregida la degradación) de [¹⁸F]-fluorobenzaldehído permanecía atrapado en el cartucho.

Etapa (c): Condensación de aldehído con derivado aminoxi (compuesto 2).

5 Se transfirió el compuesto 2 (5 mg, 1,8 µmol) al recipiente de reacción FASTlab antes que la elución de 4-[¹⁸F]-fluorobenzaldehído se devuelva desde el cartucho MCX+. Se calentó entonces la mezcla a 70 °C durante 17 minutos). La HPLC analítica confirmó que la PRQ del compuesto 3B era de 63 ± 9 %.

10 Se diluyó la mezcla de reacción bruta con agua (10 ml) y se cargó en HPLC preparativa. Un sistema de acetato de amonio 10 mM frente a acetonitrilo daba una separación completa entre los 3 posibles componentes radiactivos de la mezcla de reacción bruta, a saber [¹⁸F]-fluoruro (T_R= 0,5 min), [¹⁸F]-compuesto 3B (T_R= 6 min) y 4-[¹⁸F]-fluorobenzaldehído (T_R=9 min). La recuperación de la radiactividad del sistema HPLC era buena, con una eficacia de recuperación de 97 %. Se obtuvo el producto purificado recogiendo el tiempo de reacción de alrededor de 6 min.

Ejemplo 5: Separación por HPLC de péptido cíclico c-Met marcado con ¹⁸F de péptido no marcado.

Se preparó compuesto 3A según el ejemplo 3.

(i) Condiciones de HPLC analítica.

15 Columna: XBridge Shield RP 18 (4,6x50) mm, 2,5 µm,
 Fase móvil acuosa A: NH₄Ac 10 mM (tampón) pH aprox. 6,8;
 Fase móvil orgánica B: acetonitrilo;
 Temperatura de columna: 25 °C
 Flujo: 1,2 ml/min

20 Gradiente:

Minutos	0	1	16	19	22	22,1	26
% de B	20	20	40	100	100	20	20

(ii) Condiciones de HPLC preparativa

Columna XBridge Shield RP 18 (10x100) mm, 5 µm.
 Fase móvil acuosa A: NH₄Ac 10 mM (tampón) pH aprox. 6,8;
 25 Fase móvil orgánica B: Etanol (90 %) fase móvil A (10 %).
 Temperatura de columna: 25 °C.
 Flujo: 4 ml/min

Gradiente:

Minutos	0	1	16	20	25	26
% de B	15	15	40	100	100	15

30 (iii) Resultados de HPLC analítica y preparativa.

Compuesto	HPLC analítica	HPLC preparativa
	Tiempo de retención (minutos)	Tiempo de retención (minutos)
Hidrocloruro de anilina	1,8	3
Fluorobenzaldehído	4,3	13
Compuesto 2	4,8	No definido
Péptido 1	5,1	No definido

Compuesto	HPLC analítica	HPLC preparativa
	Tiempo de retención (minutos)	Tiempo de retención (minutos)
Compuesto 3A	8,8	19

Ejemplo 6: Biodistribución de péptido c-Met marcado con ¹⁸F (compuesto 3B) en ratones atímicos portadores de tumor.

5 Se albergaron ratones atímicos macho CD-1 (aprox. 20 g) en jaulas ventiladas individuales, con acceso a alimento y agua a voluntad. Se cultivaron células HT-29 (ATCC, n° de cat. HTB-38) en medio McCoy 5a (Sigma n° M8403) suplementado con suero fetal bovino al 10 % y penicilina/estreptomycin. Se dividieron las células 1:3 dos veces por semana a un 70-80 % de confluencia usando tripsina al 0,25 % y se incubaron en CO₂ al 5 % a 37 °C. Se inyectó a los ratones por vía s.c. con anestesia ligera (isoflurano) la suspensión de células HT-29 en un sitio (nuca del cuello) con una dosis nominal de 10⁶ células por inyección en un volumen de 100 µl usando una aguja de calibre fino (25 G).
10 Se dejaron desarrollar entonces los tumores durante 20 días o hasta un volumen de al menos 200 mm³ (para inclusión en el estudio). Después de un tiempo de crecimiento de 20 días, se inyectó a los animales compuesto 3B (0,1 ml, 1-5 MBq/animal) en embolada intravenosa por la vena de la cola. En diversos momentos después de la inyección, se sacrificaron los animales, se diseccionaron y se retiraron los siguientes órganos y tejidos:

15 La captación tumoral era del 2,3 % i.d. a los 2 minutos, alcanzando el máximo a los 30 minutos (3,8 % i.d.) y disminuyendo entonces con el tiempo hasta 1,9 % i.d. a los 120 min pi. La retención global en el tumor era del 83 %. Había una aclaración sanguínea razonablemente rápida con el tiempo (la sangre inicial a los 2 minutos estaba al 9,2 % i.d./g disminuyendo hasta 0,81 % i.d./g a los 120 min pi). El tejido de fondo clave (p.ej. pulmones e hígado) seguía el perfil de aclaración sanguínea con el tiempo, con una captación a los 120 min p.i. del 1.1 % i.d./g (hígado) y del 1,56 % i.d./g (pulmones).

20 **Ejemplo 7: Estudio de bloqueo de receptor del compuesto 3B en ratones atímicos portadores de tumor.**

Se repitió el estudio del ejemplo 6 con coinyección de un exceso de 100 y 1000 veces del análogo no radiactivo, el compuesto 3A (~1,5 µg y 15 µg en exceso por animal), diseccionando los animales a los 120 minutos después de la inyección. Todos los animales de este estudio tenían un peso corporal similar (intervalo de 25 a 30 g). Los datos demostraban que se conseguía una reducción estadísticamente significativa (p < 0,01) en la captación tumoral del compuesto 3B con un exceso de 1000 veces de péptido no marcado (la captación tumoral de HT-29 caía de 1,9 a 1,1 % i.d./g; una reducción del 40 %).
25

Ejemplo 8: Imagenología por PET de primate del compuesto 3B.

Se midió la biodistribución del compuesto 3B en tres macacos cangrejeros hembra por PET. Se efectuaron dos inyecciones trazadoras en cada ocasión:

- 30 (a) trazador solo (compuesto 3B) 3 MBq/kg (estudio de punto de partida);
(b) trazador a 9 MBq/kg con coinyección de 0,15 mg/kg de compuesto 3A (estudio de bloqueo) cuatro horas después de la inyección del punto de partida.

Se inyectó el trazador en dosis en embolada de 1-3 ml seguido de 1 ml de solución salina.

35 Se tomaron muestras de sangre (0,2 ml) para la determinación de la radiactividad a intervalos de 210 minutos después de la administración. En los estudios dinámicos, se extrajeron regiones de interés de hueso, corazón, riñón, pulmón, hígado y músculo. En los estudios de cuerpo completo, se extrajeron regiones de interés de hueso, cerebro, colon, corazón, riñón, pulmón, hígado, músculo, páncreas, intestino delgado, bazo y vejiga. Se generaron datos de tiempo-actividad expresados como valores de captación estándar (SUV).

40 Se observó unión específica (~40 %) en hígado de monos Rhesus *in vitro* usando autorradiografía de sección congelada. No se observó que el músculo de mono Rhesus tuviera unión específica. Los estudios *in vivo* en macaco cangrejero mostraron una rápida captación de hígado que se redujo >40 % después de coinyección de 0,15 mg/kg de compuesto 3A. No se observó unión específica a músculo *in vivo*.

Ejemplo 9: Síntesis automatizada de compuesto 3B usando purificación por SPE.

45 Se llevó a cabo la síntesis del ejemplo 4 usando un aparato sintetizador automatizado FastLab™ (GE Healthcare Ltd). El módulo se configuró con reactivos, jeringas y cartuchos de SPE como se muestra en la Figura 1.

Se obtuvieron los cartuchos de SPE QMA (tratamiento con agua con metilamonio cuaternario), MCX+ (intercambio catiónico mixto) y C2 (baja hidrofobicidad) todos de Waters.

50 Durante la secuencia de FASTlab, se acondicionaron los cartuchos (en serie) con etanol. Inmediatamente antes del uso, se cebaron los cartuchos con ácido fosfórico diluido (al 0,2 %). Se diluyó la mezcla de reacción bruta con ácido fosfórico al 1 % y se cargó en el SPE. Se lavó el SPE con agua antes de eluir el producto con 6 ml de agua (con 80 % de etanol) y se analizó la pureza radioquímica (PRQ) por HPLC analítica.

ES 2 676 184 T3

Los resultados, basados en la cantidad de partida de ^{18}F -fluoruro usada, fueron los siguientes:

Actividad de partida (MBq)	Rendimiento al final de la síntesis (%)	PRQ
493	21	>99 %
750	25	>99 %
1.000	26	>99 %
49.000	19	94 %
61.000	18	98 %
67.400	21	96 %

Ejemplo 10: Estudios humanos.

5 Se estudió la imagenología con compuesto 3B en 6 pacientes humanos anteriormente diagnosticados con carcinoma epinocelular de cabeza y cuello. El agente era bien tolerado (sin efectos adversos). 5 de los 6 pacientes tenían una captación moderada/alta del trazador, y 1 paciente tenía una captación baja (similar al lado contralateral). Esto es consistente con los informes bibliográficos de un 80 % de tales pacientes que expresan c-Met.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> GE Healthcare Limited
- 5 <120> Método para la selección de pacientes
- <130> PZ11108 WO
- <160> 7
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 17
- 15 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> péptido sintético
- 20 <220>
- <221> DISULFURO
- <222> (1)..(13)
- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (2)..(2)
- <223> N, H o Y
- 30 <220>
- <221> DISULFURO
- <222> (3)..(11)
- 35 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (4)..(4)
- <223> G, S, T o N
- 40 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (8)..(8)
- <223> T o R
- 45 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (15)..(15)
- <223> A, D, E, G o S
- 50 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (16)..(16)
- <223> S o T
- 55 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (17)..(17)
- <223> D o E
- <400> 1
- Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys Tyr Xaa Xaa
- 60 1 5 10 15
- Xaa**
- <210> 2
- 65 <211> 18
- <212> PRT

ES 2 676 184 T3

<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

5 <220>
<221> DISULFURO
<222> (2)..(14)

10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> N, H o Y

15 <220>
<221> DISULFURO
<222> (4)..(12)

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> G, S, T o N

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> T o R

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (16)..(16)
<223> A, D, E, G o S

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (17)..(17)
<223> S o T

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (18)..(18)
<223> D o E

<400> 2
Ser Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys Tyr Xaa
1 5 10 15

45 Xaa Xaa

<210> 3
<211> 22
<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

55 <220>
<221> DISULFURO
<222> (4)..(16)

60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> N, H o Y

65 <220>
<221> DISULFURO

<222> (6)..(14)

<220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (7)..(7)
 <223> G, S, T o N

<220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (11)..(11)
 <223> T o R

<220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (18)..(18)
 <223> A, D, E, G o S

<220>
 <221> VARIANTE
 20 <222> (19)..(19)
 <223> S o T

<220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> (20)..(20)
 <223> D o E

<400> 3
 Ala Gly Ser Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys
 1 5 10 15

Tyr Xaa Xaa Xaa Gly Thr
 20

30 <210> 4
 <211> 4
 <212> **PRT**
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 4
 Gly Gly Gly Lys
 40 1

<210> 5
 <211> 4
 <212> **PRT**
 45 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

50 <400> 5
 Gly Ser Gly Lys
 1

<210> 6
 <211> 5
 55 <212> **PRT**
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido sintético
 60 <400> 6

ES 2 676 184 T3

Gly Ser Gly Ser Lys
1 5

5 <210> 7
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> DISULFURO
<222> (4)..(16)

15 <220>
<221> DISULFURO
<222> (6)..(14)

<400> 7
Ala Gly Ser Cys Tyr Cys Ser Gly Pro Pro Arg Phe Glu Cys Trp Cys
1 5 10 15

20 Tyr Glu Thr Glu Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

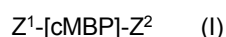
25

REIVINDICACIONES

1. Un péptido cíclico de unión a c-Met para uso en un método de imagenología *in vivo* para auxiliar a la determinación de si un paciente individual anteriormente diagnosticado con cáncer es susceptible de tratamiento con terapia anti-Met, comprendiendo dicho método:

- 5 (i) administrar a dicho paciente individual un agente de imagenología que comprende dicho péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con ^{18}F ;
- (ii) crear imágenes usando tomografía de emisión de positrones (PET) en al menos un sitio de dicho cáncer después de la etapa (i);
- 10 (iii) hacer una determinación a partir de la imagenología de la etapa (ii) de si hay una captación elevada de dicho agente de imagenología en dicho sitio o no;
- (iv) cuando la determinación de la etapa (iii) muestra una captación elevada, se considera que el cáncer sobreexpresa c-Met, y se determina que la terapia anti-Met es adecuada para dicho paciente;
- 15 (v) cuando la determinación a partir de la etapa (iii) no muestra captación elevada, se considera que el cáncer no sobreexpresa c-Met, y se determina que la terapia anti-Met no es adecuada para dicho paciente;

en el que dicho péptido cíclico de unión a C-Met es un péptido cíclico de 18 a 30 unidades de fórmula I:

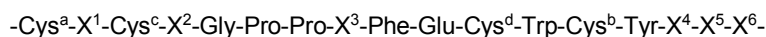


donde:

cMBP es de fórmula II



donde Q es la secuencia aminoacídica (SEQ-1):



En la que X^1 es Asn, His o Tyr;

X^2 es Gly, Ser, Thr o Asn;

25 X^3 es Thr o Arg;

X^4 es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X^5 es Ser o Thr;

X^6 es Asp o Glu;

30 y Cys^{a-d} son cada uno residuos de cisteína tales que los residuos a y b, así como c y d, se ciclan formando dos enlaces disulfuro separados;

A y A' son independientemente cualquier aminoácido distinto de Cys, con la condición de que al menos uno de A y A' está presente y sea Lys;

x e y son independientemente enteros de valor 0 a 13, y se eligen de tal modo que $[x + y] = 1$ a 13;

Z^1 está enlazado con el extremo N de cMBP, y es H o M^{IG} ;

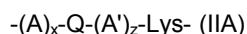
35 Z^2 está enlazado con el extremo C de cMBP y es OH, OB^{C} , o M^{IG} ,

donde B^{C} es un catión biocompatible;

cada M^{IG} es independientemente un grupo inhibidor del metabolismo, que es un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido cMBP;

40 en el que cMBP está marcado en el residuo Lys del grupo A o A' con ^{18}F y en el que la terapia anti-Met funciona por la inhibición directa del receptor c-Met, la interferencia con la unión de HGF a c-Met o la inhibición de la actividad c-Met cinasa.

2. El péptido cíclico de unión a c-Met según la reivindicación 1, donde cMBP es de fórmula IIA:



en la que:

45 z es un entero de valor 0 a 12 y $[x + z] = 0$ a 12,

y cMBP comprende solo un residuo de Lys.

3. El péptido cíclico de unión a c-Met para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que Q comprende la secuencia aminoacídica de SEQ-2 o SEQ-3:

Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶ (SEQ-2);

Ala-Gly-Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-Gly-Thr (SEQ-3).

5 4. El péptido cíclico de unión a c-Met según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que X³ es Arg.

5. El péptido cíclico de unión a C-Met para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cualquiera de los grupos -(A)_x- or -(A')_y- comprende un péptido ligador que se elige de:

-Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4),

-Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5) o

10 -Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6).

6. El péptido cíclico de unión a c-Met para uso según la reivindicación 5, donde cMBP tiene la secuencia aminoacídica (SEQ-7):

Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^a-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys.

15 7. El péptido cíclico de unión a c-Met para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde tanto Z¹ como Z² son independientemente M^{IG}.

8. El péptido cíclico de unión a c-Met para uso según la reivindicación 7, donde Z¹ es acetilo y Z² es una amida primaria.

9. El péptido cíclico de unión a c-Met para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que en dicho método el cáncer es carcinoma pulmonar no microcítico, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de mama, melanoma, glioma o sarcoma.

10. El péptido cíclico de unión a c-Met para uso según la reivindicación 9, en el que en dicho método el cáncer es carcinoma pulmonar no microcítico, cáncer colorrectal o cáncer gástrico.

11. Un péptido cíclico de unión a c-Met según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que cuando la determinación de la etapa (i) es que la terapia anti-Met es adecuada para dicho paciente, se inicia o continúa entonces la terapia anti-Met para dicho paciente.

12. El péptido cíclico de unión a c-Met para uso según la reivindicación 11, en el que dicho método de tratamiento de terapia anti-Met comprende:

(a) un inhibidor de c-Met no proteico;

(b) un anticuerpo anti-Met;

30 (c) un anticuerpo anti-HG

o combinaciones de los mismos.

13. El péptido cíclico de unión a c-Met para uso según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que en dicho método de tratamiento la terapia anti-Met se suministra como parte de una terapia de combinación con un tratamiento adicional, donde el tratamiento adicional se elige de:

35 (i) un inhibidor de EGFR;

(ii) un inhibidor de tirosina cinasa;

(iii) un inhibidor de VEGF;

(iv) quimioterapia de cáncer estándar;

(v) un inhibidor de β-catenina.

40 14. Un péptido cíclico de unión a c-Met para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que dicho método comprende llevar a cabo la imagenología y determinación de las etapas (ii) y (iii) respectivamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en uno o más intervalos temporales después del inicio de dicha terapia.

15. El péptido cíclico de unión a c-Met para uso según la reivindicación 14, en el que dicha terapia anti-Met es como se define en la reivindicación 12 o la reivindicación 13.