(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 745 635**

(51) Int. Cl.:

A61K 51/08	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07B 59/00	(2006.01)
A61K 103/10	(2006.01)
A61K 103/20	(2006.01)
A61K 103/30	(2006.01)
A61K 101/02	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2013** **PCT/US2013/061712**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014** **WO14052471**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2013** **E 13815181 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019** **EP 2900279**

(54) Título: **Antagonistas de GRPR para la detección, diagnóstico y tratamiento del cáncer positivo para GRPR**

(30) Prioridad:

25.09.2012 US 201261705513 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2020

(73) Titular/es:

ADVANCED ACCELERATOR APPLICATIONS USA, INC. (100.0%)
The Empire State Building, 350 5th Avenue, Suite 6902
New York, NY 10118, US

(72) Inventor/es:

MAINA-NOCK, THEODOSIA;
NOCK, BERTHOLD ARTUR y
DE JONG HENDRIKS, MARION

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 745 635 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

Antagonistas de GRPR para la detección, diagnóstico y tratamiento del cáncer positivo para GRPR

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. N.° 61/705.513 presentada el 25 de septiembre de 2012.

Estado de la técnica

Se ha demostrado que las células cancerosas expresan una variedad de biomoléculas específicas, tales como receptores peptídicos, que pueden servir como sitios de reconocimiento para una amplia gama de vectores circulantes, como por ejemplo ligandos peptídicos. En caso de que la expresión del receptor diana sea mayor en las células malignas que en el tejido sano circundante, surge la oportunidad de explotar la interacción entre estas dos entidades moleculares. Para aplicaciones de diagnóstico por imágenes o terapia dirigida, un ligando peptídico natural podría modificarse para unirse de manera estable a un radionucleido diagnóstico o terapéutico, por ejemplo, un radiometal o un radiohalógeno.

En muchos casos, un quelante bifuncional se acopla covalentemente a través de una funcionalidad carboxilo a la amina N-terminal del ligando peptídico para formar un enlace peptídico. Para aumentar la estabilidad biológica, hidrofilia, afinidad de unión al receptor y/o eficacia de internalización, se intentan modificaciones adicionales de los ligandos de receptores naturales, tales como reemplazos estratégicos de aminoácidos en la cadena peptídica. Como alternativa, la introducción de espaciadores adecuados entre el quelante y el sitio de reconocimiento del receptor peptídico o la multimerización de hetero/homo péptidos puede conducir igualmente a mejoras ventajosas de muchos parámetros biológicos que eventualmente mejoran la farmacocinética general y la acumulación objetivo de la sonda radiactiva.

El conjugado péptido-quelato resultante después de marcar con un radionucleido diagnóstico o un radionucleido terapéutico (radiopéptido) se administra al paciente. El radiopéptido se acumula selectivamente en el(los) sitio(s) de cáncer a través de la interacción específica con la molécula diana, es decir, su receptor peptídico afín, altamente expresado en el tumor. En el caso de un radionucleido de diagnóstico, el tumor y las metástasis se localizan después mediante imágenes del sitio o de los sitios donde se produce la desintegración radiactiva utilizando un dispositivo de imagen externo. Cuando el conjugado péptido-quelato se marca con un radionucleido terapéutico, se suministra una carga radiotóxica específicamente al tumor primario y sus metástasis. El radionucleido terapéutico se desintegrará en el sitio o los sitios de cáncer, liberando energía corpuscular para destruir o reducir (el crecimiento de) las lesiones.

Esta estrategia se ha aprovechado con elegancia en el área de la somatostatina y sus receptores. Estos últimos se expresan abundantemente en una variedad de tumores humanos, y especialmente en tumores neuroendocrinos (NET por sus siglas en inglés). El advenimiento de OctreoScan® ([^{111}In-DTPA] octreotida) en la práctica clínica para el diagnóstico exitoso de imágenes de NET se siguió pronto por muchos nuevos análogos de somatostatina mejorados marcados con una amplia gama de radiometales médicamente relevantes, útiles no solo para imágenes convencionales con una cámara gamma, sino también para PET y, lo más importante, para terapia con radionucleidos. Los ensayos clínicos en curso han revelado la eficacia terapéutica de estos nuevos radiopéptidos.

Los receptores peptídicos y sus ligandos han surgido como herramientas moleculares atractivas en el diagnóstico y la terapia del cáncer. Por ejemplo, la expresión de alta densidad de los receptores del péptido liberador de gastrina (GRPR) se ha documentado en varios tumores humanos frecuentes, como el cáncer de próstata, el carcinoma de mama y el cáncer de pulmón. Como consecuencia, los GRPR han estado ganando impulso recientemente como dianas moleculares preferidas para péptidos similares a la bombesina radiomarcados con el objetivo de mejorar el arsenal diagnóstico y terapéutico de la oncología nuclear.

La bombesina (BBN) es un tetradecapéptido aislado inicialmente de la piel de la rana europea *Bombina bombina*. La bombesina y sus péptidos relacionados afectan a la termorregulación y a la ingesta de alimentos después de unirse a receptores específicos en seres humanos. Estos receptores comprenden tres subtipos en mamíferos, el receptor de neuromedina B (NMBR o BB_1R) con una alta afinidad por NMB, el GRPR (o BB_2R) con una alta afinidad por GRP y el BB_3R, que es un receptor huérfano sin ligando conocido aún identificado. La BBN de anfibios se une a los subtipos NMBR y GRPR con una alta afinidad. NMB y GRP son los homólogos mamíferos de la BBN de anfibios y todos están relacionados en estructura.

La mayoría de los péptidos tipo BBN radiomarcados desarrollados para la obtención de imágenes moleculares y la terapia con radionucleidos de tumores humanos se han basado en BBN natural o en su fragmento octapeptídico C-terminal que todavía puede unirse a GRPR. Estos análogos modificados, como se detalla anteriormente, muestran generalmente propiedades agonísticas y se internalizan en la región intracelular de las células malignas después de unirse a GRPR. Esta propiedad se traduce en una alta acumulación del radiomarcador en las lesiones $GRPR^+$, mejorando así la sensibilidad diagnóstica o la eficacia terapéutica.

Desafortunadamente, los péptidos tipo BBN son potentes agonistas de GRPR, que provocan efectos adversos relacionados con la motilidad gastrointestinal y la termorregulación cuando se administran por vía intravenosa (iv) en seres humanos, incluso en pequeñas cantidades. Además, los péptidos tipo BBN son mitogénicos. Las propiedades anteriores han restringido la validación clínica exhaustiva y/o la eventual explotación comercial de algunas bombesinas radiomarcadas basadas en agonistas prometedoras. Esto es particularmente relevante en el caso de la terapia con radionucleidos dirigidos por la cual se deben administrar, por vía iv, cantidades más altas de péptidos en pacientes.

A diferencia de los agonistas de BBN radiomarcados, los agonistas de somatostatina radiomarcados, que se internalizan igualmente bien en células malignas que expresan el receptor de somatostatina, no provocan efectos fisiológicos indeseables después de la inyección intravenosa en seres humanos. Este hecho ha fomentado la validación clínica extendida y sistemática de algunas somatostatinas radiomarcadas prometedoras incluso en el dominio de la terapia tumoral con radionucleidos.

El radiotrazador ([^{99m}Tc] Demobesina 1, [^{99m}Tc-N_4']DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NHEt) es conocido y se utiliza en ratones que portan xenoinjertos de PC-3 de cáncer de próstata humanos, donde [^{99m}Tc] Demobesina 1 mostró propiedades farmacocinéticas excepcionalmente superiores en comparación con agonistas afines basados en bombesina similares, como por ejemplo [^{99m}Tc] Demobesina 3-6. Además de su acumulación en tumores significativamente mayor, [^{99m}Tc] Demobesina 1 se aclaró muy rápidamente del cuerpo de los ratones y del páncreas, un órgano fuertemente positivo para GRPR.

Aunque los primeros estudios en un número limitado de pacientes con cáncer de próstata verificaron la excelente tolerabilidad del radiotrazador, revelaron un perfil farmacocinético subóptimo en seres humanos que impidió una mayor aplicación clínica como una herramienta de diagnóstico por imagen. Más específicamente, [^{99m}Tc] Demobesina 1 a pesar de su rápido aclaramiento del cuerpo y del páncreas y su bastante buena estabilidad *in vivo*, mostró retención insuficiente en lesiones malignas en seres humanos en comparación con los agonistas tipo BBN radiomarcados. Así mismo, se diseñó [^{99m}Tc] Demobesina 1 para la obtención de imágenes de diagnóstico utilizando una cámara gamma convencional o SPECT y no es adecuado para aplicaciones de terapia con PET o radionucleidos. Aunque el marcado con el radionucleido para PET ^{94m}Tc es factible por medio del sistema N_4 acíclico, el uso médico de este radionucleido está restringido tanto por características nucleares subóptimas como por una producción inconveniente. Por otro lado, las opciones terapéuticas están restringidas a $^{186/188}$Re, ya que el quelante N_4 no puede unirse de manera estable a la mayoría de los radiometales bivalentes y trivalentes utilizados en medicina nuclear.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es lograr una alta captación y retención de un radiomarcador diagnóstico y terapéutico selectivamente para el cáncer GRPR$^{+,}$, tanto primario como metastásico.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a sondas para su uso en la detección, obtención de imágenes, diagnosis, direccionamiento, tratamiento, etc. de cánceres que expresan el receptor del péptido liberador de gastrina (GRPR). Tales sondas pueden ser moléculas conjugadas con marcadores detectables que son restos adecuados para la detección por imágenes gamma y SPECT o por tomografía por emisión de positrones (PET). Tales sondas también pueden ser moléculas conjugadas con restos que contienen un radionucleido terapéutico y son capaces de suministrar una carga citotóxica tal como un radionucleido terapéutico en el sitio o los sitios de la enfermedad. La invención es como se define por las reivindicaciones.

La solicitud describe un antagonista de GRPR de la fórmula general:

MC-S-P

en donde:

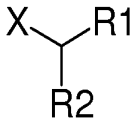
- al menos un (radio)metal (**M**) y un quelante (**C**) que se une de forma estable a **M**; alternativamente, MC puede representar una Tyr o un grupo prostético que porta un (radio)halógeno;
S es un espaciador opcional unido covalentemente entre el extremo N-terminal de **P** y **C** y puede seleccionarse para proporcionar un medio para (radio)halogenación;
P es un antagonista peptídico del receptor de GRP de la fórmula general:

Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6-Xaa_7-CO-Z

Xaa_1 no está presente o se selecciona del grupo que consiste en restos de los aminoácidos Asn, Thr, Phe, 3-(2-tienil)alanina (Thi), 4-clorofenilalanina (Cpa), α-naftilalanina (α-Nal), β-naftilalanina (β-Nal), Ácido 1,2,3,4-tetrahidronorharman-3-carboxílico (Tpi), Tyr, 3-yodo-tirosina (o-I-Tyr), Trp, pentafluorofenilalanina (5-F-Phe) (todos como isómeros L o D);

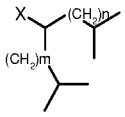
Xaa_2 es Gln, Asn, His

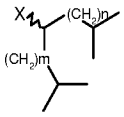
Xaa_3 es Trp, Ácido 1,2,3,4-tetrahidronorharman-3-carboxílico (Tpi)
Xaa_4 es Ala, Ser, Val
Xaa_5 es Val, Ser, Thr
Xaa_6 es Gly, sarcosina (Sar), D-Ala, β-Ala
Xaa_7 es His, (3-metil)histidina (3-Me)His
Z se selecciona de -NHOH, $-NHNH_2$, -NH-alquilo, $-N(alquilo)_2$, u -O-alquilo
o

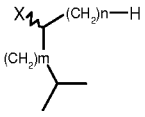


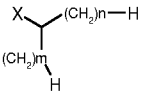
en donde X es NH (amida) u O (éster) y R1 y R2 son iguales o diferentes y se seleccionan de un protón, un alquilo (sustituido), un alquiléter (sustituido), un arilo, un ariléter o un alquil-, halógeno, hidroxilo o grupo aromático hidroxialquilo sustituido.

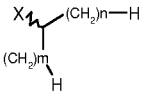
En el antagonista de GRPR como se describe anteriormente, Z se selecciona preferentemente de una de las siguientes fórmulas, en donde X es NH u O:

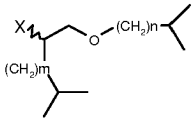

m = n = 0, 1, 2, 3

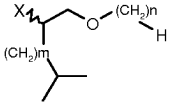

m # n = 0, 1, 2, 3

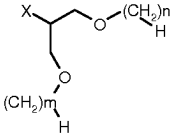

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...9

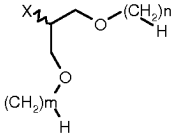

m = n = 0, 1, 2,...9

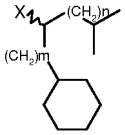

m # n = 0, 1, 2,...9

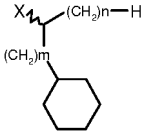

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...5

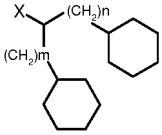

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...7

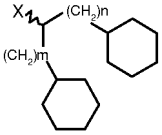

m = n = 1, 2, 3,...7

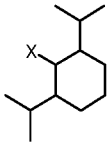

m # n = 1, 2, 3,...7

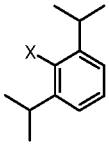

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...7

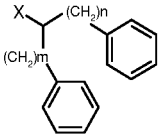

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9

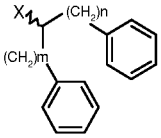

m = n = 0, 1, 2, 3

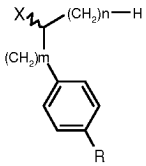

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9





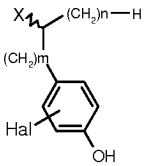

m = n = 0, 1, 2, 3


m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



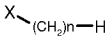
R = H, Cl, Br, I

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9

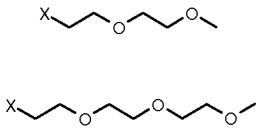


Hal = Cl, Br, I

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



n = 1, 2, 3,...10



.

Además, en determinados aspectos, el antagonista de GRPR es como se describe anteriormente y R1 es igual a R2.

En algunos de los aspectos descritos anteriormente, **P** se selecciona del grupo que consiste en:

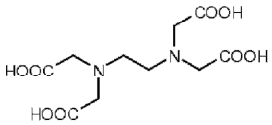
DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-CO-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:1);
DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-CO-O-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:2);
DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-CO-NH-CH(CH_2-CH_2-CH_2-CH_3)$_2$ (SEQ ID NO:3);
DTyr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-CO-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO: 4).

En algunas de las realizaciones descritas anteriormente, el radionucleido metálico **M** o el radiohalógeno es adecuado para su uso diagnóstico o terapéutico, en particular para la obtención de imágenes o terapia con radionucleidos y se selecciona del grupo que consiste en ^{111}In, ^{133m}In, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ^{67}Ga, ^{66}Ga, ^{68}Ga, ^{52}Fe, ^{69}Er, ^{72}As, ^{97}Ru, ^{203}Pb, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{51}Cr, ^{52m}Mn, ^{157}Gd, ^{177}Lu, ^{161}Tb, ^{169}Yb, ^{175}Yb, ^{105}Rh, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{153}Sm, ^{149}Pm, ^{151}Pm, ^{172}Tm, ^{121}Sn, ^{177m}Sn, ^{213}Bi, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{198}Au, ^{199}Au, halógenos: ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{18}F, entre otros.

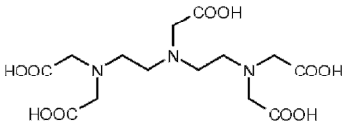
En algunas de las realizaciones descritas anteriormente, el quelante metálico **C** es un quelante metálico para metales di y trivalentes.

En algunas de las realizaciones descritas anteriormente, el quelante metálico para metales di y trivalentes es un quelante basado en DTPA, NOTA, DOTA o TETA o un derivado mono o bifuncional del mismo.

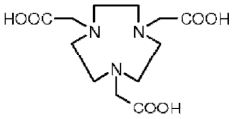
En algunas de las realizaciones descritas anteriormente, el quelante metálico **C** se selecciona del grupo que consiste en:



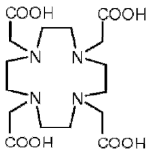
EDTA



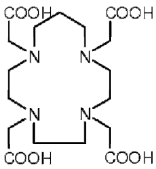
DTPA



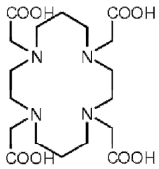
NOTA



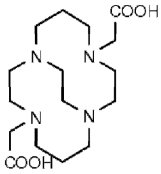
DOTA



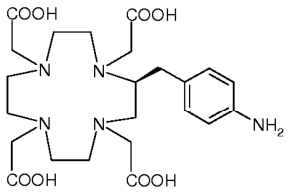
TRITA



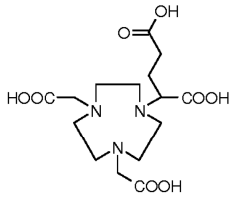
TETA



CB-TE2A



DOTA bifuncional

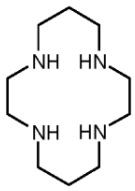


NOTA bifuncional

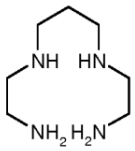
En algunas de las realizaciones descritas anteriormente, el quelante metálico **C** es un quelante metálico para tecnecio o renio.

En algunas de las realizaciones descritas anteriormente, **C** se selecciona de quelantes de tetraamina- acíclica, ciclam-, PnAO o tetradentados que contienen conjuntos de átomos donantes P_2S_2-, N_2S_2- y N_3S y derivados mono y bifuncionales de los mismos, o quelantes basados en HYNIC/coligando, o quelantes bi- y tridentados que forman complejos organometálicos a través de la tecnología de tricarbonilo.

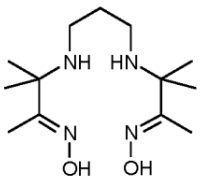
En algunas de las realizaciones descritas anteriormente, **C**se selecciona del grupo que consiste en:



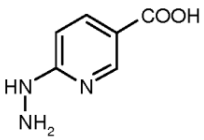
ciclam



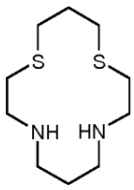
N_4



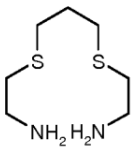
PnAO



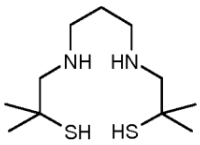
HYNIC



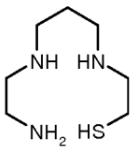
N_2S_2-ciclam



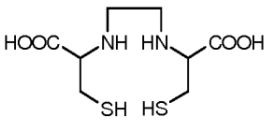
S_2N_2



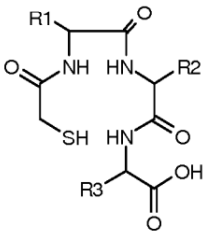
N_2S_2



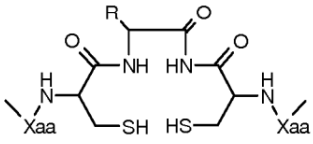
N_3S



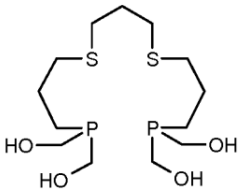
ECD



MAG_3 (R1 = R2 = R3 = H)

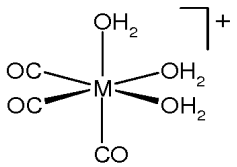


-Xaa-Cys-Xaa-Cys-Xaa-



P_2S_2

o:

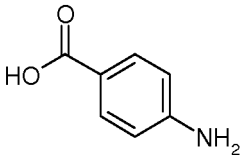


M = Tc, Re

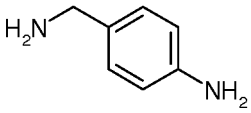
En algunos de los aspectos descritos anteriormente, el espaciador **S** se encuentra unido entre **P** y **C** por enlaces covalentes y puede seleccionarse para proporcionar un medio de (radio)yodación.

En algunos de los aspectos descritos anteriormente, **S** se selecciona del grupo que consiste en:

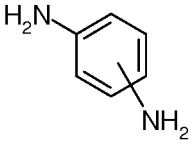
a) restos que contienen arilo de las fórmulas:



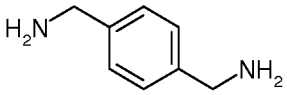
PABA



PABZA



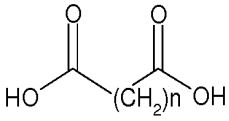
PDA



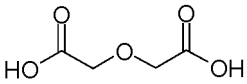
PAMBZA

en donde PABA es ácido p-aminobenzoico, PABZA es p-aminobencilamina, PDA es fenilendiamina y PAMBZA es p-(aminometil)bencilamina;

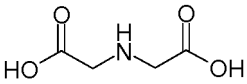
b) ácidos dicarboxílicos, ácidos ω-aminocarboxílicos, ácidos α,ω-diaminocarboxílicos o diaminas de las fórmulas:



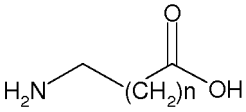
n = 0, 1, 2,...



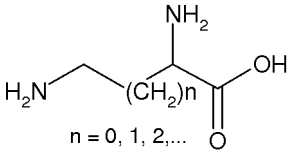
DIG



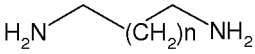
IDA



n = 0, 1, 2,...



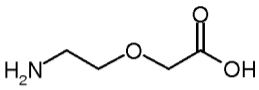
n = 0, 1, 2,...



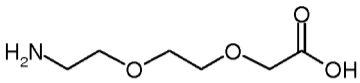
n = 0, 1, 2,...

en donde DIG es ácido diglicólico e IDA es ácido iminodiacético;

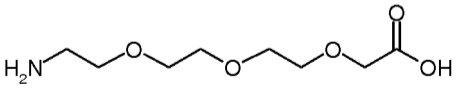
c) espaciadores de PEG de varias longitudes de cadena, en particular espaciadores de PEG seleccionados de las fórmulas:



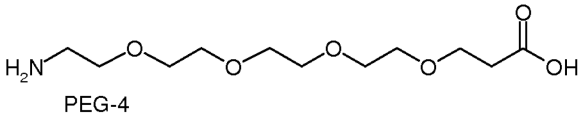
PEG-1



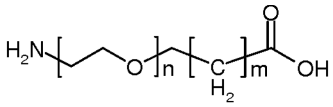
PEG-2



PEG-3

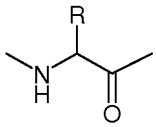


PEG-4

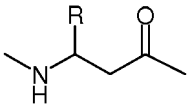


n = 1, 2, 3,... hasta 36
m = 0, 1, 2, 3, 4, 5

c) aminoácidos α- y β, cadenas simples u homólogas de varias longitudes de cadena o cadenas heterólogas de varias longitudes de cadena, en particular:



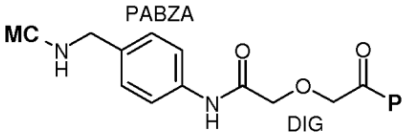
Xaa



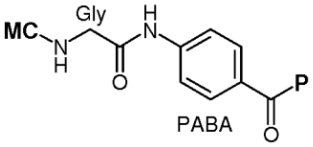
βXaa

GRP(1-18), GRP(14-18), GRP(13-18), BBN(1-5) o [Tyr[4]]BBN(1-5); o
(d) combinaciones de a, b y c.

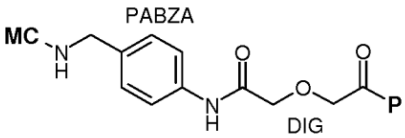
En algunos de los aspectos descritos anteriormente, se divulga un antagonista de GRPR seleccionado del grupo que consiste en compuestos de las fórmulas:



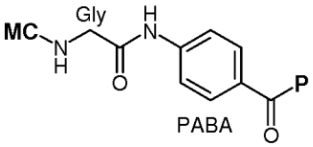
PABZA: p-aminobencilamina
DIG: ácido diglicólico



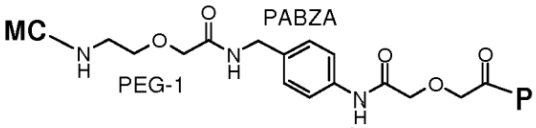
PABA: ácido p-aminobenzoico



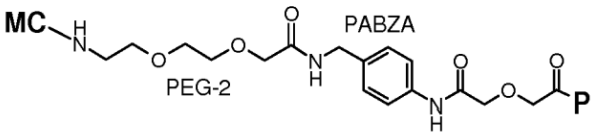
PABZA: p-aminobencilamina
DIG: ácido diglicólico



PABA: ácido p-aminobenzoico



Ácido diglicólico



Ácido diglicólico

en donde MC y P son como se define en cualquiera de los anteriores.

En determinadas realizaciones, la invención está dirigida a un antagonista de GRPR de acuerdo con las reivindicaciones para su uso como medicamento.

En determinadas realizaciones, la invención está dirigida a un antagonista de GRPR de acuerdo con las reivindicaciones para su uso como agente de diagnóstico o terapéutico para detectar, diagnosticar o tratar el cáncer $GRPR^+$ primario y/o metastásico.

En determinadas realizaciones, la invención está dirigida a un antagonista de GRPR de acuerdo con las reivindicaciones, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer microcítico de pulmón, carcinoma de colon, tumores estromales gastrointestinales, gastrinoma, carcinomas de células renales, tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos, tumores de células escamosas esofágicas, neuroblastomas, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, así como en tumores ováricos, endometriales y pancreáticos que muestran vasculatura relacionada con neoplasia que es $GRPR^+$.

En determinadas realizaciones, la invención está dirigida a un antagonista de GRPR de acuerdo con las reivindicaciones para su uso como se describe en una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el cáncer es un cáncer humano.

Determinadas realizaciones de la invención están dirigidas a una composición terapéutica, que comprende un antagonista de GRPR de acuerdo con las reivindicaciones y un excipiente terapéuticamente aceptable.

Descripción de las figuras

Figura 1A. Muestra la biodistribución de [^{111}In] NeoBOMB-1 (^{111}In-DOTA- (ácido p-aminobencilamina-diglicólico)-[D-Phe^6, His^{12}-CO-NHCH[$(CH_2CH(CH_3)_2]_2$,*des*-Leu^{13},*des*-Met^{14}]BBN (6-14)) en ratones SCID hembra que portan tumores de PC-3 ($hGRPR^+$).
Figura 1B. Muestra un radiocromatograma de sangre de ratón *ex vivo* 5 min después de la inyección de [^{111}In] NeoBOMB-1.
Figura 1C. Muestra la biodistribución de [^{177}Lu]NeoBOMB-1 (^{177}Lu-DOTA-(ácido p-aminobencilamina-diglicólico)-[D-Phe^6, His^{12}-CO-NHCH[$(CH_2CH(CH_3)_2]_2$,*des*-Leu^{13},*des*-Met^{14}]BBN (6-14)) en ratones SCID hembra que portan tumores de PC-3 ($hGRPR^+$).
Figura 1D. Muestra un radiocromatograma de sangre de ratón *ex vivo* 5 min después de la inyección de [^{177}Lu]NeoBOMB-1.
Figura 1E. Muestra la biodistribución de [^{67}Ga]NeoBOMB-1 (^{67}Ga-DOTA-(ácido p-aminobencilamina-diglicólico)-[D-Phe^6,His^{12}-CO-NHCH[$(CH_2CH(CH_3)_2]_2$,*des*-Leu^{13},*des*-Met^{14}]BBN (6-14)) en ratones SCID hembra que portan tumores de PC-3 ($hGRPR^+$).
Figura 1F. Muestra un radiocromatograma de sangre de ratón *ex vivo* 5 min después de la inyección de [^{67}Ga]NeoBOMB-1.
Figura 2A. Muestra la biodistribución de [^{99m}Tc]NeoBOMB-2 (^{99m}Tc-N_4- (ácido p-aminobencilamina-diglicólico)-[D-Phe^6,His^{12}-CO-NHCH[$(CH_2$-$CH(CH_3)_2]_2$,*des*-Leu^{13},*des*-Met^{14}]BBN (6-14)) en ratones SCID hembra que portan tumores de PC-3 ($hGRPR^+$).
Figura 2B. Muestra un radiocromatograma de sangre de ratón *ex vivo* 5 min después de la inyección de [^{99m}Tc]NeoBOMB-2.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones. La investigación que condujo a la invención ha revelado inesperadamente una ruta alternativa para el direccionamiento eficaz *in vivo* de tumores positivos para somatostatina, a saber, el uso de antagonistas de los receptores de somatostatina. Lo más sorprendente y en contra de su incapacidad para internalizarse, tales análogos han mostrado una captación y retención mucho mayor en xenoinjertos de animales y un periodo de reposo muy rápido de los tejidos de fondo.

Una explicación tentativa para la mayor captación tumoral de los antagonistas de receptores de somatostatina es su capacidad para unirse a un número significativamente mayor de la población global de receptores de somatostatina disponible en la membrana celular de las células cancerosas que sus homólogos agonistas internalizantes.

De acuerdo con la invención, los antagonistas de GRPR se modifican químicamente para acomodar un radionucleido de diagnóstico y/o terapéutico que se unen de manera estable. Después de la administración en un sujeto humano o animal, sirven como vehículo molecular para transferir una señal de radiodiagnóstico y/o una carga radiotóxica en el tumor primario $GRPR^+$ y sus metástasis.

Más específicamente, de acuerdo con la invención, se descubrió que la administración de determinados radioligandos novedosos basados en antagonistas de GRPR dio como resultado inesperadamente una captación alta y específica sin precedentes y una retención notablemente prolongada de xenoinjertos $GRPR^+$ humanos en ratones en contraste con [^{99m}Tc] Demobesina 1. Así mismo, estos agentes mostraron una estabilidad metabólica significativamente mayor después de la inyección en ratones, en comparación con [^{99m}Tc] Demobesina 1.

Los antagonistas de GRPR de la invención tienen importantes diferencias estructurales en relación con el motivo original [^{99m}Tc] Demobesina 1. En primer lugar, su marcado con una amplia gama de radiometales bivalentes y trivalentes, pero también con ^{99m}Tc y $^{186/188}$Re, es posible mediante el acoplamiento de quelantes bifuncionales adecuados en su extremo N además de los marcos relacionados con la tetraamina. De esta manera, es posible obtener imágenes de radiodiagnóstico con SPECT y PET con emisores gamma y positrones, mientras que también es factible el marcado con emisores beta, Auger y alfa, lo que abre la oportunidad para aplicaciones terapéuticas. A continuación, su estabilidad metabólica y su perfil farmacocinético, especialmente en términos de retención tumoral, han mejorado en gran medida, como lo demuestran los resultados preclínicos de biodistribución en ratones SCID hembra que portan xenoinjertos de PC-3 humanos presentados en longitud.

Más específicamente, la estructura de los análogos divulgados en el presente documento comprende las siguientes partes:

a) El quelante unido al extremo N: puede ser una tetraamina acíclica o cíclica, HYNIC, quelantes N_3S- y derivados de los mismos, poliaminas lineales o cíclicas y poliaminopolicarboxilatos como DTPA, EDTA, DOTA, NOTA, NOTAGA, TETA y sus derivados, entre otros. Además, se puede introducir en esta posición un grupo adecuado, tal como un grupo prostético o una Tyr, para marcar con radiohalógenos;
b) El radionucleido: puede ser i) un emisor gamma, tales como ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{67}Ga, ^{131}I, ^{125}I, entre otros, adecuado para la obtención de imágenes con una cámara gamma convencional, un SPECT o un sistema híbrido SPECT/CT o SPECT/MRI; ii) un emisor de positrones, tal como ^{68}Ga, ^{66}Ga, ^{64}Cu, ^{86}Y, ^{44}Sc, ^{124}I, ^{18}F, entre otros, adecuado para la obtención de imágenes con un PET o un sistema híbrido PET/CT o PET/MRI o iii) un emisor beta, Auger o alfa, tal como ^{186}Re, ^{188}Re, ^{90}Y, ^{177}Lu, ^{111}In, ^{67}Cu, ^{212}Bi, ^{175}Yb, ^{47}Sc, ^{131}I, ^{125}I, etc., adecuado para terapia con radionucleidos;
c) El espaciador entre el quelante y el motivo peptídico, que puede variar en longitud, tipo y lipofilicidad y puede incluir PEGx (x = 0-20), aminoácidos naturales y no naturales, azúcares, restos alquilamino o combinaciones de los mismos;
d) La cadena peptídica, con reemplazos estratégicos de aminoácidos llevados a cabo con D-aminoácidos, aminoácidos no naturales y otros restos adecuados.
e) El extremo C, en el que se han omitido tanto la Leu^{13} como la Met^{14}-NH_2 en la secuencia de BBN original. La His^{12} terminal está presente como la forma amidada o éster, por lo que las amidas o los ésteres pueden estar representados por varias mono- y di-alquilamidas, amidas aromáticas o alquil-arilamidas mixtas, o ésteres de alquilo y/o arilo.

La solicitud divulga antagonistas de GRPR de la fórmula general

MC-S-P

en donde:

MC es un quelato metálico, que comprende:

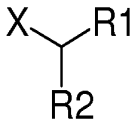
- al menos un (radio)metal (**M**) y un quelante (**C**) que se une de forma estable a **M**; alternativamente, **MC** puede representar una Tyr o un grupo prostético que porta un (radio)halógeno.

S es un espaciador opcional unido covalentemente entre el extremo N-terminal de **P** y **C** y puede seleccionarse para proporcionar un medio para (radio)halogenación;
P es un antagonista peptídico del receptor de GRP de la fórmula general:

$$Xaa_1\text{-}Xaa_2\text{-}Xaa_3\text{-}Xaa_4\text{-}Xaa_5\text{-}Xaa_6\text{-}Xaa_7\text{-}CO\text{-}Z$$

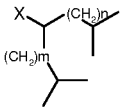
en donde:

Xaa_1 no está presente o se selecciona del grupo que consiste en restos de los aminoácidos Asn, Thr, Phe, 3-(2-tienil)alanina (Thi), 4-clorofenilalanina (Cpa), α-naftilalanina (α-Nal), β-naftilalanina (β-Nal), Ácido 1,2,3,4-tetrahidronorharman-3-carboxílico (Tpi), Tyr, 3-yodo-tirosina (o-I-Tyr), Trp, pentafluorofenilalanina (5-F-Phe) (todos como isómeros L o D);
Xaa_2 es Gln, Asn, His
Xaa_3 es Trp, Ácido 1,2,3,4-tetrahidronorharman-3-carboxílico (Tpi)
Xaa_4 es Ala, Ser, Val
Xaa_5 es Val, Ser, Thr
Xaa_6 es Gly, sarcosina (Sar), D-Ala, β-Ala
Xaa_7 es His, (3-metil)histidina (3-Me)His
Z se selecciona de -NHOH, $-NHNH_2$, -NH-alquilo, $-N(alquilo)_2$, u -O-alquilo
o

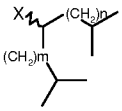


en donde X es NH (amida) u O (éster) y R1 y R2 son iguales o diferentes y se seleccionan de un protón, un alquilo (sustituido), un alquiléter (sustituido), un arilo, un ariléter o un alquil-, halógeno, hidroxilo o grupo aromático hidroxialquilo sustituido.

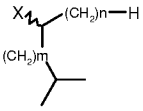
Z se selecciona preferentemente de una de las siguientes fórmulas, en donde X es NH u O:



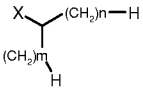
m = n = 0, 1, 2, 3



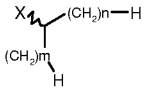
m # n = 0, 1, 2, 3



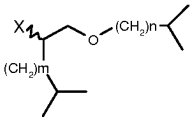
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...9



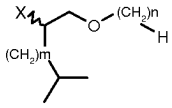
m = n = 0, 1, 2,...9



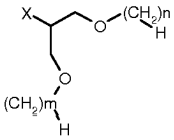
m # n = 0, 1, 2,...9



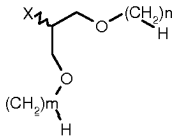
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...5



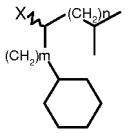
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...7



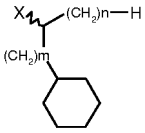
m = n = 1, 2, 3,...7



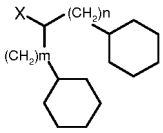
m # n = 1, 2, 3,...7



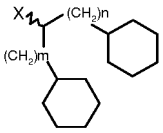
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...7



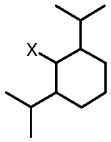
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9

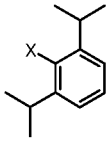


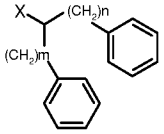
m = n = 0, 1, 2, 3



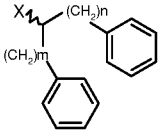
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



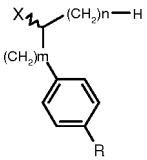




m = n = 0, 1, 2, 3

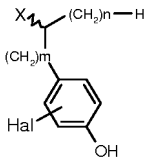


m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



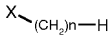
R = H, Cl, Br, I

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9

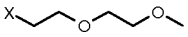


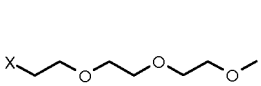
Hal = Cl, Br, I

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



n = 1, 2, 3,...10





Preferentemente, R1 es lo mismo que R2.

En los antagonistas de GRPR divulgados en el presente documento, P se selecciona preferentemente del grupo que consiste en:

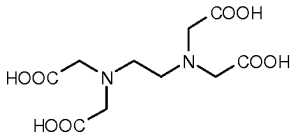
DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-CO-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:1);
DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-CO-O-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:2);
DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-CO-NH-CH(CH_2-CH_2-CH_2-CH_3)$_2$ (SEQ ID NO:3);
DTyr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-CO-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO: 4).

El radionucleido, un metal **M** o un halógeno, es adecuado para uso diagnóstico o terapéutico, en particular para la obtención de imágenes o la terapia con radionucleidos y preferentemente seleccionado del grupo que consiste en ^{111}In, ^{133m}In, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ^{67}Ga, ^{66}Ga, ^{68}Ga, ^{52}Fe, ^{69}Er, ^{72}As, ^{97}Ru, ^{203}Pb, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{51}Cr, ^{52m}Mn, ^{157}Gd, ^{177}Lu, ^{161}Tb, ^{169}Yb, ^{175}Yb, ^{105}Rh, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{153}Sm, ^{149}Pm, ^{151}Pm, ^{172}Tm, ^{121}Sn, ^{177}mSn, ^{213}Bi, ^{142}Pr,

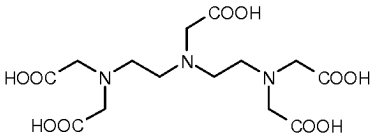
^{143}Pr, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{18}F entre otros.

El quelante metálico **C** es preferentemente un quelante metálico para metales di y trivalentes, y es en particular un quelante basado en DTPA, NOTA, DOTA o TETA o un derivado mono o bifuncional de los mismos.

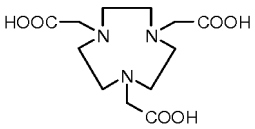
Preferentemente, el quelante metálico **C** se selecciona del grupo que consiste en:



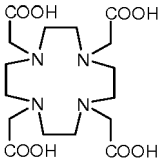
EDTA



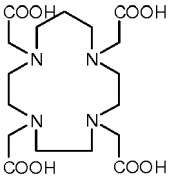
DTPA



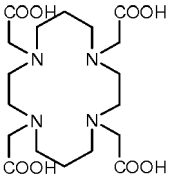
NOTA



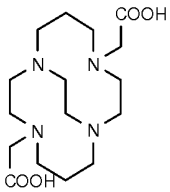
DOTA



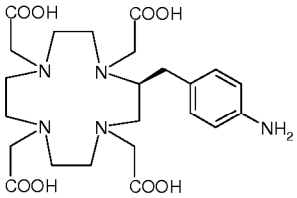
TRITA



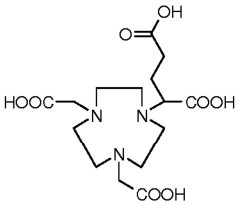
TETA



CB-TE2A



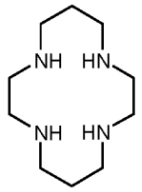
DOTA bifuncional



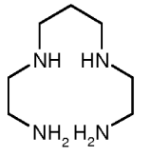
NOTA bifuncional

Cuando el quelante metálico **C** es un quelante metálico para tecnecio o renio, se selecciona preferentemente de quelantes de tetraamina acíclica, ciclam, PnAO o tetradentados acíclicos que contienen conjuntos de átomos de donantes P_2S_2-, N_2S_2- N_3S- y derivados mono y bifuncionales de los mismos, o quelantes basados en HYNIC/coligando, o quelantes bi y tridentados que forman complejos organometálicos a través de la tecnología tricarbonilo.

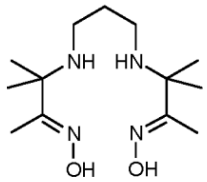
Ejemplos adecuados de **C** son:



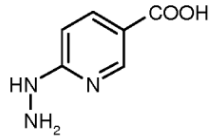
ciclam



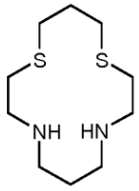
N_4



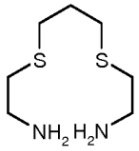
PnAO



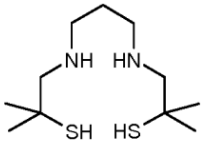
HYNIC



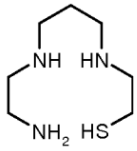
N_2S_2-ciclam



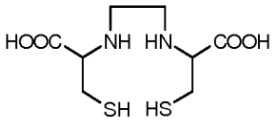
S_2N_2



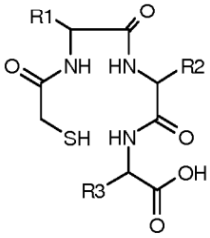
N_2S_2



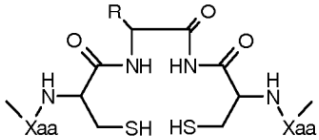
N_3S



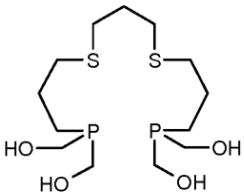
ECD



MAG_3 (R1 = R2 = R3 = H)

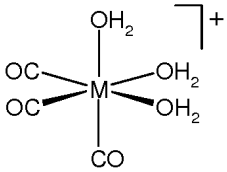


-Xaa-Cys-Xaa-Cys-Xaa-



P_2S_2

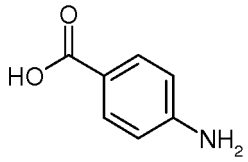
o:



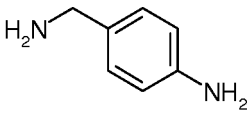
M = Tc, Re

El espaciador **S** se encuentra unido entre **P** y **C** por enlaces covalentes y puede seleccionarse para proporcionar un medio para usar un radiohalógeno, tal como (radio)yodación. El espaciador se selecciona preferentemente del grupo que consiste en:

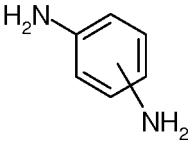
a) restos que contienen arilo de las fórmulas:



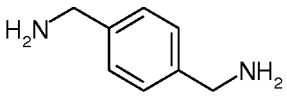
PABA



PABZA



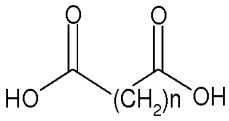
PDA



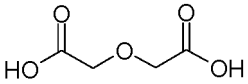
PAMBZA

en donde PABA es ácido p-aminobenzoico, PABZA es p-aminobencilamina, PDA es fenilendiamina y PAMBZA es p-(aminometil)bencilamina;

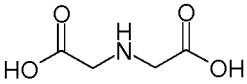
b) ácidos dicarboxílicos, ácidos ω-aminocarboxílicos, ácidos α,ω-diaminocarboxílicos o diaminas de las fórmulas:



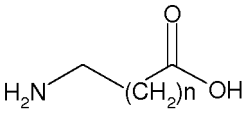
n = 0, 1, 2,...



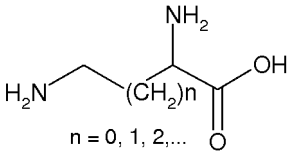
DIG



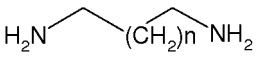
IDA



n = 0, 1, 2,...



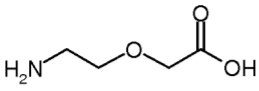
n = 0, 1, 2,...



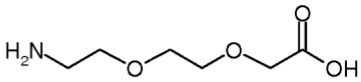
n = 0, 1, 2,...

en donde DIG es ácido diglicólico e IDA es ácido iminodiacético;

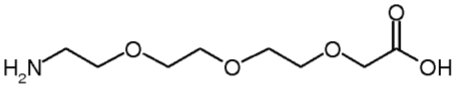
c) espaciadores de PEG de varias longitudes de cadena, en particular espaciadores de PEG seleccionados de las fórmulas:



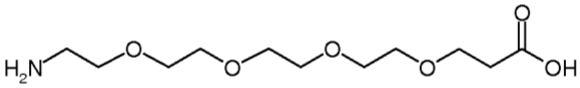
PEG-1



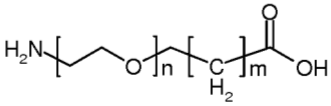
PEG-2



PEG-3

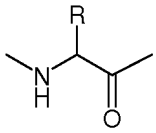


PEG-4

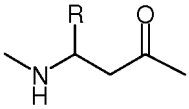


n = 1, 2, 3,... hasta 36
m = 0, 1, 2, 3, 4, 5

d) aminoácidos α- y β, cadenas simples u homólogas de varias longitudes de cadena o cadenas heterólogas de varias longitudes de cadena, en particular:



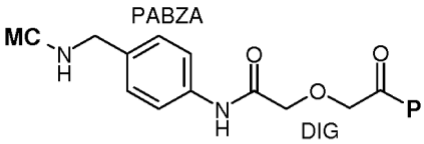
Xaa



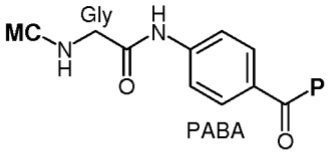
βXaa

GRP(1-18), GRP(14-18), GRP(13-18), BBN(1-5) o [Tyr^4]BBN(1-5); o

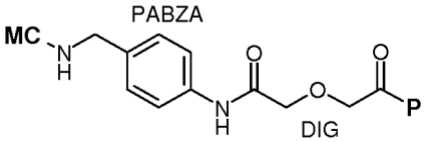
e) combinaciones de a, b y c. Los antagonistas de GRPR divulgados en el presente documento se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en compuestos de las fórmulas:



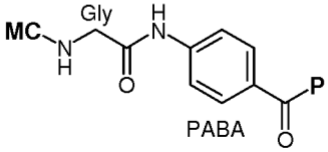
PABZA: p-aminobencilamina
DIG: ácido diglicólico



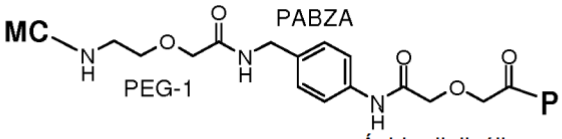
PABA: ácido p-aminobenzoico



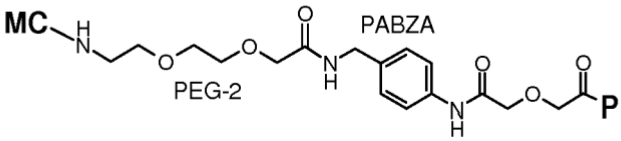
PABZA: p-aminobencilamina
DIG: ácido diglicólico



PABA: ácido p-aminobenzoico



Ácido diglicólico



Ácido diglicólico

en donde **MC** y **P** son como se definen anteriormente.

Se entiende que las estructuras químicas específicas divulgadas en el presente documento son ejemplos ilustrativos de varios antagonistas de GRPR de la fórmula general: **MC-S-P.**

La invención se refiere adicionalmente a una composición terapéutica, que comprende un antagonista de GRPR como se reivindica y un excipiente terapéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a los antagonistas de GRPR como se reivindica para su uso como un medicamento. El medicamento es preferentemente un agente de diagnóstico o terapéutico para diagnosticar o tratar cánceres GRPR$^+$ primarios y/o metastásicos, tales como cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer microcítico de pulmón, carcinoma de colon, tumores estromales gastrointestinales, gastrinoma, carcinomas de células renales, tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos, tumores de células escamosas esofágicas, neuroblastomas, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, por mencionar algunos de los pocos, así como en la vasculatura de los tumores de ovario, endometrio y pancreático.

La invención se ilustrará adicionalmente en los Ejemplos que siguen.

Ejemplo

INTRODUCCIÓN

Los compuestos de la invención se prepararon y probaron como se describe a continuación. Las siguientes realizaciones divulgadas son representativas de la invención, que puede realizarse de diversas formas. Los detalles estructurales, funcionales y de procedimiento específicos se divulgan en los siguientes ejemplos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Radiomarcado y QC

Marcado con ^{111}In

Se adquirió Cloruro de indio (In-III) en HCl 50 mM de Mallinckrodt Medical B.V., Petten, Países Bajos, a una concentración de actividad de 10-20 mCi/ml. Por lo general, los conjugados DOTA-péptido de la presente invención se radiomarcaron con Indio-111 a actividades específicas de 0,1-0,2 mCi In-111/nmol de conjugado DOTA-péptido. En resumen, se mezclaron 3-15 nmol de conjugado DOTA-péptido disuelto en agua con 2,5-12,5 µl de tampón de acetato de sodio 1,0 M pH 4,6, 1-5 µl de ascorbato de sodio 0,1 M en agua y 30-150 µl de $^{111}InCl_3$ (0,3-3,0 mCi). La mezcla de reacción de radiomarcado se incubó en un baño de agua hirviendo durante 20 a 30 min. Para el control de calidad, se inactivó una parte alícuota de 2 µl de la solución de radiomarcado con 28 µl de una solución tamponada con acetato de Na_2-EDTA (5 mM, pH 4,6). Después de un radiomarcado exitoso (más del 95% de radioactividad unida a péptido) se añadió Na_2-EDTA (0,1 M, pH 4,6) a la solución de radiomarcado a una concentración final de 1 mM.

Marcado con ^{67}Ga

Se obtuvo cloruro de galio (Ga-67) en HCl diluido a una concentración de actividad de 498 - 743 mCi/ml de Nordion, Wesbrook Mall, Vancouver, Canadá o con una concentración de actividad de 80 mCi/ml de Mallinckrodt Medical B.V., Petten, Países Bajos.

Por lo general, los conjugados DOTA-péptido de la presente invención se radiomarcaron con Galio-67 a actividades específicas de 0,1-0,2 mCi Ga-67/nmol de conjugado DOTA-péptido. En resumen, Se mezclaron 3-15 nmol de conjugado DOTA-péptido disuelto en agua con 50-125 µl de tampón de acetato sódico 1,0 M pH 4,0 y 5-15 µl de $^{67}GaCl_3$ (0,5-3,0 mCi. La mezcla de reacción de radiomarcado se incubó en un baño de agua hirviendo durante 30 min. Para el control de calidad HPLC, se inactivó una parte alícuota de 2 µl de la solución de radiomarcado con 28 µl de una solución tamponada con acetato de Na_2-EDTA (5 mM, pH 4,0). Después de un radiomarcado exitoso (más del 95% de radioactividad unida a péptido) se añadió Na_2-EDTA (0,1 M, pH 4,0) a la solución de radiomarcado a una concentración final de 1 mM.

Marcado con ^{177}Lu

Se adquirió Cloruro de lutecio (Lu-177) en HCl 50 mM de BID Radiopharmacy, Países Bajos, a una concentración de actividad de 100 mCi/ml.

Por lo general, los conjugados DOTA-péptido de la presente invención se radiomarcaron con Lutecio-177 una actividad específica de hasta 0,5 mCi Lu-177/nmol de conjugado DOTA-péptido. En resumen, se mezclaron 3-15 nmol de conjugado DOTA-péptido disuelto en agua con 4-16 µl de tampón de acetato sódico 1,0 M pH 4,6 y 15-75 µl de $^{67}GaCl_3$ (1,5-7,5 mCi). La radiolisis se minimizó mediante la adición de 5 µl de ácido gentísico (80 mM) disuelto en ascorbato de sodio 0,2 M. La mezcla de reacción se incubó en un baño de agua hirviendo durante 30 min. Para el control de calidad HPLC, se inactivó una parte alícuota de 2 µl de la solución de radiomarcado con 28 µl de una solución tamponada con acetato de Na_2-EDTA (5 mM, pH 4,6). Después de un radiomarcado exitoso (más del 95% de radioactividad unida a péptido) se añadió Na_2-EDTA (0,1 M, pH 4,6) a la solución de radiomarcado a una concentración final de 1 mM.

Marcado con ^{99m}Tc

Los péptidos acoplados a tetraamina se disolvieron en ácido acético 50 mM/EtOH 8/2 v/v hasta una concentración final de péptido de 1 mM. Cada solución a granel se distribuyó en partes alícuotas de 50 µl en tubos Eppendorf y se almacenó a -20 °C. El marcado se realizó en un vial Eppendorf, en el que se agregaron consecutivamente las siguientes soluciones: i) tampón fosfato 0,5 M pH 11,5 (50 pL), ii) citrato sódico 0,1 M (5 pL, iii) [^{99m}Tc]$NaTcO_4$ eluato generador (415 ml, 10-20 mCi), iv) solución madre de conjugado peptídico (15 pL, 15 nmol) y v) solución de $SnCl_2$ recién hecha en EtOH (30 pg, 15 pL). Después de la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente, el pH se llevó a ~ 7 agregando HCl 1 M (10 pL).

Control de Calidad

Los análisis de HPLC se realizaron en un cromatógrafo de Waters (Waters, Viena, Austria) eficaz con un sistema de suministro de solvente 600; el cromatógrafo se acopló a instrumentación de detección doble, que comprende un detector UV de matriz de fotodiodos (modelo Waters 996 o modelo 2998) y un detector gamma Gabi de Raytest (RSM Analytische Instrumente GmbH, Alemania). El procesamiento de datos y la cromatografía se controlaron mediante el software Millennium o Empower 2 (Waters, EE. UU.). Se eluyó una columna XBridge Shield RP18 (5 pm, 4,6 x 150 mm, Waters, Irlanda) acoplada a la respectiva columna de protección de 2 cm a una velocidad de flujo de 1 ml/min con un sistema de gradiente lineal que comienza desde 10% de B y avanza a 70 % de B en 60 min, con disolvente A = ácido trifluoroacético acuoso al 0,1% y disolvente B = acetonitrilo.

Estudio metabólico en Ratones

Inyección de radioligando y extracción de sangre

Se inyectó un bolo que contenía el radioligando en solución salina normal (100-150 pL, ≈3 nmol, 200-500 pCi) en la vena de la cola de ratones albinos suizos. Los animales se mantuvieron durante 5 minutos en una jaula con acceso al agua y después se sacrificaron rápidamente por punción cardíaca mientras estaban bajo anestesia leve con éter. Se recogió sangre (500-900 pL) del corazón con una jeringa y se transfirió en un tubo Eppendorf previamente enfriado en hielo.

Separación de plasma y preparación de muestras

La sangre se centrifugó para eliminar las células sanguíneas (10 min, 2000 g/4 °C). El plasma se recogió, se mezcló con acetonitrilo (MeCN) en una proporción de 1/1 v/v y se centrifugó de nuevo (10 min, 15000 g/4 °C). Los sobrenadantes se concentraron a un pequeño volumen (flujo suave de N_2 a 40 °C), se diluyeron con solución salina (≈ 400 µl) y se filtraron a través de un filtro Millex GV (0,22 µm).

Análisis por HPLC para la detección de radiometabolitos

Se cargaron alícuotas de muestras de plasma (preparadas como se describe anteriormente) en una columna RPM Symmetry Shield que se eluyó a un caudal de 1,0 ml/min con el siguiente gradiente: 100% de A a 90% de A en 10 minutos y de 90% de A a 60% durante los siguientes 60 minutos (A = 0,1% de TFA acuoso (v/v) y B = MeCN). La elución de los radiocomponentes se controló mediante un detector gamma. Para ^{99m}Tc-radiopéptidos, el análisis ITLC-SG se realizó en paralelo usando acetona como eluyente para detectar trazas de liberación de TcO_4^-(TcO_4^-Rf = 1,0).

Estudios en ratones portadores de tumores GRPR$^+$

Inducción de tumores

Se inyectó subcutáneamente un bolo de ≈150 µl que contenía una suspensión de 1,5 x 10^7 células PC-3 humanas recién cosechadas en solución salina normal en los flancos de ratones SCID hembra. Los animales se mantuvieron en condiciones asépticas y 2-3 semanas más tarde desarrollaron tumores bien palpables en el sitio de inoculación (80-150 mg).

Biodistribución y cálculo de resultados

El día del experimento, se inyectó el radiopéptido seleccionado en la vena de la cola de ratones portadores de tumor como un bolo de 100 µl (1-2 µCi, 10 pmol de péptido total; en solución salina/EtOH 9/1 v/v). Los animales se sacrificaron en grupos de cuatro con anestesia leve con éter mediante punción cardíaca en puntos de tiempo predeterminados pi (posteriores a la inyección). Se inyectaron conjuntamente conjuntos adicionales de tres a cuatro animales con exceso de [Tyr^4] BBN (≈40 nmol) junto con el radiopéptido de prueba y se sacrificaron a las 4 h pi (animales bloqueados). Las muestras de sangre y tejidos de interés se recogieron inmediatamente, se pesaron y se midieron para determinar la radiactividad en un contador γ. El estómago y los intestinos no se vaciaron de su contenido, sino que se midieron según se recogieron. Los datos de biodistribución se calcularon como el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) utilizando el programa Microsoft Excel con la ayuda de patrones adecuados de la dosis inyectada.

RESULTADOS

Los resultados de las diversas pruebas ilustrativas se describen a continuación en el presente documento, haciendo referencia a la figura correspondiente. Los detalles estructurales, funcionales y de procedimiento específicos se divulgan en los siguientes resultados.

Figura 1A: Biodistribución de [^{111}In]NeoBOMB-1 (^{111}In-DOTA-(ácido p-aminobencilamina-diglicólico)-[D-Phe^6,His^{12}-CO-NHCH[($CH_2CH(CH_3)_2]_2$,*des*-Leu^{13},*des*-Met^{14}]BBN (6-14)) en ratones SCID hembra que portan tumores de PC-3 (hGRPR$^+$) a las 4 h y 24 h pi. Las barras representan la captación promedio como % de dosis inyectada por gramo (% ID/g) de al menos 4 animales con desviación estándar; un grupo adicional de animales recibió un exceso de [Tyr^4]BBN

(100 pg) para el bloqueo del receptor *in vivo* a las 4 h pi. Bl= sangre, Li= hígado, He= corazón, Ki = riñones, St= estómago, In= intestinos, Sp= bazo, Mu= músculo, Lu= pulmones, Pa= páncreas, Fe= fémur y Tu= tumor de PC-3. Se observa una alta captación y retención en el tumor experimental con 28,6 ± 6,0% ID/g a las 4 h y 25,9 ± 6,6% ID/g a las 24 h. Un alto porcentaje de esta captación podría reducirse significativamente mediante la inyección conjunta del exceso de un análogo de bombesina natural.

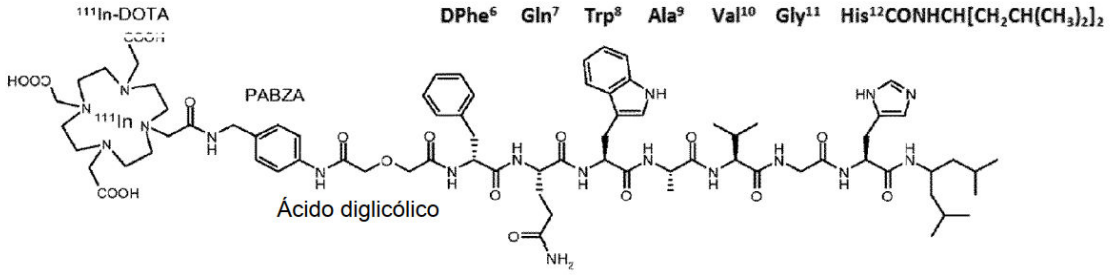


Figura 1B: Radiocromatograma de sangre de ratón *ex vivo* 5 min después de la inyección de [^{111}In] NeoBOMB-1. El porcentaje de péptido parental que permanece intacto es >91%.

Figura 1C: Biodistribución de [^{177}Lu]NeoBOMB-1 (^{177}Lu-DOTA-(ácido p-aminobencilamina-diglicólico)-[D-Phe^{6},His^{12}-CO-NHCH[($CH_2CH(CH_3)_2]_2$,*des*-Leu^{13},*des*-Met^{14}]BBN (6-14)) en ratones SCID hembra que portan tumores de PC-3 (hGRPR^{+}) a las 4, 24 y 72 h pi. Las barras representan la captación promedio como % de dosis inyectada por gramo (% ID/g) de al menos 4 animales con desviación estándar; un grupo adicional de animales recibió un exceso de [Tyr^{4}]BBN (100 pg) para el bloqueo del receptor *in vivo* a las 4 h pi. Bl= sangre, Li= hígado, He= corazón, Ki = riñones, St= estómago, In= intestinos, Sp= bazo, Mu= músculo, Lu= pulmones, Pa= páncreas, Fe= fémur y Tu= tumor de PC-3. La captación pancreática disminuye más rápidamente con el tiempo que la captación tumoral, lo que da como resultado relaciones de tumor a páncreas cada vez más altas, especialmente a las 72 h pi.

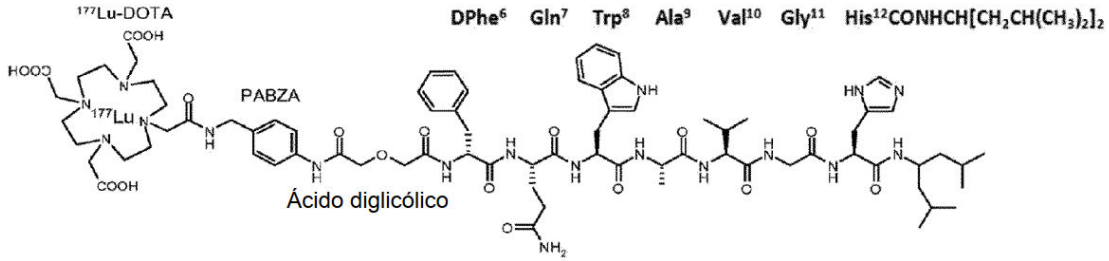


Figura 1D: El radiocromatograma de sangre de ratón *ex vivo* 5 min después de la inyección de [^{177}Lu]NeoBOMB-1, muestra que >92% de péptido parental permanece intacto.

Figura 1E: Biodistribución de [^{67}Ga]NeoBOMB-1 (^{67}Ga-DOTA-(ácido p-aminobencilamina-diglicólico)-[D-Phe^{6},His^{12}-CO-NHCH[($CH_2CH(CH_3)_2]_2$,*des*-Leu^{13},*des*-Met^{14}]BBN (6-14)) en ratones SCID hembra que portan tumores de PC-3 (hGRPR^{+}) a la 1 h y 4 h pi. Las barras representan la captación promedio como % de dosis inyectada por gramo (% ID/g) de al menos 4 animales con desviación estándar; un grupo adicional de animales recibió un exceso de [Tyr^{4}]BBN (100 pg) para el bloqueo del receptor *in vivo* a las 4 h pi. Bl= sangre, Li= hígado, He= corazón, Ki = riñones, St= estómago, In= intestinos, Sp= bazo, Mu= músculo, Lu= pulmones, Pa= páncreas, Fe= fémur y Tu= tumor de PC-3. El radiotrazador logra valores tumorales altos (> 30% ID/g) a 1 y 4 h pi.

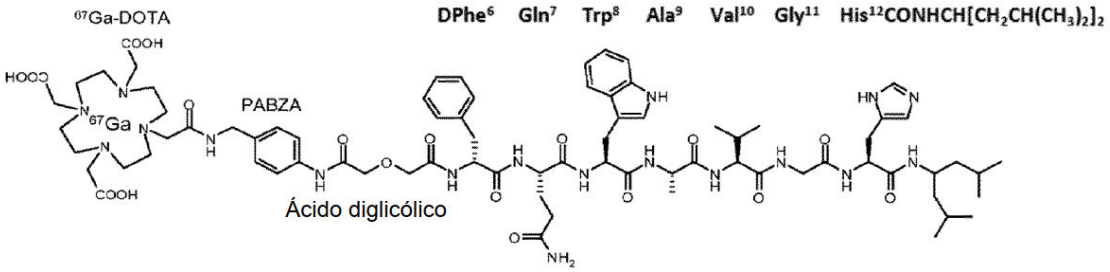


Figura 1F: El radiocromatograma de sangre de ratón *ex vivo* 5 min después de la inyección de [^{67}Ga]NeoBOMB-1,

muestra que >97 % de péptido parental permanece intacto.

Figura 2A: Biodistribución de [^{99m}Tc]NeoBOMB-2 (^{99m}Tc-N_4- (ácido p-aminobencilamina-diglicólico)-[D-Phe^6,His^{12}-CO-NHCH[(CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$,*des*-Leu^{13},*des*-Met^{14}]BBN (6-14)) en ratones SCID hembra que portan tumores de PC-3 (hGRPR$^+$) a 1 h, 4 h y 24 h pi. Las barras representan la captación promedio como % de dosis inyectada por gramo (% ID/g) de al menos 4 animales con desviación estándar; un grupo adicional de animales recibió un exceso de [Tyr^4]BBN (100 pg) para el bloqueo del receptor *in vivo* a las 4 h pi. Bl= sangre, Li= hígado, He= corazón, Ki = riñones, St= estómago, In= intestinos, Sp= bazo, Mu= músculo, Lu= pulmones, Pa= páncreas y Tu= tumor de PC-3. El radiotrazador logra valores tumorales altos (~ 30% ID/g) a 1 y 4 h pi, que permanecen excepcionalmente altos (> 25% ID/g) a las 24 h pi.

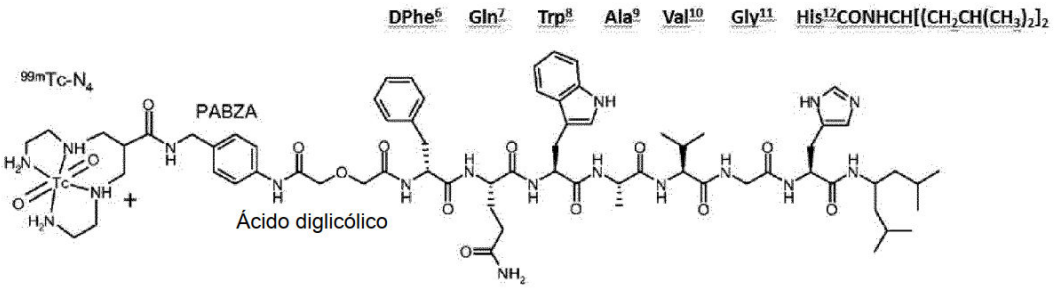


Figura 2B: El radiocromatograma de sangre de ratón *ex vivo* 5 min después de la inyección de [^{99m}Tc]NeoBOMB-2 muestra que >88 % del péptido precursor permanece intacto.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Advanced Accelerator Applications USA, Inc.

<120 > Antagonistas de GRPR para la Detección, Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Positivo para GRPR

<130> BET 15M0733

<140> EP13815181.6
<141> 25-09-2013

<150> 61/705.513
<151> 25-09-2012

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> /observación="DPhe"

<400> 1

```
Phe Gln Trp Ala Val Gly His
1               5
```

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> /observación="DPhe"

<400> 2

Phe Gln Trp Ala Val Gly His
1 5

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> /observación="DPhe"

<400> 3

Phe Gln Trp Ala Val Gly His
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> /observación="DTyr"

<400> 4

Thr Gln Trp Ala Val Gly His
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar=" " o "Asn" o "Thr" o "Thi" o "Cpa" o "alfa-Nal" o "beta-Nal" o "Tpi" o "Tyr" o "o-I-Tyr" o "Trp" o "5-F-Phe"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> /observación= "Los restos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para posiciones variantes"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> /reemplazar="Asn" o "His"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Tpi"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Ser" o "Val"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Ser" o "Thr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Sar" o "D-Ala" o "beta-Ala"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="(3-Me)His"

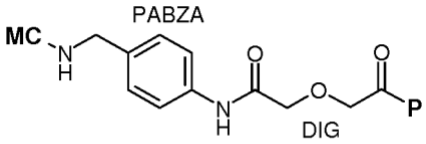
<400> 5

Phe Gln Trp Ala Val Gly His
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de GRPR radiomarcado de la fórmula general MC-S-P en donde:

M es un radiometal y C es un quelante metálico que se une de manera estable a M, o MC es una Tyr- o grupo prostético unido a un radiohalógeno, en donde M es el radiohalógeno;
S es un



PABZA: p-aminobencilamina
DIG: ácido diglicólico

espaciador unido covalentemente entre C y P, en donde S está ligado covalentemente al extremo N de P; y P es DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-CO-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:1).

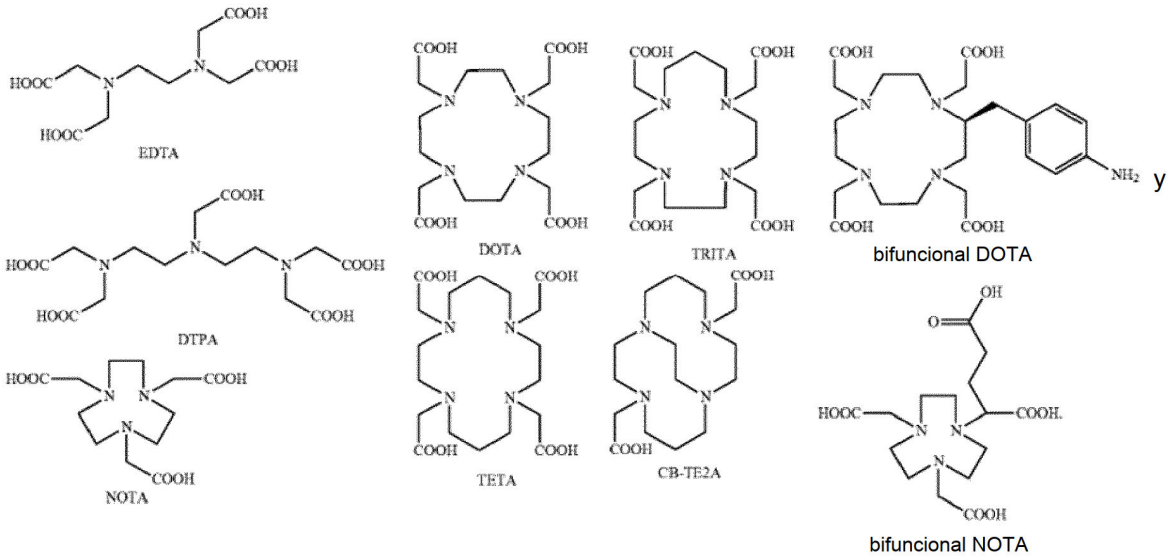
2. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en la reivindicación 1, en donde M se selecciona entre el grupo que consiste en ^{111}In, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ^{67}Ga, ^{66}Ga, ^{68}Ga, ^{52}Fe, ^{69}Er, ^{72}As, ^{97}Ru, ^{203}Pb, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{51}Cr, ^{52m}Mn, ^{157}Gd, ^{177}Lu, ^{161}Tb, ^{169}Yb, ^{175}Yb, ^{105}Rh, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{153}Sm, ^{149}Pm, ^{151}Pm, ^{172}Tm, ^{121}Sn, ^{177m}Sn, ^{213}Bi, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, y ^{18}F.

3. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en la reivindicación 2, en donde M es ^{111}In, ^{177}Lu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{99m}Tc, ^{186}Re o ^{188}Re.

4. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el quelante metálico C es un quelante metálico para metales di y trivalentes.

5. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en la reivindicación 4, en donde el quelante metálico para metales di y trivalentes es un quelante DTPA, NOTA, DOTA o TETA o un derivado de los mismos, incluyendo derivados bifuncionales de los mismos.

6. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el quelante metálico C se selecciona del grupo que consiste en:

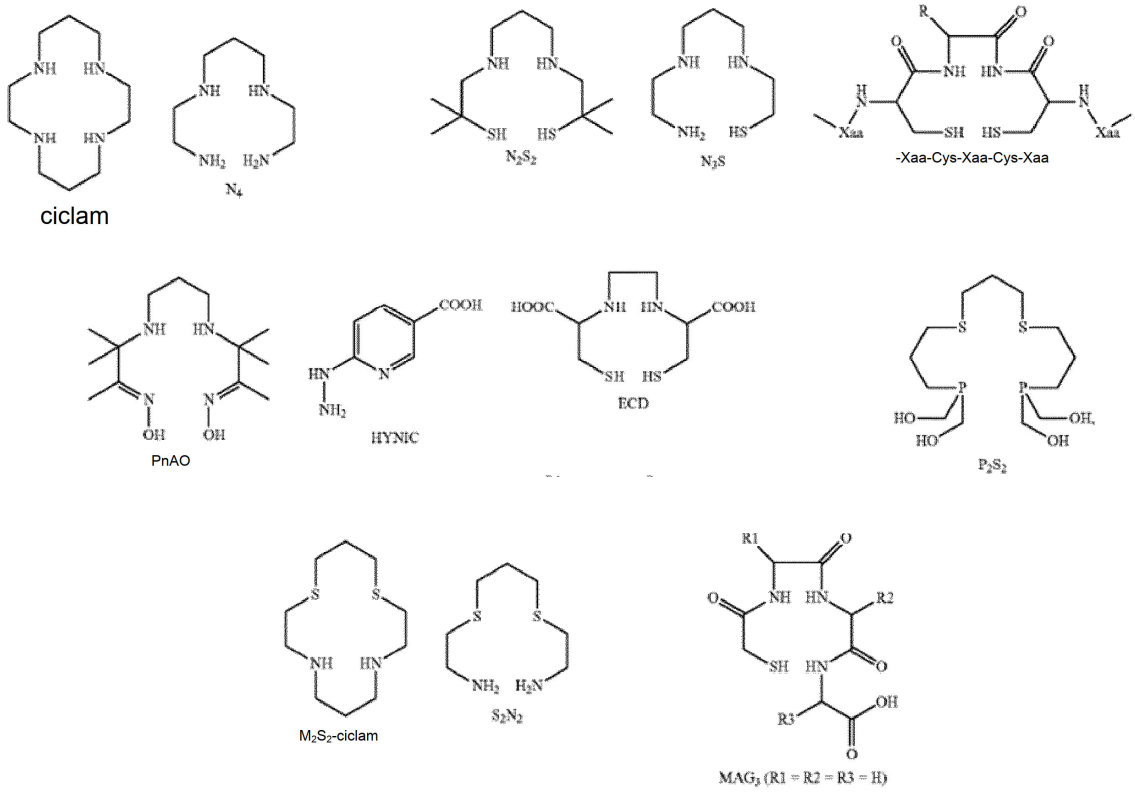


7. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el quelante metálico C es un quelante metálico para tecnecio o renio.

8. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en la reivindicación 1, en donde C es un quelante metálico

para radionucleidos de tecnecio o renio seleccionados del grupo que consiste en quelantes de tetraamina acíclica, ciclam, PnAO, tetradentados que contienen conjuntos de átomos donantes seleccionados del grupo que consiste en P_2S_2-, N_2S_2- y N_3S-, derivados de dichos quelantes tetradentados, derivados bifuncionales de dichos quelantes tetradentados, quelantes basados en HYNIC/coligando, y quelantes bi y tridentados que forman complejos organometálicos mediante la tecnología tricarbonilo.

9. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en la reivindicación 1, en donde C se selecciona del grupo que consiste en:



y derivados bifuncionales de los mismos.

10. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso como un medicamento.

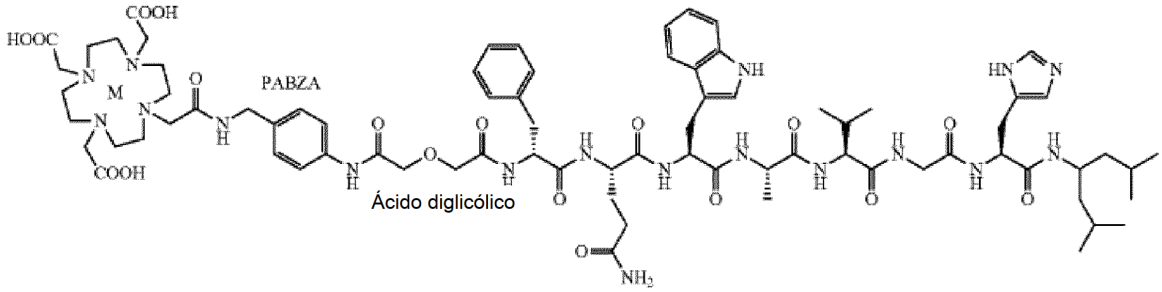
11. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso como agente de diagnóstico o terapéutico para detectar, diagnosticar o tratar cáncer primario y/o metastásico positivo para GRPR.

12. El antagonista de GRPR radiomarcado para su uso como se reivindica en la reivindicación 11, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer microcítico de pulmón, carcinoma de colon, tumores estromales gastrointestinales, gastrinoma, carcinomas de células renales, tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos, tumores de células escamosas esofágicas, neuroblastomas, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, así como en tumores ováricos, endometriales y pancreáticos que muestran vasculatura relacionada con neoplasia que es GRPR positiva.

13. El antagonista de GRPR radiomarcado para su uso como se reivindica en la reivindicación 12, en donde el cáncer es un cáncer humano.

14. Una composición diagnóstica y/o terapéutica, que comprende el antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y un excipiente terapéuticamente aceptable.

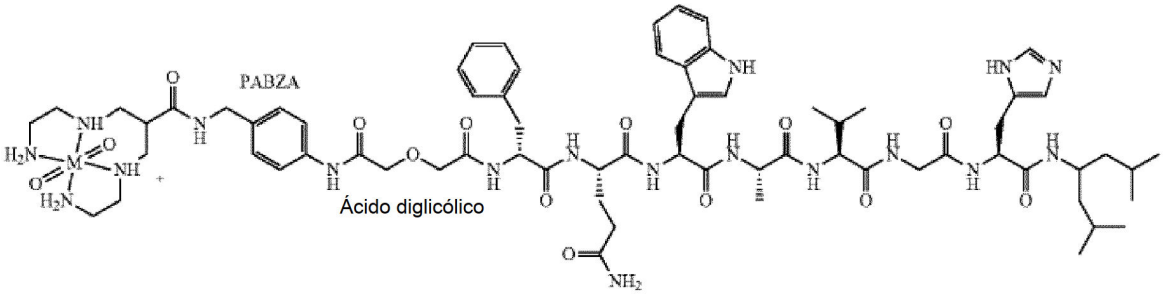
15. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el antagonista es NeoBOMB-1:



(M-DOTA-(ácido p-aminobencilamina-diglicólico)-[DPhe^{6},His^{12}-CO-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$,*des*-Leu^{13},*des*-Met^{14}] BBN(6-14)).

16. El antagonista de GRPR radiomarcado de la reivindicación 15, en donde M es ^{111}In, ^{177}Lu, ^{67}Ga, ^{68}Ga.

17. El antagonista de GRPR radiomarcado como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el antagonista es NeoBOMB-2:



(M-N_4-(ácido p-aminobencilamina-diglicólico)-[DPhe^{6},His^{12}-CO-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$,*des*-Leu^{13} *des*-Met^{14}] BBN(6-14)).

18. El antagonista de GRPR radiomarcado de la reivindicación 17, en donde M es ^{99m}TC, ^{186}Re o ^{188}Re.

19. Una composición diagnóstica y/o terapéutica, que comprende un antagonista de GRPR como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 15-18 y un excipiente terapéuticamente aceptable.

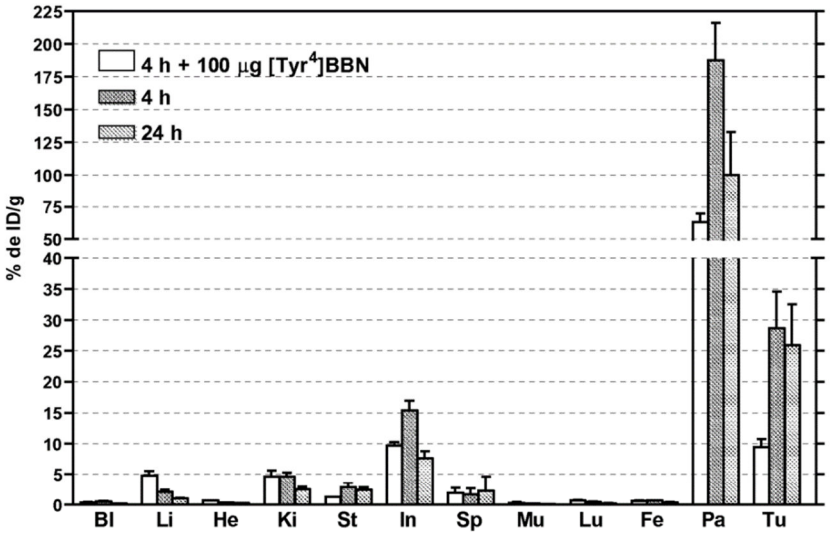

4 h + 100 μg [Tyr4]BBN
4 h
24 h
% de ID/g
225
200
175
150
125
100
75
50
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Bl
Li
He
Ki
St
In
Sp
Mu
Lu
Fe
Pa
Tu

FIG. 1A

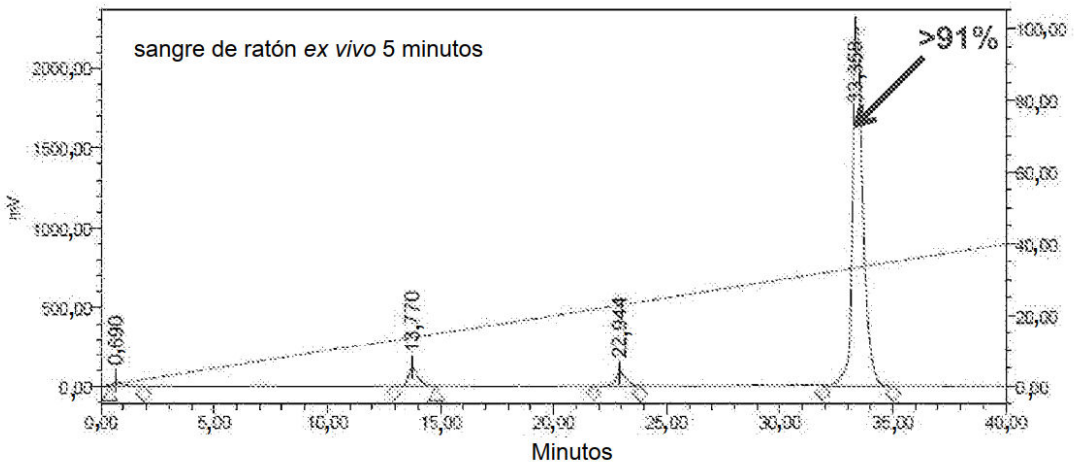

sangre de ratón *ex vivo* 5 minutos
>91%
0,690
13,770
22,944
33,358
mV
2000,00
1500,00
1000,00
500,00
0,00
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
30,00
35,00
40,00
Minutos

FIG. 1B

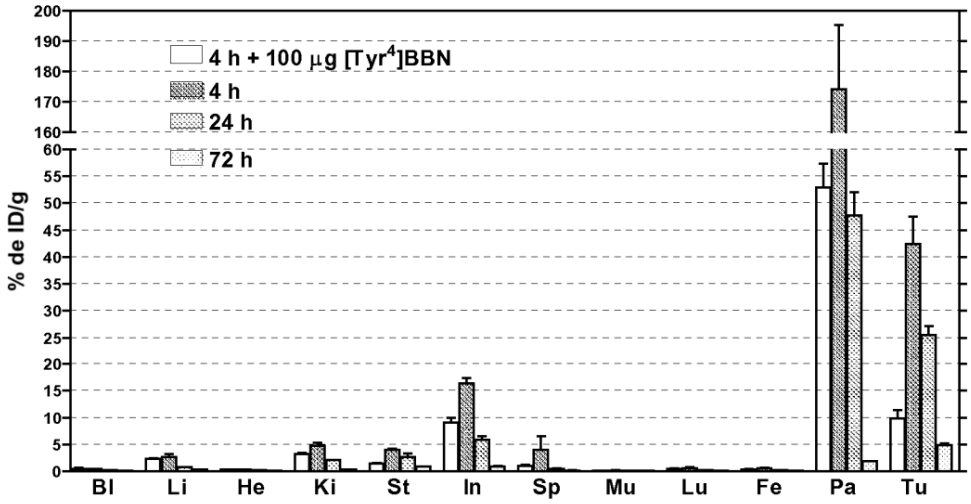

4 h + 100 μg [Tyr4]BBN
4 h
24 h
72 h
% de ID/g
200
190
180
170
160
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Bl
Li
He
Ki
St
In
Sp
Mu
Lu
Fe
Pa
Tu

FIG. 1C

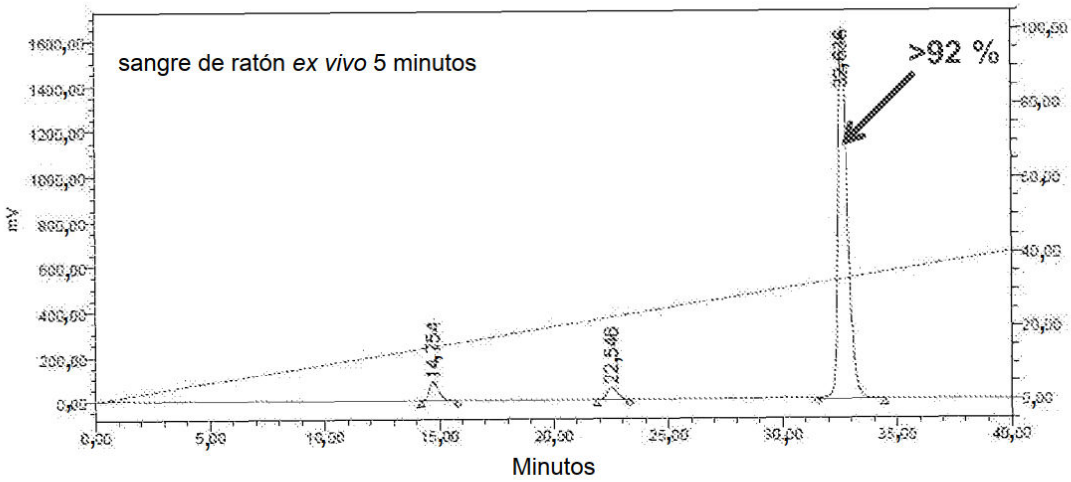


FIG. 1D

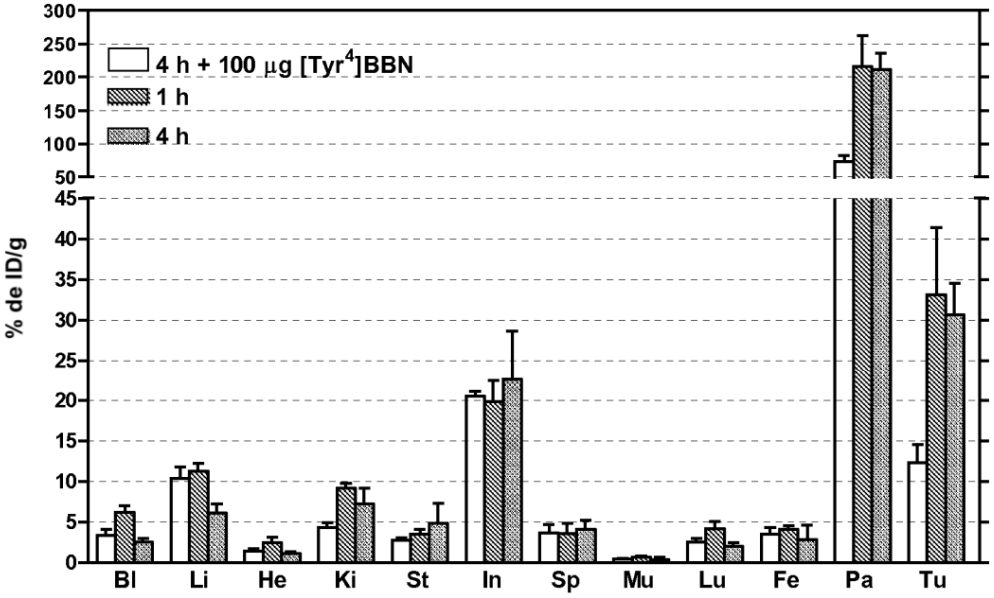

4 h + 100 µg [Tyr4]BBN
1 h
4 h
% de ID/g
300
250
200
150
100
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Bl
Li
He
Ki
St
In
Sp
Mu
Lu
Fe
Pa
Tu

FIG. 1E

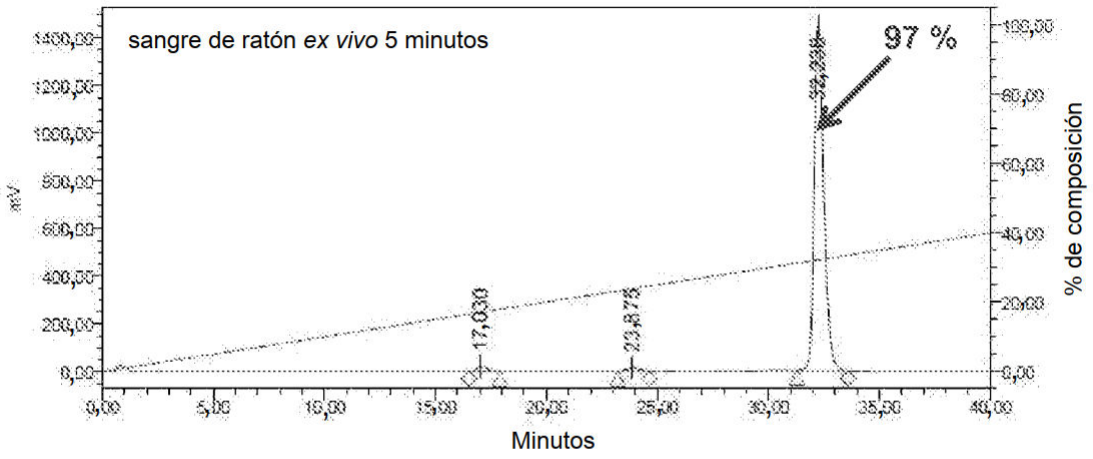

sangre de ratón *ex vivo* 5 minutos
97 %
17,030
23,875
mV
% de composición
Minutos

FIG. 1F

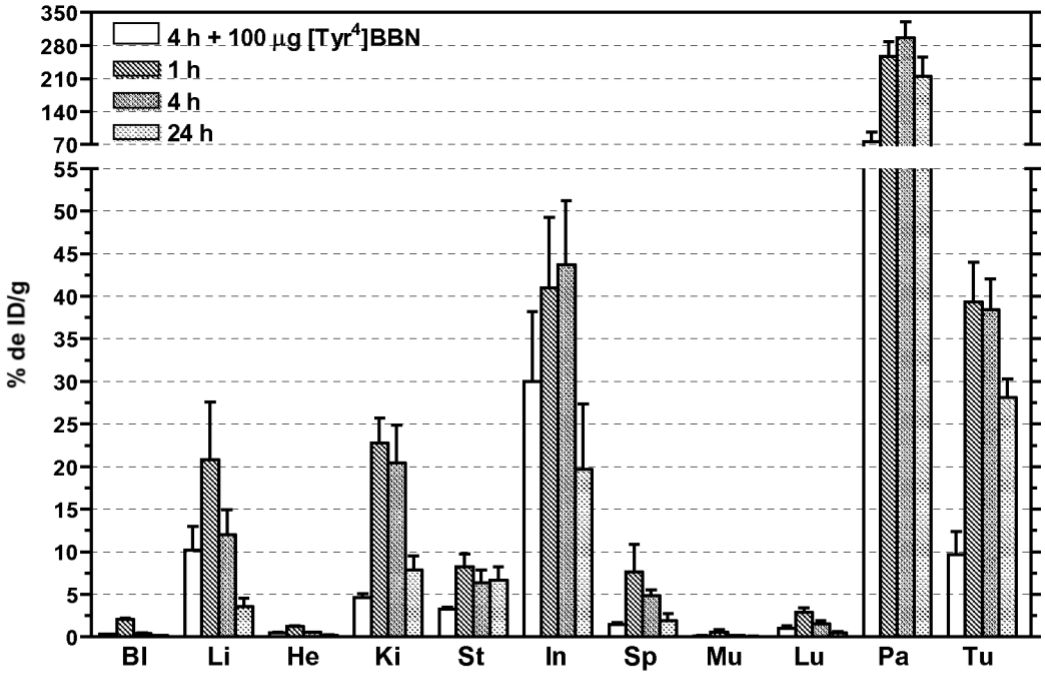

4 h + 100 µg [Tyr4]BBN
1 h
4 h
24 h
% de ID/g
350
280
210
140
70
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Bl
Li
He
Ki
St
In
Sp
Mu
Lu
Pa
Tu

FIG. 2A

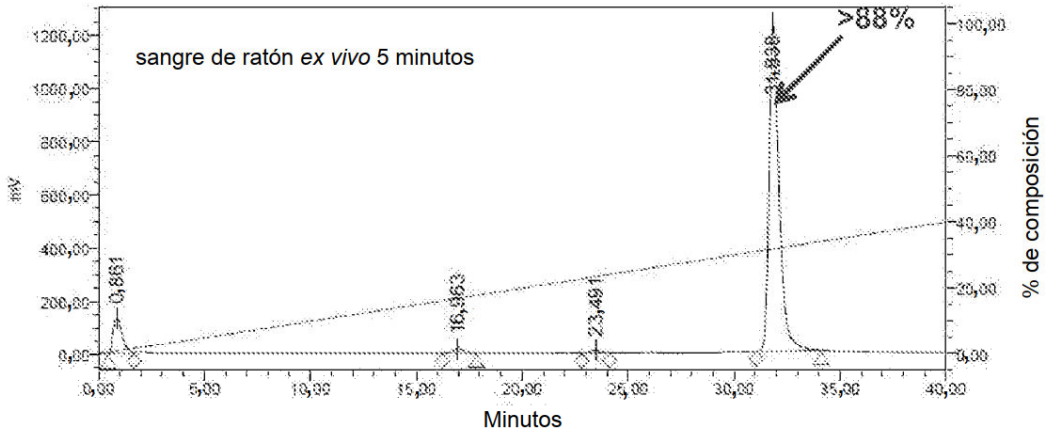

sangre de ratón *ex vivo* 5 minutos
>88%
mV
% de composición
Minutos
0,861
16,963
23,491
31,838

FIG. 2B