

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 804**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)

A61K 103/00 (2006.01)

A61K 101/02 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2013 PCT/DK2013/050402**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14086364**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2013 E 13860317 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2928505**

54 Título: **Péptidos marcados con un radionúclido que emite positrones para obtención de imágenes de PET del uPAR humana**

30 Prioridad:

03.12.2012 DK 201270751

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

23.04.2020

73 Titular/es:

CURASIGHT APS (100.0%)

Ole Maaloes Vej 3

2200 Copenhagen N, DK

72 Inventor/es:

KJAER, ANDREAS;

PERSSON, MORTEN y

MADSEN, JACOB

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 755 804 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

Péptidos marcados con un radionúclido que emite positrones para obtención de imágenes de PET del uPAR humana

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un péptido marcado con un radionúclido que emite positrones para la obtención de imágenes de PET de forma no invasiva del receptor activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) en humanos. Más específicamente, la invención se refiere a la obtención de imágenes de PET del uPAR humano de cualquier enfermedad de cáncer sólido para diagnóstico, estadificación, monitorización del tratamiento y especialmente como un biomarcador para obtención de imágenes para predicción del pronóstico, progresión y recurrencia.

15 Antecedentes de la invención

El receptor activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) se sobreexpresa en una variedad de cánceres humanos¹, que incluyen cáncer de próstata (PC), en donde se ha encontrado que la expresión del uPAR en biopsias tumorales y formas de desprendimiento del uPAR en plasma esta asociada con enfermedad avanzada y mal pronóstico²⁻⁹. Además, en pacientes con PC localizado, se ha demostrado que los altos niveles del uPAR en plasma preoperatorio se correlacionan con la progresión temprana¹⁰. De acuerdo con el importante papel de los uPAR en la patogénesis del cáncer, a través de la degradación de la matriz extracelular que facilita la invasión tumoral y la metástasis, uPAR se considera un objetivo atractivo tanto para la terapia¹¹⁻¹³ como para la obtención de imágenes¹⁴ y la capacidad de cuantificar de forma no invasiva la densidad del uPAR *in vivo* es por lo tanto, crucial.

25 El radiomarcado y la evaluación *in vivo* de un péptido pequeño radiomarcado con Cu-64¹⁵ y Ga-68¹⁶ se han descrito para la obtención de imágenes de PET del uPAR en varios modelos de cáncer de xenoinjerto humano. Tales trazadores podrían diferenciar específicamente entre tumores con expresión del uPAR alta y baja y además establecer una correlación clara entre la captación por el tumor de la sonda de PET del uPAR y la expresión del uPAR¹⁵. Sin embargo, ¹⁸F ($t_{1/2} = 109,7$ min; β^+ , 99%) se considera el isótopo PET ideal de corta duración para la marcación de moléculas pequeñas y péptidos debido a la alta abundancia de positrones, vida media óptima y corto intervalo de positrones.

Recientemente, se desarrolló un elegante enfoque de radiomarcado en una solo etapa para la radiofluoración tanto de péptidos pequeños como de proteínas basado en la unión compleja de $(Al^{18}F)^{2+}$ usando el quelante 1,4,7-triazaciclonoanano (NOTA)¹⁷⁻²⁰. En este método, la etapa de secado azeotrópico crítico tradicional para fluoruro con ¹⁸F no es necesario, y el etiquetado se puede realizar en agua. Varios estudios publicados recientemente han ilustrado el potencial de este nuevo método de marcación con ¹⁸F, donde se ha demostrado una marcación exitosa de ligandos para formación de imágenes de PET de angiogénesis^{21,22}, Bombesin²³, EGFR²⁴ e hipoxia²⁵.

40 Se han desarrollado o están en desarrollo diversas composiciones peptídicas radiomarcadas para el direccionamiento específico del sitio de diversos antígenos, receptores y transportadores para la formación de imágenes de PET. El principio general implica unir un radionúclido emisor de positrones seleccionado a un péptido y/ o una proteína que tiene una alta especificidad por un antígeno particular para visualizar y cuantificar el nivel de expresión y/o actividad utilizando imágenes de PET. Este campo de investigación ha demostrado una aplicabilidad particular para el diagnóstico de tumores, estadificación y monitorización del tratamiento. Un antígeno tumoral particularmente deseable es uPAR en muchos tumores sólidos diferentes que incluyen pero no se limitan a carcinomas de pulmón de células no pequeñas, tumores cerebrales, tumores de próstata, tumores de mama, tumores colorrectales, tumores pancreáticos y tumores de ovario.

50 DOTA (1,4,7,10-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano) y sus derivados constituyen una clase importante de quelantes para aplicaciones biomédicas ya que se adaptan muy establemente a una variedad de iones metálicos divalente y trivalentes. Un área emergente es el uso de péptidos bioactivos conjugados con quelantes para marcar con radiometales en diferentes campos de la oncología nuclear diagnóstica y terapéutica. NOTA y sus derivados constituyen otra clase importante de quelantes para aplicaciones biomédicas.

55 Las imágenes de PET del uPAR se han explotado en varios modelos de xenoinjerto de cáncer humano usando un pequeño péptido lineal conjugado con DOTA, DOTA-AE105 radiomarcado con ⁶⁴Cu (Li et al., 2008, Persson et al., 2011) y ⁶⁸Ga (Persson et al., 2012) y usando NODAGA (NODAGA-AE105) radiomarcado con ⁶⁸Ga (Persson et al., 2012).

60 Los tumores malignos son capaces de degradar la matriz extracelular circundante, lo que resulta en invasión local o metástasis. El activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y su receptor de superficie celular (uPAR) son moléculas centrales para la activación de plasminógeno asociada a la superficie celular tanto *in vitro* como *in vivo*. La alta expresión de uPA y uPAR en muchos tipos de cánceres humanos se correlaciona con el crecimiento tumoral maligno y se asocia con un mal pronóstico, lo que posiblemente indica un papel causal para el sistema uPA/uPAR en la progresión del cáncer y la metástasis. Los estudios por inmunohistoquímica e hibridación *in situ* indican que los

niveles de expresión de los componentes del sistema uPA son generalmente muy bajos en tejidos normales y lesiones benignas. También se ha informado que el sistema uPA/uPAR está involucrado en la regulación de las interacciones entre célula-matriz extracelular actuando como un receptor de adhesión para la vitronectina y modulando la función de la integrina. Con base en estas propiedades, el sistema uPA/uPAR se considera un objetivo atractivo para la terapia contra el cáncer.

El documento WO 01/25410 describe péptidos y proteínas dirigidas a uPAR marcadas diagnóstica o terapéuticamente. El péptido o proteína comprende al menos 38 residuos de aminoácidos, incluidos los residuos 13-30 del sitio de unión a uPAR de uPA.

El documento US 6.277.818 describe compuestos peptídicos cíclicos dirigidos a uPAR que pueden conjugarse con un marcador de diagnóstico. Los péptidos se basan en los residuos de aminoácidos 20-30 de uPA.

El documento US 6.514.710 también se dirige a péptidos cíclicos que tienen afinidad por uPAR. Los péptidos pueden portar un marcador detectable. El péptido comprende 11 aminoácidos unidos por una unidad de enlazamiento.

Ploug et al., en *Biochemistry* 2001, 40, 12457-12168 describe péptidos que se dirigen uPAR pero no en el contexto de la formación de imágenes, incluidas las secuencias de aminoácidos como se describe en el presente documento. Se proporciona una divulgación similar en el documento US 7.026.282.

El direccionamiento eficiente del uPAR exige un vector selectivo de alta afinidad que sea químicamente robusto y estable.

Sumario de la invención

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que [⁶⁸Ga]-, [⁶⁴Cu]- y [Al¹⁸F]-NOTA-AE105 tienen características *in vivo* superiores como un ligando de PET para uPAR, con alta y específica captación por el tumor, lo que da como resultado una alta relación tumor con respecto al entorno y, por lo tanto, un contraste superior como ligando de PET para tumores de expresión del uPAR. Los inventores han descubierto que tanto [⁶⁸Ga] como [⁶⁴Cu]-NOTA-AE105 pudieron detectar específicamente las lesiones tumorales cerebrales derivadas de humanos que expresan uPAR en un modelo de ratón de cáncer humano ortotrópico. Además, [Al¹⁸F]-NOTA-AE105 fue útil para detectar lesiones de cáncer de próstata humano positivas para uPAR después de la inoculación subcutánea en ratones. En general, el radiomarcado de NOTA-AE105 con ¹⁸F, ⁶⁸Ga y ⁶⁴Cu, permite la visualización y cuantificación del uPAR utilizando imágenes de PET. Esta es una mejora importante en las imágenes de PET.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un conjugado peptídico marcado con un radionúclido que emite positrones para su uso en la predicción/diagnóstico de agresividad, pronóstico, progresión o recurrencia mediante imágenes de PET de tumores que expresan uPAR *in vivo* en humanos, comprendiendo dicho conjugado un péptido de unión a uPAR acoplado a través del agente quelante NOTA a un radionúclido ⁶⁸Ga, en el que el conjugado se administra en una dosis de 100 - 500 MBq seguido de escaneo por PET ½ - 24 h después de que se ha administrado el conjugado, y cuantificación a través de SUV_{máx} y/o SUV_{media}, en donde el péptido se selecciona del grupo que consiste en:

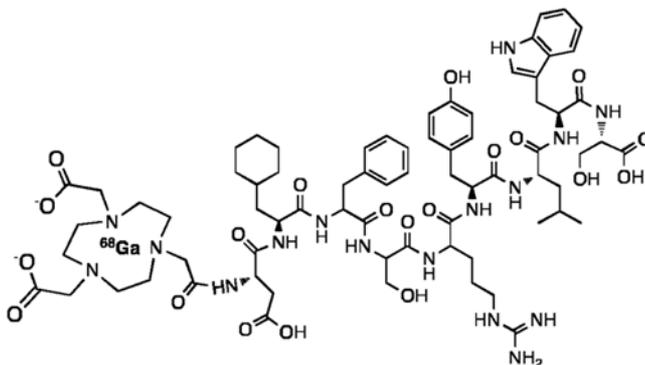
(D-Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (Ser)-(Leu)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(Gln)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (D-Glu)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Tyr)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-Leu)-(Trp)-(Ser),
 (D-Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-Leu)-(Trp)-(Ser),
 (D-Thr)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (D-Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-([beta]-2-naftil-L-alanina)-(Ser),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(Arg)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-([beta]-1-naftil-L-alanina)-(Ser),
 (D-Glu)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(Tyr)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Leu)-(Leu)-(Trp)-(D-His),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Leu)-(Trp)-(Ile),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-([beta]-1-naftil-L-alanina)-(D-His),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(N-(2,3-dimetoxibencil)glicina)-(D-Phe)-(N-(3-indoliletil)glicina)-(N-(2-metoxietil)glicina),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(N-(2,3-dimetoxibencil)glicina)-(D-Phe)-(N-bencilglicina)-(N-2[beta]metoxietil)glicina),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(N-(2,3-dimetoxibencil)glicina)-(D-Phe)-(N-(metilnaftalil)glicina)-(N-(2-metoxietil)glicina), y
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(N-(2,3-dimetoxibencil)glicina)-(D-Phe)-(N-(2,3-dimetoxibencil)glicina)-(Ile)

en donde el terminal C es o bien un ácido carboxílico o una amida.

Para todos los péptidos mencionados, el terminal C puede estar con un ácido carboxílico o una amida.

5 El agente quelante es NOTA y preferiblemente el péptido es (D-Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser).

Se prefiere particularmente el conjugado que tiene la fórmula:



10 Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que los conjugados de la presente invención son particularmente útiles para predecir la agresividad, el pronóstico, la progresión o la recurrencia mediante imágenes de PET de tumores que expresan uPAR, en particular cáncer de próstata, mama, páncreas, pulmón, cerebro y colorrectal.

15 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el agente de formación de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, junto con uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

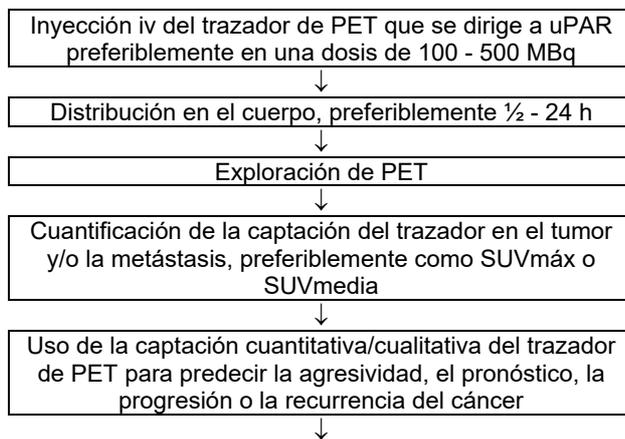
20 En el presente documento también se describe un método para predecir/diagnosticar la agresividad, el pronóstico, la progresión o la recurrencia de tumores que sobreexpresan uPAR, en el que el método comprende las etapas de:

- administrar un conjugado de la presente invención en una cantidad diagnóstica efectiva, tal como una dosis de 100 - 500 MBq;
- escaneo de PET 1/2 - 24 h después de que se haya administrado el conjugado.
- cuantificar a través de SUVmáx y/o SUVmedia la absorción/unión del conjugado en el tumor.

30 En aún otro aspecto, la invención describe un método para generar imágenes de expresión del uPAR en un cuerpo humano o animal mediante imágenes de PET, que implica administrar el agente de formación de imágenes de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 a dicho cuerpo, y generar una imagen de al menos una parte de dicho cuerpo al que se administra dicho agente de formación de imágenes.

35 En una realización, el conjugado para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, se debe administrar en una dosis de 200 - 400 MBq.

Las etapas realizadas de acuerdo con la presente invención se pueden resumir con el siguiente diagrama de flujo:



En algunos casos puede usarse para planear y/o diseñar la terapia o puede usarse para monitorizar la terapia

Los presentes conjugados para su uso de acuerdo con la presente invención pueden discriminar entre los niveles de expresión del uPAR en el tumor primario y las metástasis. Además, el uso de la cuantificación, por ejemplo, SUV_{media} y especialmente SUV_{máx} pueden predecir el pronóstico, la progresión y la recurrencia. Los péptidos marcados con un radionúclido que emite positrones de la presente invención se dirigen específicamente a células cancerosas positivas para uPAR y/o células de estroma positivas para uPAR que rodean el cáncer, tales como neutrófilos y macrófagos, y en particular las células más agresivas (metastásicas). Además, los péptidos de la presente invención pueden usarse para la detección no invasiva y la cuantificación del nivel de expresión del uPAR usando imágenes de PET. Ningún método actual que mida uPAR es capaz de hacer esto de forma no invasiva en humanos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra: A. Inhibición competitiva *in vitro* de la unión de uPA:uPAR para AE105 y AE152 usando resonancia de plasmón de superficie. B. Método de radiomarcado para ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105.

La Figura 2 muestra cromatogramas HPLC UV representativos de NOTA-AE105 (A), estándar frío de AIF-NOTA-AE105 (B) y radio cromatogramas para el producto final ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 (C) y después de 30 minutos en PBS (D).

La Figura 3 muestra: A. Imágenes representativas de PET después de 0,5 h, 1,0 h y 2,0 h pi de ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 (arriba) y ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 con una dosis de bloqueo de AE152. Las flechas blancas indican tumor. B. Análisis cuantitativo del ROI con valores de absorción por parte del tumor (% de ID/g). Se encontró una captación por el tumor significativamente mayor en los tres puntos temporales. Los resultados se muestran como % de ID/g ± SEM (n = 4 ratones/grupo). ** p <0,01, *** p <0,001 frente al de grupo de bloqueo en el mismo punto de tiempo.

La Figura 4 muestra los resultados de la biodistribución para ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 (normal) y ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 + dosis de bloqueo de AE152 (Bloqueo) en ratones desnudos con tumores PC-3 a las 2,5 h pi Los resultados se muestran como % de ID/g ± SEM (n = 4 ratones/grupo). *p <0,05 frente al grupo de bloqueo.

La Figura 5 muestra el nivel de expresión del uPAR encontrado usando ELISA en células PC-3 (A) y en tumores PC-3 resecados (B). (C) Se encontró una correlación significativa entre la expresión del uPAR y la captación del tumor en los cuatro ratones inyectados con ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 (p <0,05, r = 0,93, n = 4 tumores).

La Figura 6 muestra imágenes de PET del uPAR *in vivo* con [⁶⁴Cu]NOTA-A.E105 en un modelo de ratón de glioblastoma humano ortotrópico

La Figura 7 muestra imágenes de PET del uPAR *in vivo* con [⁶⁸Ga]NOTA-AE105 en un modelo de ratón de glioblastoma humano ortotrópico.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, un péptido radiomarcado de la presente invención es muy útil en la predicción de metástasis de cáncer de tumores que expresan uPAR.

Los péptidos seleccionados para uso en los conjugados de la presente invención se radiomarcán típicamente por acoplamiento de un agente quelante al péptido. El agente quelante es capaz de unir un radionúclido seleccionado al mismo. El agente quelante y el radionúclido se acoplan al péptido de manera que no interfiera o afecte negativamente las propiedades de unión o la especificidad del péptido. El uso de diversos agentes quelantes para el radiomarcado de péptidos es bien conocido en la técnica. El agente quelante se acopla al péptido mediante una metodología estándar conocida en el campo de la invención y se puede agregar en cualquier ubicación del péptido siempre que la actividad biológica del péptido no se vea afectada negativamente. Preferiblemente, el grupo quelante está acoplado covalentemente al aminoácido del terminal amino del péptido. El grupo quelante se puede unir ventajosamente al péptido durante la síntesis del péptido en fase sólida o agregarse mediante química en fase de solución después de que se haya obtenido el péptido. El grupo quelante es NOTA.

Con respecto a la síntesis de los péptidos usados en la presente invención, se hace referencia al documento US 7.026.282.

Los conjugados péptido/quelato de la invención se marcan haciendo reaccionar el conjugado con radionúclido, por ejemplo, como una sal metálica, preferiblemente soluble en agua. La reacción se lleva a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.

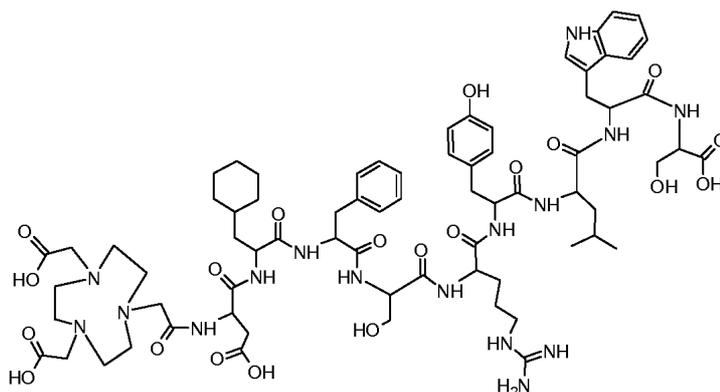
Los conjugados de la presente invención se preparan para proporcionar una dosis radiactiva de entre aproximadamente 100 - 500 MBq (en humanos), preferiblemente aproximadamente 200 - 400 MBq, al individuo. Como se usa en el presente documento, "una cantidad diagnóstica efectiva" significa una cantidad del conjugado suficiente para permitir su detección por PET. Los conjugados pueden administrarse por vía intravenosa en cualquier medio convencional para inyección intravenosa. La obtención de imágenes del sitio biológico puede realizarse dentro de aproximadamente 30 - 60 minutos después de la inyección, pero también puede tener lugar varias horas después de la inyección. Se puede utilizar cualquier método convencional de obtención de imágenes para fines de diagnóstico.

El siguiente ejemplo se centra en el conjugado específico denominado ^{18}F -AIF-NOTA-AE105 (ejemplo de referencia). Los conjugados dentro del alcance de las reivindicaciones del presente documento serán evidentes para un experto en la materia a partir de la consideración de la especificación o práctica de la invención como se describe en el presente documento.

La siguiente química se aplica a los Ejemplos:



El péptido de acuerdo con la secuencia mencionada anteriormente se sintetizó mediante química estándar de péptidos en fase sólida



El producto se purifica por RP-HPLC y se analiza por RP-HPLC (tiempo de retención: 11,5 min, pureza > 98%) y electroaspersión-MS (1510,8 m.u.).

Ejemplo 1 - Ejemplo de referencia

El objetivo del presente estudio fue sintetizar un péptido conjugado con NOTA y usar el método de Al^{18}F para el desarrollo del primer ligando de PET marcado con ^{18}F para la formación de imágenes de PET del uPAR y realizar una evaluación biológica en tumores de xenoinjerto de cáncer de próstata humano. Para lograr esto, los presentes inventores sintetizaron un péptido de unión a uPAR de alta afinidad denominado AE105 y NOTA conjugado en el terminal N. La marcación con ^{18}F se realizó de acuerdo con un protocolo recientemente optimizado²⁶. El producto final (^{18}F -AIF-NOTA-AE105) finalmente se evaluó *in vivo* utilizando imágenes de microPET en animales portadores de tumores de próstata humanos y después de la recolección de órganos para el estudio de biodistribución.

Reactivos químicos

Todos los productos químicos obtenidos comercialmente fueron de grado analítico y se usaron sin purificación adicional. Se obtuvo fluoruro con ^{18}F añadido sin portador en un ciclotrón PETtrace propio (GE Healthcare). Los cartuchos Sep-Pak de extracción en fase inversa C18 se obtuvieron de Waters (Milford, MA, EE. UU.) y se trataron previamente con etanol y agua antes de su uso. El filtro de jeringa y las membranas de polietileno sulfonato (tamaño de poro de 0,22 μm , diámetro 13 mm) se obtuvieron de Nalge Nunc International (Rochester, NY, EE. UU.). La HPLC de fase inversa usando una proteína Vydac y una columna de péptido (218TP510; 5 μm , 250 \times 10 mm) se realizó como se describió anteriormente²¹.

Los escaneos MicroPET se realizaron en un escáner de modelo de roedor microPET R4 (Siemens Medical Solutions USA, Inc., Knoxville, TN, USA). El escáner tiene una platina controlada por ordenador y campos de visión transaxial de 10,8 cm y axial de 8 cm (FOV). No tiene tabiques y opera exclusivamente en el modo de lista tridimensional (3-D). Los animales se colocaron cerca del centro del campo de visión del escáner.

Síntesis, conjugación y radiomarcado de péptidos

El AE105 conjugado con NOTA (NOTA-Asp-Cha-Phe-(D)Ser-(D)Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-COOH) se adquirió a través de ABX GmbH. La pureza se caracterizó usando análisis de HPLC y la masa se confirmó usando espectrometría de masa de tiempo de vuelo de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) (Véase el Suplemento, Fig. 1A). El radiomarcado de NOTA-AE105 con ^{18}F -AIF se muestra en la Figura 1 y se realizó de acuerdo con un protocolo publicado recientemente con modificaciones menores²⁶.

En resumen, se fijó un cartucho de luz QMA Sep-Pak Light (Waters, Milford, MA, EE. UU.) con aproximadamente 3 GBq de fluoruro con ^{18}F y luego se lavó con 2,5 mL de agua libre de metales. Luego se eluyó Na^{18}F del cartucho con 1 mL de solución salina, de la cual se tomó una fracción de 100 μL . Luego, primero se hicieron reaccionar cantidades de 50 μL de tampón de acetato de sodio 0,1 M (pH = 4), 3 μL de AlCl_3 0,1 M y 100 μL de Na^{18}F en solución salina al 0,9% (300 MBq) en un tubo de centrifuga de 1 mL (sellado) a 100 °C durante 15 min. La mezcla de reacción se enfrió. Se añadieron 50 μL de etanol y 30 nmoles de NOTA-AE105 en 3 μL de DMSO y la mezcla de reacción se calentó a 95 °C durante 5 minutos. La mezcla cruda se purificó con HPLC semipreparativa. Las fracciones que contenían ^{18}F -AIF-NOTA-AE105 se recogieron y combinaron en un vial estéril. El producto se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7,4), por lo que los disolventes orgánicos estaban por debajo del 5% (v/v) y se usaron para estudios *in vivo*.

Línea celular y modelo animal

La línea celular de cáncer de próstata humano PC-3 se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE. UU.) y el medio de cultivo DMEM se obtuvo a través de Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, EE. UU.). La línea celular se cultivó en DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina a 37 °C y 5% de CO_2 . Los xenoinjertos de células de cáncer de próstata PC-3 humanas se establecieron mediante inyección de 200 μL de células (1×10^8 células/mL) suspendidas en 100 μL de Matrigel (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.), Por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos machos obtenidos a través de Charles River Laboratory (Wilmington, MA, EE. UU.), se permitió que los tumores crecieran hasta un tamaño de 200 - 500 mg (3-4 semanas).

Imagen de MicroPET

Se obtuvieron escaneos de PET estáticos de tres minutos, 0,5, 1,0 y 2,0 h después de la inyección (pi) de ^{18}F -AIF-NOTA-AE105 mediante inyección en la vena de la cola de 2 - 3 MBq (n = 4). De manera similar, el estudio de bloqueo se realizó mediante inyección del ligando junto con 100 μg de AE152 (antagonista del uPAR) a través de la vena de la cola (n = 4) y escaneo PET en los mismos puntos de tiempo. Durante cada escaneo PET de tres minutos, los ratones fueron anestesiados con isoflurano (5% de inducción y 2% de mantenimiento en 100% de O_2). Las imágenes se reconstruyeron utilizando un algoritmo de maximización de expectativa de subconjuntos ordenados bidimensionales (OSEM-2D). No se realizó corrección del entorno. Todos los resultados se analizaron con el software Inveon (Siemens Medical Solutions) y los datos de PET se expresaron como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% de ID/g) con base en el dibujo manual de la región de interés en las imágenes de PET y el uso de una constante de calibración. Se usó una suposición de una densidad de tejido de 1 g/mL. No se realizó corrección de atenuación.

Estudios de biodistribución

Después del último escaneo de PET, todos los ratones con PC-3 fueron sacrificados. Se recogieron sangre, tumor y órganos principales (peso húmedo) y se midió la radiactividad usando un contador y de Perkin Elmer, MA, EE. UU. (N = 4 ratones/grupo).

ELISA del uPAR

El ELISA del uPAR en tumores PC-3 resecados se realizó como se describió previamente en detalle¹⁵. Todos los resultados se realizaron como mediciones por duplicado.

Análisis estadístico

Todos los datos cuantitativos se expresan como media \pm SEM (error estándar de la media) y las medias se compararon usando la prueba t de Student. La estadística de correlación se realizó mediante análisis de regresión lineal. Un valor AP de $\leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Afinidad de unión a uPAR

En este estudio, se descubrió que la afinidad de unión a uPAR de AE105 y AE152²⁷ (utilizada para estudios de bloqueo) era 14,1 nM y 2,9 nM, respectivamente (Figura 1A). Una alta afinidad de unión a uPAR para AE105 con diferentes quelantes conjugados en el terminal N, incluido el NODAGA análogo NOTA, se ha confirmado en nuestros estudios

previos^{15,16}, confirmando así la capacidad de realizar modificaciones en el terminal N de AE105 sin perder afinidad hacia uPAR humano^{14,27,28}.

Radioquímica

5 La marcación con ¹⁸F de NOTA-AE105 se sintetizó con base en un procedimiento publicado recientemente con alguna modificación (Figura 1B). Durante la optimización de marcación, se encontró que etanol al 33% (v/v) era óptimo usando 30 nmol de NOTA-AE105. Primero se formó el complejo ¹⁸F-AIF en tampón a 100 °C durante 15 min. En segundo lugar, se añadió el péptido conjugado con NOTA y se incubó junto con etanol a 95 °C durante 5 min. Al agregar etanol se pudo aumentar el rendimiento general por encima del 92,7% (Figura 2C), mientras que el rendimiento sin etanol fue solo del 30,4%, con las mismas condiciones. No se observó ningún aumento adicional en el rendimiento global usando un tiempo de incubación más prolongado y/o diferentes concentraciones de etanol o usando menos de 30 nmol de péptido conjugado. Se observaron dos isómeros para ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105.

15 Para garantizar la formación del producto correcto, se sintetizó un estándar frío del producto final (AIF-NOTA-AE105). El análisis por HPLC del precursor (NOTA-AE105, Figura 2A) confirmó la pureza del precursor conjugado con NOTA (> 97%) y MALDI-MS confirmó la masa (1511,7 Da) (véase el suplemento de la Figura 1). El estándar frío (AIF-NOTA-AE105, Figura 2B), con la masa correcta confirmada por MALDI-MS (1573,6 Da) (véase el suplemento de la Figura 1B), se correspondía bien con respecto al tiempo de retención con el producto 'caliente' (Figura 2C), confirmando así la formación de ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 (Figura 2C). No se encontró degradación del producto final después de 30 minutos en PBS (Figura 2D). Los picos radiactivos se recogieron y diluyeron en PBS y se usaron para estudios *in vivo*. La actividad específica en el producto final fue superior a 25 GBq/μmol.

Imagen PET *in vivo*

25 Se inyectó ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 iv en cuatro ratones con tumores PC-3 y se realizó un escaneo de PET 0,5, 1,0 y 2,0 h después de la inyección (pi). Las lesiones tumorales se identificaron fácilmente a partir de las imágenes de PET reconstruidas (Figura 3A) y el análisis de ROI reveló una alta captación por el tumor, con 5,90 ± 0,35% de ID/g después de 0,5 h, disminuyendo hasta 4,22 ± 0,13% de ID/g y 2,54 ± 0,24% de ID/g después de 1,0 y 2,0 h, respectivamente (Figura 3B).

35 Para garantizar que la captación de tumor encontrada reflejara la captación mediada por uPAR específica, cuatro nuevos ratones portadores del tumor PC-3 fueron inyectados con una solución mixta que contenía ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 y 100 μg del péptido de unión a uPAR de alta afinidad denominado como AE152, para ver si la absorción por parte del tumor podría inhibirse. Se encontró una cantidad significativamente menor de absorción de tumor ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 en los tres puntos de tiempo de investigación (Figura 3B) y las lesiones tumorales no se identificaron tan fácilmente en las imágenes de PET (Figura 3A). A 1,0 h pi se encontró una absorción por parte del tumor de 1,86 ± 0,14% de ID/g en el grupo de bloqueo en comparación con 4,22 ± 0,13% de ID/g en el grupo de ratones que recibieron solo ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 (p < 0,001, reducción de 2,3 veces).

Biodistribución

45 Después del último escaneo de PET, cada grupo de ratones se sacrificaron y se recogieron órganos y tejidos seleccionados para investigar el perfil de biodistribución 2,5 h pi (Figura 4). Se encontró una captación por el tumor significativamente mayor en el grupo de ratones que recibieron ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 en comparación con el grupo de bloqueo (1,02 ± 0,37% de ID/g frente a 0,30 ± 0,06% de ID/g, p < 0,05), confirmando así la especificidad de ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 para la uPAR humana encontrada en el estudio por PET. La mayor actividad se encontró en los riñones para ambos grupos de ratones, lo que confirma que los riñones son principalmente la ruta de excreción. Además de los riñones, el hueso, bien conocido por acumular fluoruro, también tuvo una absorción relativamente alta de 3,54 ± 0,32% de ID/g y 2,34 ± 0,33% de ID/g para el grupo normal y de bloqueo, respectivamente.

Expresión del uPAR

55 Tanto las células PC-3 usadas para la inoculación de tumores como todos los tumores PC-3 al final del estudio (n = 8) finalmente se analizaron para confirmar la expresión del uPAR humano (Figura 5). Se encontró una expresión en las células de 6,53 ± 1,6 ng/mg de proteína (Figura 5A), mientras que el nivel de expresión en los tumores resecados fue de 302 ± 129 pg/mg de tejido tumoral (Figura 5B). Se encontró una correlación significativa entre la absorción por parte del tumor de ¹⁸F-AIF-NOTA-AE105 y la expresión del uPAR (p < 0,05, r = 0,93) (Figura 5C).

Interpretación de los datos

65 Los experimentos anteriores proporcionan evidencia de la aplicabilidad de un ligando marcado con ¹⁸F para la PET del uPAR. El ligando se caracterizó en un modelo de ratón de xenoinjerto de cáncer de próstata humano. Con base en los resultados obtenidos, se encontraron una absorción por el tumor, especificidad y contraste del tumor con respecto al entorno similares en comparación con los estudios publicados previamente que usan ligandos basados en ⁶⁴Cu- y ⁶⁸Ga para PET^{15,16}. Con base en las características físicas superiores de ¹⁸F y el alto contraste del tumor con

respecto al entorno encontrado ya después de 1 h pi, el nuevo ligando basado en ^{18}F debe considerarse el candidato de PET del uPAR más prometedor para trasladarse al uso clínico con el fin de caracterizar en forma no invasiva el potencial invasivo de, por ejemplo, del cáncer de próstata.

5 Se ha descrito previamente que la marcación con ^{18}F de péptidos usando el enfoque de AIF se realiza a 100 °C durante 15 minutos, a $\text{pH} = 4$ ¹⁷⁻²⁰. Este protocolo fue modificado, ya que se observó degradación del péptido conjugado con NOTA usando estas condiciones. Por lo tanto, los presentes inventores produjeron primero el complejo ^{18}F -AIF usando las condiciones mencionadas anteriormente y luego añadieron el péptido conjugado con NOTA y redujeron la temperatura a 95 °C, y en 5 minutos obtuvieron un rendimiento de marcado del 92,7% y sin degradación del péptido.
 10 Se produjeron dos isómeros de ^{18}F -AIF-NOTA-AE105. Otros han informado las mismas observaciones para ^{18}F -AIF-NOTA-Octreótido¹⁸ y todos los análogos descritos del péptido IMP conjugados con NOTA¹⁹. La relación de los dos picos fue casi constante para cada marcación y ambos picos radiactivos se recogieron y utilizaron para estudios posteriores *in vivo*. Este enfoque también fue descrito recientemente por otros²⁶.
 15 Además de optimizar la temperatura y el tiempo, los presentes inventores descubrieron que la adición de etanol, a una concentración final del 33% (v/v), dio como resultado un rendimiento de marcación significativamente mayor, en comparación con el radiomarcado sin etanol (30,4% frente a 92,7%), usando la misma cantidad de péptido conjugado con NOTA. Las mismas observaciones han sido descritas recientemente por otros²⁶. En el presente documento se investigó el efecto de disminuir la fuerza iónica usando acetonitrilo, etanol, dimetilformamida (DMF) y tetrahidrofurano (THF) a diferentes concentraciones. Se informó un rendimiento de marcación del 97% usando etanol a una
 20 concentración del 80% (v/v). Sin embargo, usaron entre 76 y 383 nmol de péptido conjugado con NOTA, mientras que en este estudio solo se usaron 30 nmol. Por lo tanto, la cantidad necesaria para un rendimiento óptimo de marcado parece depender del péptido y de la cantidad de péptido utilizada para la marcación.

La captación por el tumor de ^{18}F -AIF-NOTA-AE105 se comparó de manera similar con los resultados publicados previamente relativos a ligandos basados en ^{64}Cu ¹⁵. La captación por el tumor 1 h pi fue de $4,79 \pm 0,7\%$ de ID/g, $3,48 \pm 0,8\%$ de ID/g y $4,75 \pm 0,9\%$ de ID/g para ^{64}Cu -DOTA-AE105, ^{64}Cu -CB-TE2A-AE105, ^{64}Cu -CB-TE2A-PA-AE105 en comparación con $4,22 \pm 0,1\%$ de ID/g para ^{18}F -AIF-NOTA-AE105. Sin embargo, todos los ligandos con base en ^{64}Cu se investigaron usando la línea celular de glioblastoma humano U87MG, mientras que en este estudio, se usó la línea celular de cáncer de próstata PC-3. Considerando que los datos muestran que el nivel del uPAR en los dos tipos de tumor no es similar, con PC-3 con alrededor de 300 pg de tejido tumoral del uPAR/mg (Figura 5B) y U87MG con aproximadamente 1.700 pg/mg de tejido tumoral (no publicado), la captación por el tumor de ^{18}F -AIF-NOTA-AE105 parece ser relativamente mayor por pg del uPAR. Sin embargo, una comparación directa entre los dos estudios independientes es difícil, teniendo en cuenta que la línea celular de cáncer utilizada fue diferente. Sin embargo, los presentes inventores han mostrado previamente una correlación significativa entre la expresión del uPAR y la absorción por parte del tumor a través de tres tipos de tumores¹⁵, lo que se confirma en el presente estudio utilizando xenoinjertos de PC-3 (Figura 5C), validando aún más la capacidad de ^{18}F -AIF-NOTA-AE105 para cuantificar la expresión del uPAR utilizando imágenes de PET. La unión específica del uPAR de ^{18}F -AIF-NOTA-AE105 en el presente estudio fue confirmada por una reducción de 2,3 veces en la absorción por parte del tumor de ^{18}F -AIF-NOTA-AE105 1 h pi cuando se realizó la administración conjunta de un antagonista del uPAR (AE152) para el estudio de bloqueo.
 40

El estudio de biodistribución de ^{18}F -AIF-NOTA-AE105 confirmó que los riñones son la ruta primaria de excreción y el órgano con el nivel más alto de actividad (Figura 4). Se han encontrado los mismos perfiles de excreción para ^{68}Ga -DOTA/NODAGA-AE105^{16,177} Lu-DOTA-AE105³⁰. Además de los riñones y el tumor, el hueso también tenía una acumulación relativamente alta de actividad. La absorción ósea después de la inyección de ligandos basados en ^{18}F es un fenómeno bien descrito y se utiliza clínicamente en escaneos óseos de NaF^{31} . Se encontró una absorción ósea de 3,54% de ID/g 2,5 h pi, que es similar a la absorción ósea después de la inyección de ^{18}F -FDG en ratones, donde se ha informado de 2,49% de ID/g 1,5 h pi¹⁷.
 45

El desarrollo del primer ligando con base en ^{18}F para la PET del uPAR proporciona varias ventajas en comparación con los ligandos de la PET del uPAR basados en ^{64}Cu previamente publicados. Teniendo en cuenta el contraste óptimo del tumor con respecto al entorno tan pronto como 1 h pi como se encontró en este estudio y en estudios anteriores usando ^{64}Cu , la vida media relativamente más corta de ^{18}F ($T_{1/2} = 1,83$ h) en comparación con ^{64}Cu ($T_{1/2} = 12,7$ h) parece ser óptima, considerando la carga de radiación mucho más baja para futuros pacientes que usan ^{18}F -AIF-NOTA-AE105. Además, la producción de ^{18}F está bien establecida en varias instituciones en todo el mundo, mientras que la producción de ^{64}Cu todavía está limitada a relativamente pocos lugares.
 50
 55

Ejemplo 2 - Ejemplo de referencia

60 $[^{64}\text{Cu}]\text{NOTA-AE105}$ (NOTA-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-OH)
 Se añadió $^{64}\text{CuCl}_2$ disuelto en 50 μL de agua sin metales a una solución que contenía 10 nmol de NOTA-AE105 y 2,5 mg de ácido genticónico disuelto en 500 μL de tampón de NH_4OAc 0,1 M (pH 5,5) y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos dando como resultado 375 MBq $[^{64}\text{Cu}]\text{NOTA-AE105}$ con una pureza radioquímica superior al 99%. La pureza radioquímica disminuyó al 94% después de 48 horas de almacenamiento.
 65

Ejemplo 3 - Ejemplo de referencia

Imagen de la PET del uPAR *in vivo* con [⁶⁴Cu]NOTA-AE105 en un modelo de ratón de glioblastoma humano ortotrópico

Se inoculó un ratón con células de glioblastoma derivadas de humanos en el cerebro. Tres semanas más tarde, se observó un pequeño tumor mediante escaneo por microCT. Se grabaron imágenes de microPET 1 hora después de inyección iv de aproximadamente 5 MBq [⁶⁴Cu]NOTA-AE105. Se cuantificó la absorción en el tumor y el tejido cerebral del entorno. Además, un ratón de control (sin tumor inoculado) también se escaneó por PET usando el mismo procedimiento, para investigar la absorción en el tejido cerebral normal con barrera hematoencefálica intacta. Véase la Figura 6.

Ejemplo 4

[⁶⁸Ga]NOTA-AE105 (NOTA-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu- Trp-Ser-OH)

Una fracción de 1 mL del eluato forma un generador de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga para agregar a una solución que contiene 20 nmol de NOTA-AE105 disuelto en 1000 µL de tampón de NaOAc 0,7 M (pH 3,75) y calentado a 60 °C durante 10 minutos. La mezcla correspondiente podría purificarse en una columna Sep-Pak C18 dando como resultado 534MBq [⁶⁸Ga]NOTA-AE105 con una pureza radioquímica superior al 98%

Ejemplo 5

Imagen de PET del uPAR *in vivo* con [⁶⁸Ga]NOTA-AE105 en un modelo de ratón de glioblastoma humano ortotrópico

Se inoculó un ratón con células de glioblastoma derivadas de humano en el cerebro. Tres semanas más tarde, se observó un pequeño tumor mediante escaneo por microCT. Se grabaron imágenes de microPET 1 hora después de inyección iv de aproximadamente 5 MBq [⁶⁸Ga]NOTA-AE105. Se cuantificó la absorción en el tumor y el tejido cerebral del entorno. Además, un ratón de control (sin tumor inoculado) también se escaneó por PET usando el mismo procedimiento, para investigar la absorción en el tejido cerebral normal con barrera hematoencefálica intacta. Véase la Figura 7.

Referencias

1. Rasch MG, Lund IK, Almasi CE, Hoyer-Hansen G. Intact and cleaved uPAR forms: diagnostic and prognostic value in cancer. *Front Biosci.* 2008; 13: 6752-6762.
2. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Arakawa S, Kamidono S. Elevation of urokinase-type plasminogen activator and its receptor densities as new predictors of disease progression and prognosis in men with prostate cancer. *Int J Oncol.* Mar 1999; 14(3): 535-541.
3. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S. Elevation of serum levels of urokinase-type plasminogen activator and its receptor is associated with disease progression and prognosis in patients with prostate cancer. *Prostate.* Mayo de 1999; 39(2): 123-129.
4. Piironen T, Haese A, Huland H, et al. Enhanced discrimination of benign from malignant prostatic disease by selective measurements of cleaved forms of urokinase receptor in serum. *Clin Chem.* Mayo de 2006; 52(5): 838-844.
5. Steuber T, Vickers A, Haese A, et al. Free PSA isoforms and intact and cleaved forms of urokinase plasminogen activator receptor in serum improve selection of patients for prostate cancer biopsy. *Int J Cancer.* Abril 1 de 2007; 120(7): 1499-1504.
6. Gupta A, Lotan Y, Ashfaq R, et al. Predictive value of the differential expression of the urokinase plasminogen activation axis in radical prostatectomy patients. *Eur Urol.* Mayo de 2009; 55(5): 1124-1133.
7. Kjellman A, Akre O, Gustafsson O, et al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor as a prognostic marker in men participating in prostate cancer screening. *J Intern Med.* Marzo de 2011; 269(3): 299-305.
8. Nogueira L, Corradi R, Eastham JA. Other biomarkers for detecting prostate cancer. *BJU Int.* Enero de 2010; 105(2): 166-169.
9. Shariat SF, Semjonow A, Lilja H, Savage C, Vickers AJ, Bjartell A. Tumor markers in prostate cancer I: bloodbased markers. *Acta Oncol.* Junio de 2011; 50 Suplemento 1: 61-75.
10. Shariat SF, Roehrborn CG, McConnell JD, et al. Association of the circulating levels of the urokinase system of plasminogen activation with the presence of prostate cancer and invasion, progression, and metastasis. *J Clin Oncol.* Febrero 1 e 2007; 25(4): 349-355.
11. Rabbani SA, Ateeq B, Arakelian A, et al. An anti-urokinase plasminogen activator receptor antibody (ATN-658) blocks prostate cancer invasion, migration, growth, and experimental skeletal metastasis *in vitro* and *in vivo*. *Neoplasia.* Octubre de 2010; 12(10): 778-788.
12. Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, et al. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity *in vivo*. *J Biol Chem.* Octubre 28 de 2005; 280(43): 36529-36540.
13. Margheri F, D'Alessio S, Serrati S, et al. Effects of blocking urokinase receptor signaling by antisense Oligonucleotides in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases. *Gene Ther.* Abril de 2005; 12(8): 702-714.

14. Kriegbaum MC, Persson M, Haldager L, et al. Rational targeting of the urokinase receptor (uPAR): Development of antagonists and non-invasive imaging probes. *Curr Drug Targets*. Noviembre de 2011; 12(12): 1711-1728.
15. Persson M, Madsen J, Ostergaard S, et al. Quantitative PET of human urokinase-type plasminogen activator receptor with ⁶⁴Cu-DOTA-AE105: implications for visualizing cancer invasion. *J Nucl Med*. Enero de 2012; 53(1): 138-145.
- 5 16. Persson M, Madsen J, Ostergaard S, Ploug M, Kjaer A. (68)Ga-labeling and *in vivo* evaluation of a uPAR binding DOTA- and NODAGA-conjugated peptide for PET imaging of invasive cancers. *Nucl Med Biol*. Mayo de 2012; 39(4): 560-569.
17. McBride WJ, Sharkey RM, Karacay H, et al. A novel method of ¹⁸F radiolabeling for PET. *J Nucl Med*. Junio de 2009; 50(6): 991-998.
- 10 18. Laverman P, McBride WJ, Sharkey RM, et al. A novel facile method of labeling octreotide with (¹⁸F)-fluorine. *J Nucl Med*. Marzo de 2010; 51(3): 454-461.
19. McBride WJ, D'Souza CA, Sharkey RM, et al. Improved ¹⁸F labeling of peptides with a fluoride-aluminumchelate complex. *Bioconjug Chem*. Julio 21 de 2010; 21(7): 1331-1340.
- 15 20. D'Souza CA, McBride WJ, Sharkey RM, Todaro LJ, Goldenberg DM. High-yielding aqueous ¹⁸F-labeling of peptides via Al¹⁸F chelation. *Bioconjug Chem*. Septiembre 21 de 2011; 22(9): 1793-1803.
21. Liu S, Liu H, Jiang H, Xu Y, Zhang H, Cheng Z. One-step radiosynthesis of (1)(⁸F)-AIF-NOTA-RGD(2) for tumor angiogenesis PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Septiembre de 2011; 38(9): 1732-1741.
22. Gao H, Lang L, Guo N, et al. PET imaging of angiogenesis after myocardial infarction/reperfusion using a onestep labeled integrin-targeted tracer ¹⁸F-AIF-NOTA-PRGD2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Abril de 2012; 39(4): 683-692.
- 20 23. Dijkgraaf I, Franssen GM, McBride WJ, et al. PET of tumors expressing gastrin-releasing peptide receptor with an ¹⁸F-labeled bombesin analog. *J Nucl Med*. Junio de 2012; 53(6): 947-952.
24. Heskamp S, Laverman P, Rosik D, et al. Imaging of human epidermal growth factor receptor type 2 expression with ¹⁸F-labeled affibody molecule ZHER2:2395 in a mouse model for ovarian cancer. *J Nucl Med*. Enero de 2012; 53(1): 146-153.
- 25 25. Hoigebazar L, Jeong JM, Lee JY, et al. Syntheses of 2-nitroimidazole derivatives conjugated with 1,4,7-triazacyclononane-N,N'-diacetic acid labeled with F-18 using an aluminum complex method for hypoxia imaging. *J Med Chem*. Abril 12 de 2012; 55(7): 3155-3162.
26. Laverman P, D'Souza CA, Eek A, et al. Optimized labeling of NOTA-conjugated octreotide with F-18. *Tumour Biol*. Abril de 2012; 33(2): 427-434.
- 30 27. Ploug M, Ostergaard S, Gardsvoll H, et al. Peptide-derived antagonists of the urokinase receptor affinity maturation by combinatorial chemistry, identification of functional epitopes, and inhibitory effect on cancer cell intravasation. *Biochemistry*. Octubre 9 de 2001; 40(40): 12157-12168.
28. Ploug M. Structure-function relationships in the interaction between the urokinase-type plasminogen activator and its receptor. *Curr Pharm Des*. 2003; 9(19): 1499-1528.
- 35 29. McBride WJ, D'Souza CA, Sharkey RM, Goldenberg DM. The radiolabeling of proteins by the [¹⁸F]AIF method. *Appl Radiat Isot*. Enero de 2012; 70(1): 200-204.
30. Persson M, Rasmussen P, Madsen J, Ploug M, Kjaer A. New peptide receptor radionuclide therapy of invasive cancer cells: *in vivo* studies using (¹⁷⁷Lu)-DOTA-AE105 targeting uPAR in human colorectal cancer xenografts. *Nucl Med Biol*. Junio 25 de 2012.
- 40 31. Kurdziel KA, Shih JH, Apolo AB, et al. The Kinetics and Reproducibility of ¹⁸F-Sodium Fluoride for Oncology Using Current PET Camera Technology. *J Nucl Med*. Agosto de 2012; 53(8): 1175-1184.

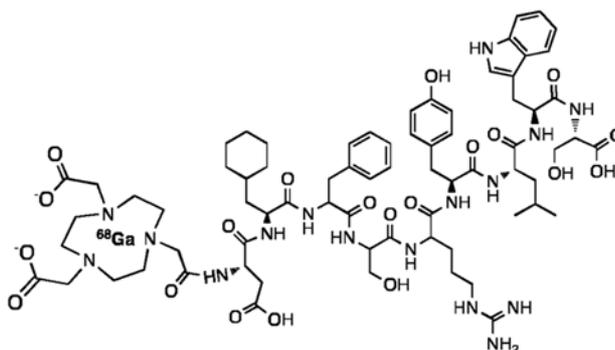
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado peptídico marcado con un radionúclido que emite positrones para su uso en la predicción/ diagnóstico de agresividad, pronóstico, progresión o recurrencia mediante imágenes de PET de tumores que expresan uPAR *in vivo* en humanos, comprendiendo dicho conjugado un péptido de unión a uPAR acoplado a través del agente quelante NOTA a un radionúclido ^{68}Ga , en el que el conjugado se administra en una dosis de 100 - 500 MBq seguido de escaneo por PET $\frac{1}{2}$ - 24 h después de que se ha administrado el conjugado, y cuantificación a través de SUV $_{\text{máx}}$ y/o SUV $_{\text{media}}$, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en:

(D-Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (Ser)-(Leu)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(Gln)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (D-Glu)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Tyr)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-Leu)-(Trp)-(Ser),
 (D-Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-Leu)-(Trp)-(Ser),
 (D-Thr)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (D-Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-([beta]-2-naftil-L-alanina)-(Ser),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(Arg)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-([beta]-1-naftil-L-alanina)-(Ser),
 (D-Glu)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(Tyr)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Leu)-(Leu)-(Trp)-(D-His),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Leu)-(Trp)-(Ile),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-([beta]-1-naftil-L-alanina)-(D-His),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(N-(2,3-dimetoxibencil)glicina)-(D-Phe)-(N-(3-indoliletil)glicina)-(N-(2-metoxietil)glicina),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(N-(2,3-dimetoxibencil)glicina)-(D-Phe)-(N-bencilglicina)-(N-(2[beta]metoxietil)glicina),
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(N-(2,3-dimetoxibencil)glicina)-(D-Phe)-(N-(metilnaftalil)glicina)-(N-(2-metoxietil)glicina), y
 (Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(N-(2,3-dimetoxibencil)glicina)-(D-Phe)-(N-(2,3-dimetoxibencil)glicina)-(Ile)
 en el que el terminal C es o bien un ácido carboxílico o una amida.

2. El conjugado para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido es (D-Asp)-([beta]-ciclohexil-L-alanina)-(Phe)-(D-Ser)-(D-Arg)-(Tyr)-(Leu)-(Trp)-(Ser).

3. El conjugado para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que tiene la fórmula:



4. El conjugado para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de próstata, mama, páncreas, pulmón, cerebro y colorrectal.

5. Una composición farmacéutica que comprende el agente de formación de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, junto con uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

6. Un método para generar imágenes de expresión del uPAR en un cuerpo humano o animal mediante imágenes de PET, que implica administrar el agente de formación de imágenes de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 a dicho cuerpo, y generar una imagen de al menos una parte de dicho cuerpo al cual se administra dicho agente de formación de imágenes.

7. El conjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el conjugado se administra en una dosis de 200-400 MBq.

Figura 1

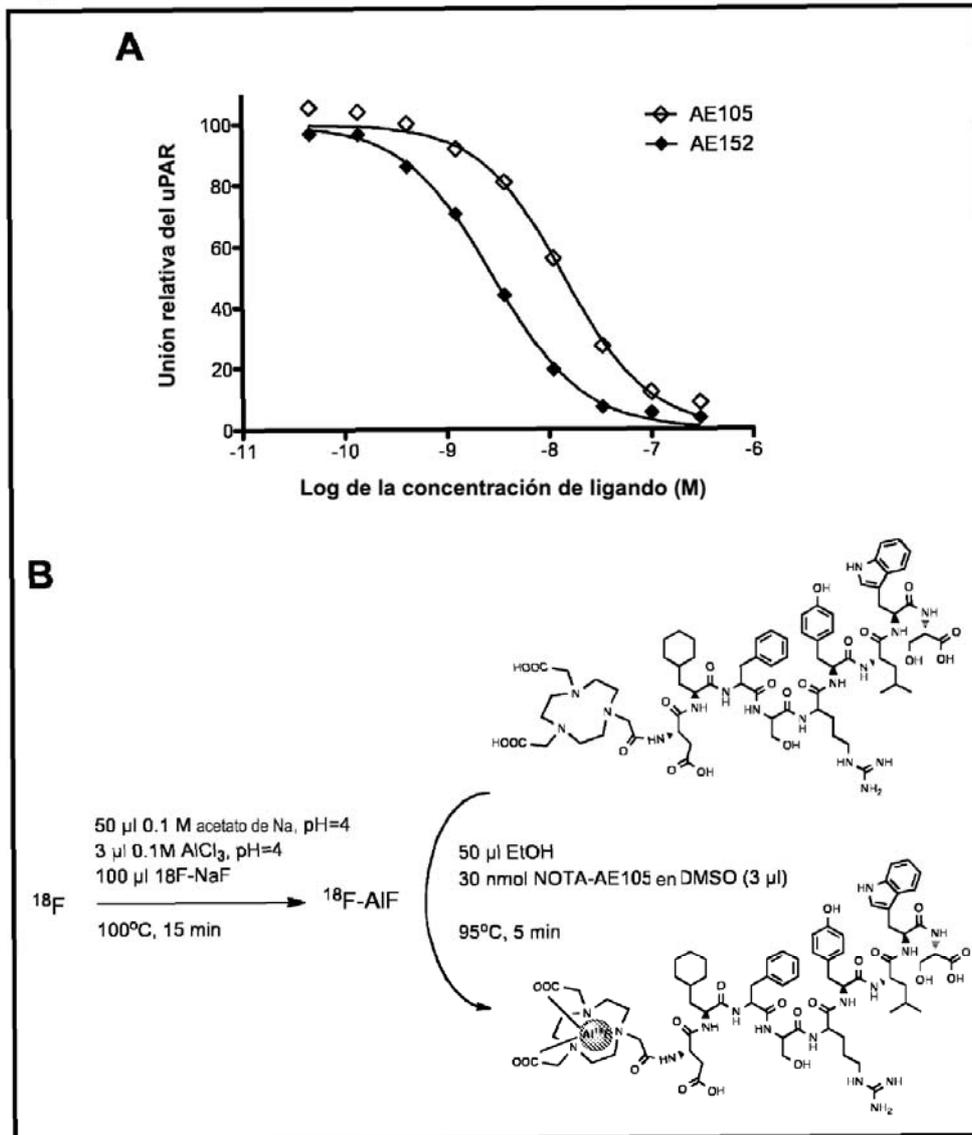


Figura 2

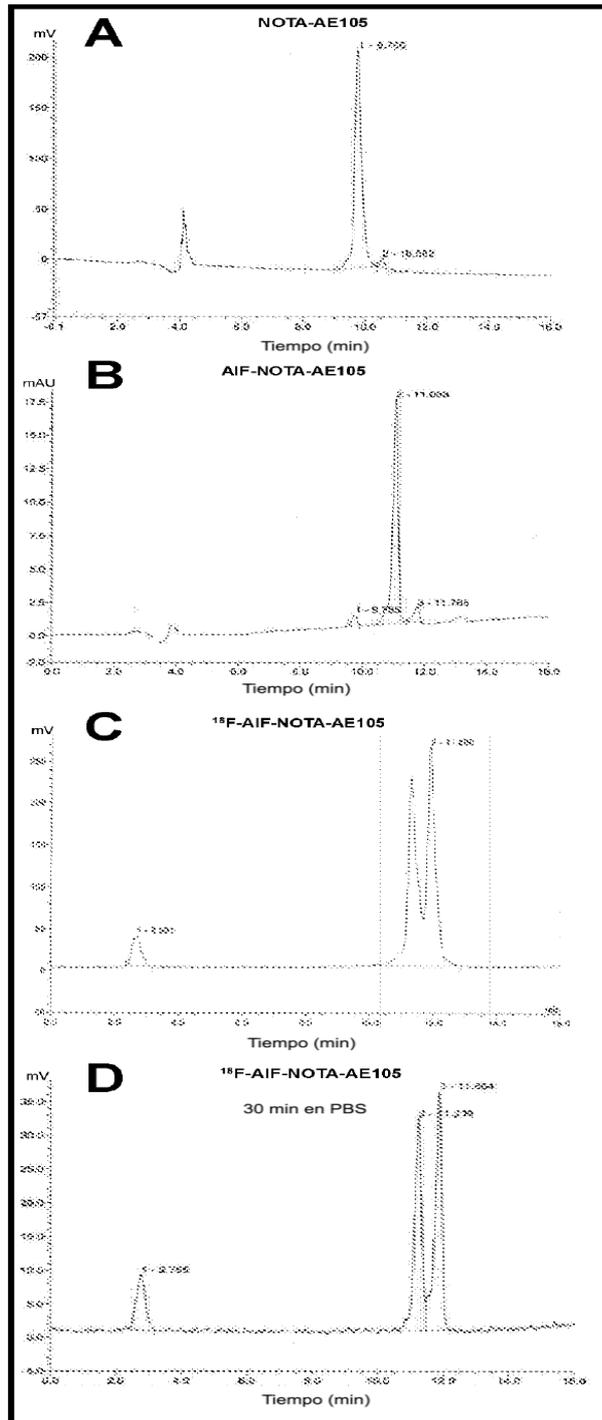


Figura 3

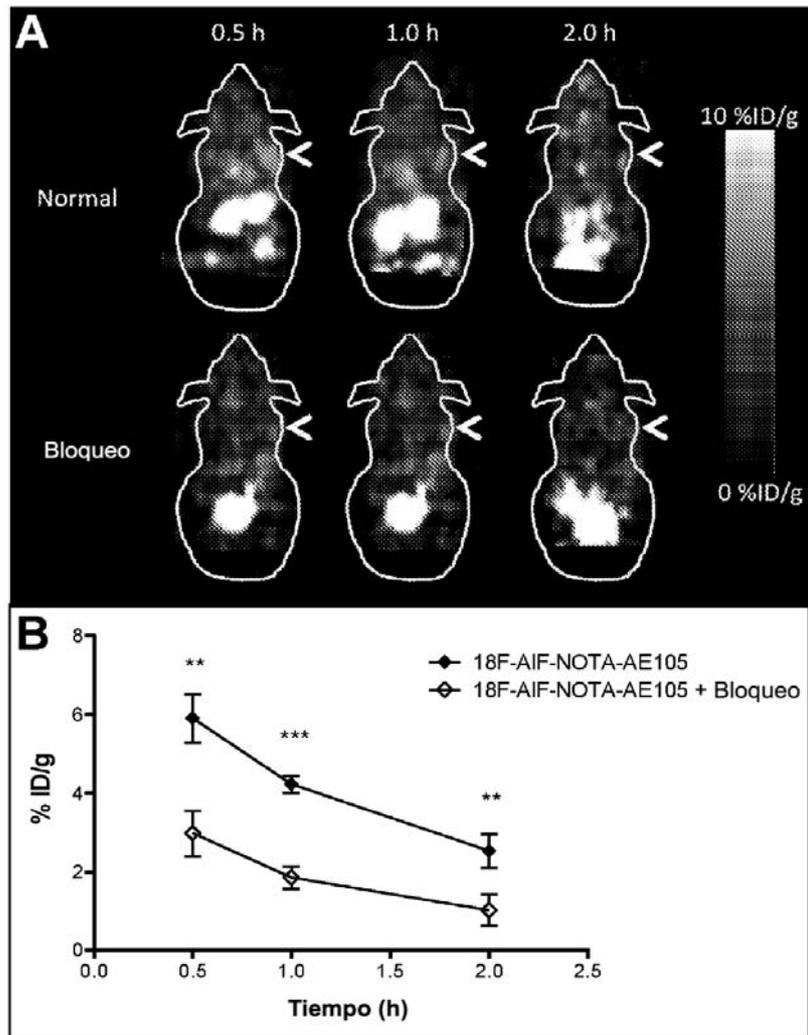


Figura 4

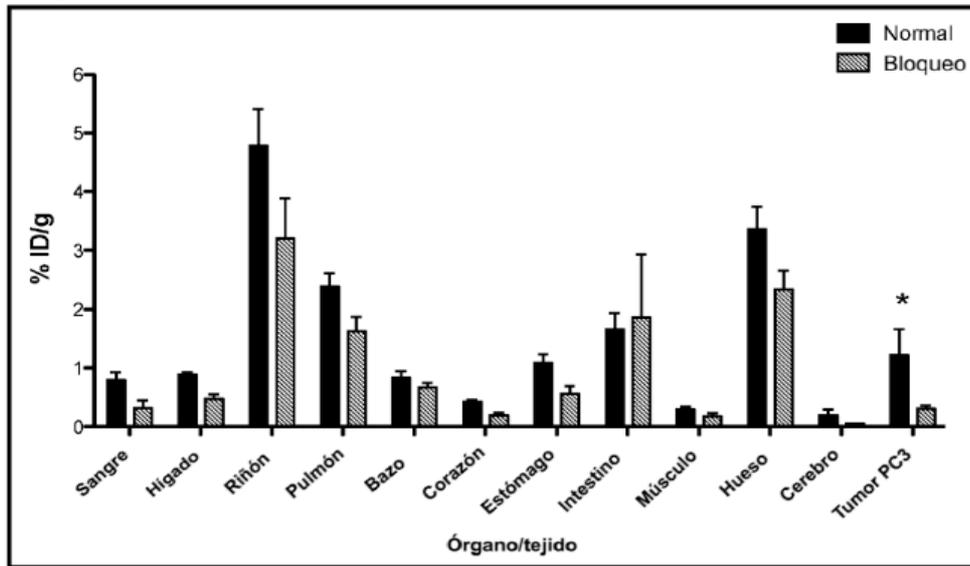


Figura 5

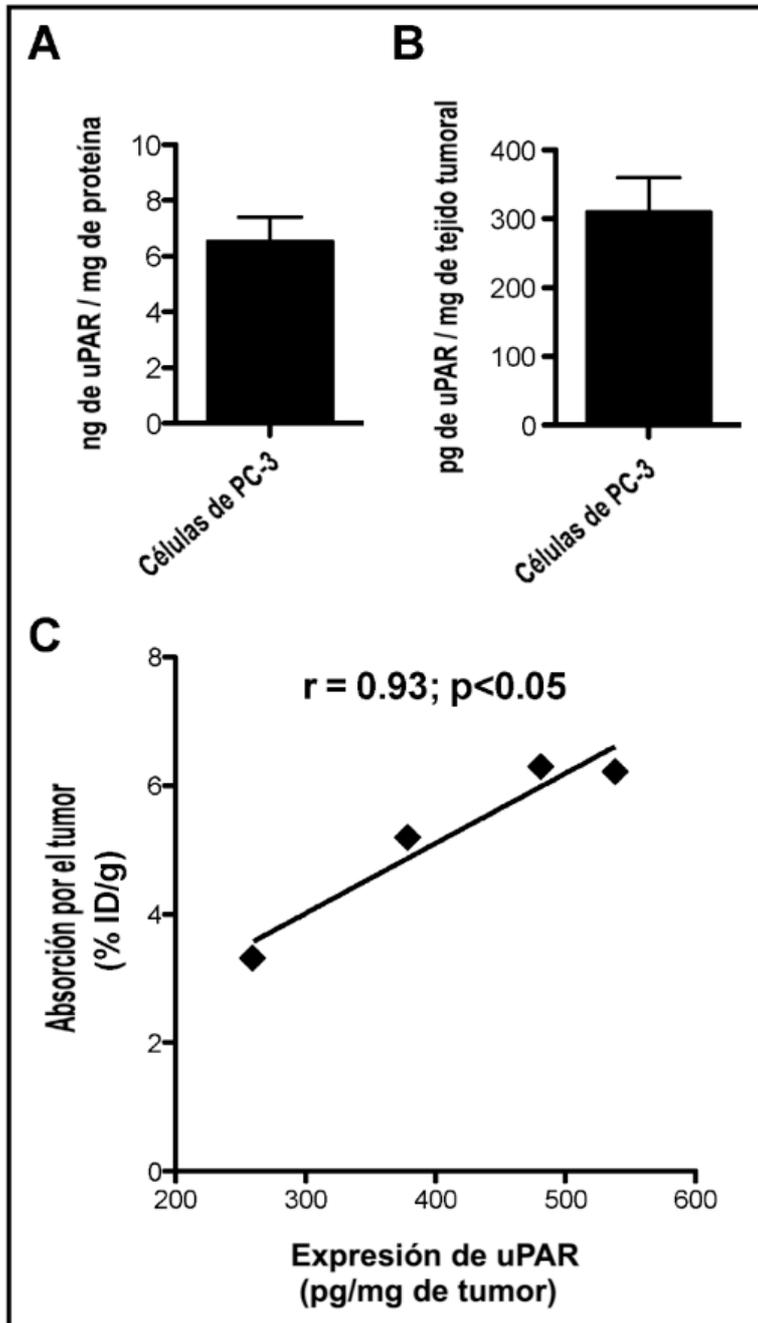


Figura 6

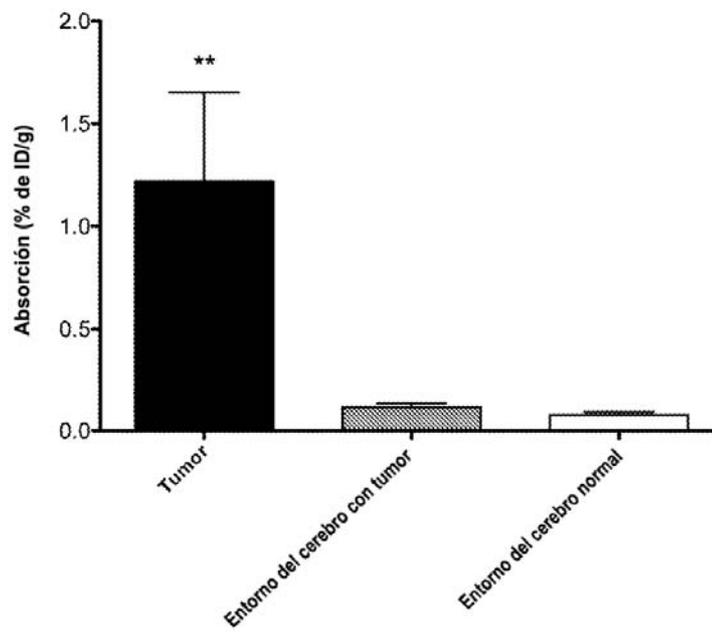
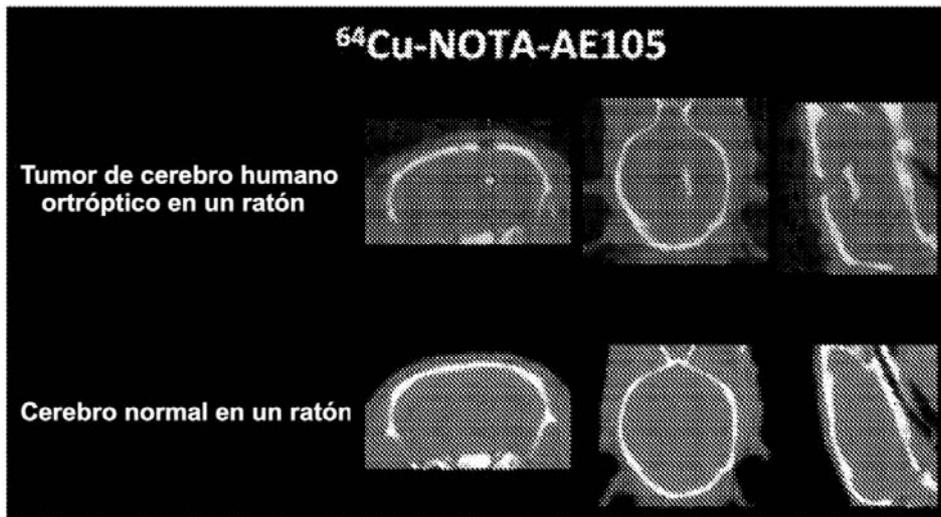


Figura 7

