

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 009**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)

C07K 7/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2021 PCT/EP2021/076107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2022 WO22063850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2021 E 21778502 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024 EP 4188457**

54 Título: **Conjugado o su sal que comprende un receptor de péptido liberador de gastrina antagonista y usos del mismo**

30 Prioridad:

28.09.2020 EP 20306109

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

25.11.2024

73 Titular/es:

**ORANO MED (100.0%)
125 Avenue de Paris
92320 Chatillon, FR**

72 Inventor/es:

**TORGUE, JULIEN;
STALLONS, TANIA;
WONG, AMY y
SAIDI, AMAL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 989 009 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

Conjugado o su sal que comprende un receptor de péptido liberador de gastrina antagonista y usos del mismo

5 Campo técnico

La invención pertenece al campo de los radiofármacos.

10 Más específicamente, la invención se refiere a un conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende un antagonista del receptor del péptido liberador de gastrina (GRPR) y que puede usarse para preparar un radiofármaco o, una vez marcado con un radionúclido, como un radiofármaco.

15 La invención también se refiere a una composición, a un radiofármaco, así como también a un conjunto de partes que comprende el conjugado o la sal del mismo.

La invención se refiere además al uso del conjugado no marcado o de la sal del mismo, así como también del conjunto de partes para preparar un radiofármaco.

20 La invención todavía se refiere al radiofármaco para su uso en la obtención de imágenes in vivo o el tratamiento de cánceres en los que se sobreexpresa el GRPR y, más particularmente, cánceres de próstata, mama y pulmón.

Antecedentes de la invención

25 El cáncer de próstata es el cáncer más frecuente entre los hombres, a excepción del cáncer de piel, y es la segunda causa principal de muerte por cáncer en los hombres en los Estados Unidos.

30 Actualmente se proponen varias opciones de tratamiento para los pacientes con cáncer de próstata en dependencia del tipo de células cancerosas y de la etapa de desarrollo del cáncer, la edad y la salud general de los pacientes, tal como la vigilancia activa, la cirugía, la radioterapia externa, la crioterapia, la terapia hormonal, los ultrasonidos focalizados de alta intensidad y la quimioterapia.

Sin embargo, existe una gran necesidad de mejorar la terapia.

35 Una forma prometedora de mejorar la terapia para el cáncer de próstata es el uso de radiofármacos dirigidos, es decir, fármacos marcados con un radionúclido y que son capaces de dirigirse a las células cancerosas para suministrarles un nivel tóxico de radiación sin afectar a los tejidos sanos normales.

40 Típicamente, los radiofármacos diseñados para el cáncer de próstata son conjugados que comprenden una molécula de vector con alta afinidad por las células del cáncer de próstata y que está unida, posiblemente, a través de un enlazador (o espaciador), un quelante en el que el radionúclido es retenido mediante quelación.

45 Se ha demostrado que el GRPR, también conocido como receptor de bombesina (BBN) subtipo II, se sobreexpresa en varios tumores humanos, que incluye los de próstata, pero también los de mama y pulmón.

Se encontró sobreexpresión de GRPR en el 63 %-100 % de los cánceres de próstata primarios y en más del 50 % de las metástasis linfáticas y óseas.

50 Se informó que la densidad de GRPR era 26 veces mayor en el carcinoma prostático que en la hiperplasia prostática.

Por lo tanto, se ha propuesto una variedad de conjugados para dirigirse a tumores GRPR-positivos y especialmente cánceres de próstata.

55 Informes recientes han demostrado que los antagonistas de GRPR tienen propiedades superiores a los agonistas de GRPR conjugados, lo que produce una mayor captación tumoral y una menor acumulación en tejidos fisiológicos no objetivo GRPR-positivos.

60 Además, se ha demostrado que los agonistas de GRPR inducen efectos secundarios en los pacientes, mediados en virtud de su actividad fisiológica.

Por lo tanto, se ha prestado especial atención al desarrollo de conjugados que comprenden un antagonista de GRPR en lugar de un agonista de GRPR como molécula vector.

65 Ejemplos de tales conjugados se describen, por ejemplo, en la Solicitud de patente europea n.º 2 252 628.

Sin embargo, contrariamente a lo que las enseñanzas de esta referencia podrían hacer pensar, el diseño de un conjugado basado en antagonista de GRPR que pueda realmente usarse como un radiofármaco dirigido para tratar tumores GRPR-positivos es un desafío importante porque las propiedades farmacocinéticas y de orientación tumoral de un conjugado basado en antagonista de GRPR dependen acumulativamente de la elección del quelante, la elección del enlazador y la elección del antagonista de GRPR.

El documento US 2015/0217006 A1 describe el conjugado DOTA-(β Ala)₂-H-d-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂.

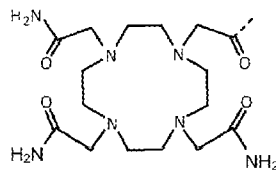
Resumen de la invención

La invención se propone precisamente proponer un conjugado que resulte en una inesperada alta captación y persistente en tumores GRPR-positivos, tales como tumores de próstata, combinado con una captación baja y una rápida eliminación en órganos no objetivo, así como también una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones.

El conjugado cumple la fórmula: C-L-A, en donde C es un quelante, L es un enlazador unido covalentemente al quelante y A es un antagonista de GRPR unido covalentemente al enlazador, y caracterizado porque:

- el quelante corresponde al quelante conocido como DOTAM (1,4,7,10-tetrakis(carbamoilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano) y es de fórmula:

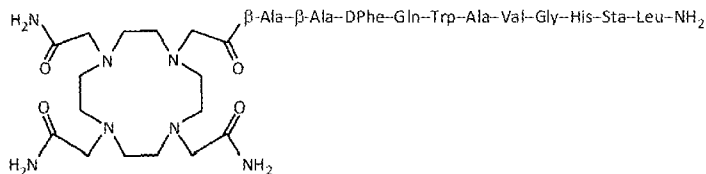


donde la línea de puntos representa el enlace covalente al enlazador;

-el enlazador tiene la fórmula: - β -Ala- β -Ala-; y

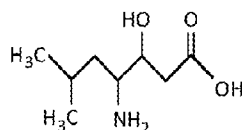
-el antagonista de GRPR es el péptido conocido como JMV594, de secuencia de aminoácidos: -DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂ (SEQ ID NO: 1).

En otras palabras, el conjugado responde a la fórmula:



En lo que precede y en lo que sigue:

- β -Ala se refiere a la beta-alanina, también conocida como ácido 3-aminopropanoico;
- DPhe, Gln, Trp, Ala, Val, Gly, His y Leu se refieren a los α -aminoácidos fenilalanina, glutamina, triptófano, alanina, valina, glicina, histidina y leucina respectivamente, y está la fenilalanina en forma D mientras que la glutamina, triptófano, alanina, valina, histidina y leucina están en forma L; mientras que
- Sta se refiere al γ -aminoácido estatina de fórmula:



también conocido como ácido (3S,4S)-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico.

Además, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que poseen perfiles de toxicidad dentro de un intervalo que les confiere utilidad en aplicaciones farmacéuticas.

Pueden ser farmacéuticamente adecuadas, en especial, las sales de adición de ácidos o bases libres. Las sales de adición ácida pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o de un ácido orgánico.

5 Los ácidos inorgánicos apropiados incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico, y fosfórico, mientras que ácidos orgánicos apropiados pueden seleccionarse a partir de ácidos orgánicos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos, ejemplos de los cuales incluyen ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, 10 4-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, trifluorometanosulfónico, 2-hidroxi-etanosulfónico, p-toluenosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, esteárico, algínico, β -hidroxibutírico, salicílico, galactárico y galacturónico.

15 Las sales de adición de bases son, por ejemplo, sales metálicas que incluyen sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos y metales de transición tales como, por ejemplo, sales de calcio, magnesio, potasio, sodio y zinc, o sales orgánicas hechas de aminas básicas tales como, por ejemplo, N, N-dibenciletildiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína.

20 Para su uso como radiofármaco, el conjugado o la sal del mismo comprende además un radionúclido quelado mediante el quelante.

25 La invención también se refiere a una composición que comprende el conjugado o la sal del mismo en forma no marcada (es decir, libre de cualquier radionúclido) en un medio farmacéuticamente aceptable tal como solución salina, agua libre de metales, ácido ascórbico, etanol, polisorbato 80 (es decir, monooleato de polioxietileno (20) sorbitán, vendido bajo la marca comercial Tween™80), un tampón tal como un tampón de acetato de amonio, o una mezcla de los mismos, ácido ascórbico y etanol que actúan ventajosamente como antioxidantes mientras que el polisorbato 80 reduce ventajosamente la pegajosidad.

30 La invención se refiere además a un radiofármaco listo para su uso, que comprende el conjugado o la sal del mismo en forma radiomarcada (es decir, que comprende el radionúclido quelado por el quelante) en un medio farmacéuticamente aceptable tal como se mencionó anteriormente.

35 La invención también se refiere a un conjunto de partes que puede usarse para preparar un radiofármaco y que comprende al menos:

- un primer contenedor que contiene el conjugado o la sal del mismo en forma no etiquetada; y
- un segundo contenedor que contiene el radionúclido, típicamente en forma de una sal (cloruro, acetato, ...).

40 En los conjuntos de partes, el conjugado o la sal del mismo y el radionúclido pueden estar en cualquier forma apropiada, tal como en forma seca (polvo, por ejemplo), en forma líquida, es decir en solución en un medio farmacéuticamente aceptable tal como se mencionó anteriormente, o en forma congelada.

Como se sabe en sí, el conjunto puede comprender, además:

- 45 - uno o más reactivos y/o uno o más solventes o diluyentes tales como solución salina, agua libre de metales, tampón biológico y similares, y/o
- un folleto con instrucciones para preparar y/o usar el radiofármaco.

50 La invención se refiere además al uso del conjugado no marcado, la sal del mismo o el conjunto de partes, para preparar un radiofármaco, cuyo uso comprende una quelación del radionúclido mediante el quelante del conjugado o la sal del mismo.

55 En lo que antecede, el radionúclido es preferentemente un radionúclido de plomo, en particular ^{203}Pb si el radiofármaco está destinado a usarse con fines de obtener imágenes in vivo o ^{212}Pb si el radiofármaco está destinado a usarse con fines terapéuticos.

60 La invención todavía se refiere al radiofármaco para su uso en la obtención de imágenes in vivo, por ejemplo, mediante Tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), o el tratamiento de un cáncer en el que se sobreexpresa el receptor del péptido liberador de gastrina.

Tal uso comprende administrar una dosis apropiada del radiofármaco al paciente que se va a fotografiar o tratar, típicamente por vía intravenosa y, en caso de una obtención de imágenes in vivo, someter al paciente a la toma de imágenes.

65 Preferentemente, el cáncer es un cáncer de próstata, de mama o de pulmón, con o sin metástasis, en particular un cáncer de próstata.

Otras características y ventajas de la invención se pondrán mejor de manifiesto con la lectura del complemento a la descripción que sigue.

5 Obviamente este complemento a la descripción sólo se da para ilustrar el objeto de la invención y no constituye en ningún caso una limitación de dicho objeto.

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 ilustra los resultados de un estudio de biodistribución realizado con el conjugado de la invención, marcado con ^{212}Pb con una actividad específica de 10 μCi por 14 ng, en ratones desnudos atímicos portadores de tumores PC-3 subcutáneos; los resultados se expresan en términos del por ciento de dosis inyectada por gramo de órgano, expresado como %ID/g, tal como se encontró en los órganos de los ratones 1 hora, 4 horas y 24 horas después de la inyección de la dosis del conjugado de ^{212}Pb en los ratones.

15 Las figuras 2A a 2F ilustran los resultados de un estudio de biodistribución realizado con el conjugado de la invención, marcado con ^{203}Pb con una actividad específica de 10 μCi por 28 ng, en ratones inmunocompetentes libres de tumores; los resultados se expresan en términos del por ciento de la dosis inyectada por gramo de órgano, expresada como %ID/g, tal como se encontró en los órganos de los ratones a los 5 minutos (figura 2A), 30 minutos (figura 2B), 1 hora (figura 2C), 4 horas (figura 2D), 24 horas (figura 2E) y 48 horas (figura 2F) después de la inyección de la dosis del conjugado de ^{203}Pb en los ratones.

20 La figura 2G ilustra las excreciones urinarias, fecales y totales del conjugado de la invención, marcado con ^{203}Pb , expresado en términos del por ciento de la dosis inyectada, expresada como %ID, en ratones inmunocompetentes libres de tumores en función del tiempo después de la inyección de la dosis del conjugado de ^{203}Pb en los ratones, indicadas como t y expresadas en horas.

25 Las figuras 3A a 3C ilustran los resultados de un estudio de biodistribución realizado con el conjugado de la invención, marcado con ^{212}Pb con diferentes actividades específicas, en ratones desnudos atímicos portadores de tumores PC-3 subcutáneos; la figura 3A corresponde a un primer grupo de ratones, denominado como grupo A, que han recibido una dosis del conjugado de ^{212}Pb con actividad específica igual a 10 μCi por 28 ng; la figura 3B corresponde a un segundo grupo de ratones, denominado como grupo B, que han recibido una dosis del conjugado de ^{212}Pb de actividad específica es igual a 10 μCi por 140 ng, mientras que la figura 3C corresponde a un tercer grupo de ratones, denominado como grupo C, que han recibido una dosis del conjugado de ^{212}Pb de actividad específica igual a 10 μCi por 280 ng; en cada figura, los resultados se expresan en términos del por ciento de dosis inyectada por gramo de órgano, expresado como %ID/g, tal como se encontró en los órganos de los ratones 1 hora y 4 horas después de la inyección de la dosis del conjugado de ^{212}Pb en los ratones.

35 La figura 4A ilustra la supervivencia, expresada en %, de ratones desnudos atímicos portadores de tumores PC-3 subcutáneos y que han recibido solo una dosis del conjugado de la invención, marcado con ^{212}Pb con una actividad específica de 10 μCi por 14 ng (1 ciclo), o tres dosis del mismo conjugado a intervalos de 14 días (3 ciclos), o solución salina estéril (control), en función del tiempo después de la inyección de las células cancerosas en los ratones, indicado como t y expresado en semanas.

40 La figura 4B ilustra el volumen tumoral promedio, expresado como V y expresado en mm^3 , presentado por ratones desnudos atímicos portadores de tumores PC-3 subcutáneos y que han recibido solo una dosis del conjugado de la invención, marcado con ^{212}Pb con una actividad específica de 10 μCi por 14 ng (1 ciclo), o tres dosis del mismo conjugado a intervalos de 14 días (3 ciclos), o solución salina estéril (control), en función del tiempo después de la inyección de las células cancerosas en los ratones, indicado como t y expresado en semanas.

45 La Figura 5 ilustra los resultados de un estudio comparativo con el objetivo de comparar la biodistribución del conjugado de la invención, marcado con ^{212}Pb con una actividad específica de 10 μCi por 280 ng, con la de un conjugado, también marcado con ^{212}Pb con la misma actividad específica, que solo se diferencia del conjugado de la invención en que este comprende DOTA como quelante, en ratones desnudos atímicos portadores de tumores PC-3 subcutáneos; los resultados se expresan en términos del por ciento de la dosis inyectada por gramo de órgano, expresado como %ID/g, tal como se encontró en los órganos de los ratones 1 hora, 4 horas y 24 horas después de la inyección de la dosis del conjugado de ^{212}Pb en los ratones; en esta figura, el conjugado de la invención se denomina como conjugado de ^{212}Pb -DOTAM mientras que el conjugado comparativo se denomina como conjugado de ^{212}Pb -DOTA.

50 La figura 6 ilustra los resultados de un estudio comparativo con el objetivo de evaluar la biodistribución de un conjugado, marcado con ^{212}Pb con una actividad específica de 10 μCi por 10 ng, que solo se diferencia del conjugado de la invención en que este comprende un enlazador constituido por una cadena de 3 residuos de ácido glutámico, en ratones desnudos atímicos portadores de tumores PC-3 subcutáneos; los resultados se expresan en términos del por ciento de la dosis inyectada por gramo de órgano, expresado como %ID/g, tal como se encuentra en los órganos de los ratones a las 4 horas después de la inyección de las dosis del conjugado en los ratones.

55 La figura 7 ilustra los resultados de un estudio comparativo con el objetivo de evaluar la biodistribución de un conjugado, marcado con ^{212}Pb con una actividad específica de 10 μCi por 4,1 ng, que solo se diferencia del conjugado de la invención en que este comprende un enlazador constituido por un grupo 4-amino-(1-carboximetil)piperidinilo, en ratones inmunocompetentes libres de tumores; los resultados se expresan en términos del por ciento de la dosis inyectada por gramo de órgano, expresado como %ID/g, tal como se

encuentra en los órganos de los ratones a las 4 horas después de la inyección de las dosis del conjugado en los ratones.

Descripción detallada de la invención

5

I -Preparación del conjugado no marcado de la invención:

I.1-Preparación de la secuencia peptídica β -Ala- β -Ala-dphe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂ (SEQ ID NO: 2):

10

Un sintetizador automatizado de péptidos por microondas (Biotage™ Initiator + Alstra™ - BIOTAGE™) se usó para la síntesis de la secuencia peptídica: β -Ala- β -Ala-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂) en una escala de 0,1 mmol.

15

Se usó la química estándar del 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) con hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y N-hidroxibenzotriazol (HOBT) como activadores.

Se usó una resina de amida de pista para proporcionar un extremo C amidado.

20

Los aminoácidos leucina, valina y β -alanina estaban doblemente acoplados.

Además de estar doblemente acopladas, las dos β -alaninas estaban doblemente desprotegidas.

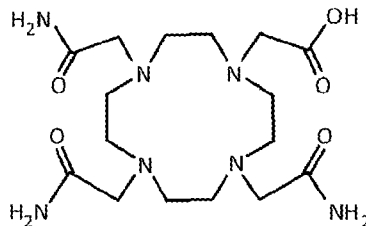
25

Todos los aminoácidos se acoplaron a 75 °C con excepción de la histidina y la estatina que se acoplaron a 48 °C para evitar una racemización de la histidina y una O-acilación de la estatina.

I.2 - Conjugación del DOTAM a la secuencia peptídica:

30

El DOTAM se conjugó a la secuencia peptídica unida a la resina mediante el uso del monoácido DOTAM de fórmula:



35

40

Para ello, en primer lugar, se preactivó el monoácido DOTAM mediante la disolución, en un matraz de parte inferior redonda, 2,25 equivalentes de monoácido DOTAM (0,225 mmol; 90,5 mg), 2,25 equivalentes de hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5,-b]piridinio (HATU; 0,225 mmol; 85,5 mg) y 6,75 equivalentes de diisopropiletilamina (DIEA; 0,675 mmol; 120 μ L) en 3 mL de dimetilformamida (DMF) y al agitar la mezcla durante 30 minutos.

45

Luego, la secuencia peptídica unida a la resina se añadió a la mezcla y la reacción se dejó girar durante toda la noche.

50

Seguido a la terminación de la conjugación, el medio de reacción se filtró a través de un embudo sinterizado grueso para eliminar el exceso de reactivos y el residuo se lavó tres veces con DMF, tres veces con metanol y tres veces con DCM.

55

I.3 - Escisión del conjugado de la resina:

El conjugado se escindió de la resina mediante su suspensión en un cóctel compuesto por 95 % (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5 % (v/v) de triisopropilsilano (TIPS) y 2,5 % (v/v) de H₂O hasta un volumen final de 3 ml.

60

La reacción se centrifugó en un matraz de parte inferior redonda durante tres horas, después de lo cual el medio de reacción se filtró a través de un embudo sinterizado grueso.

65

El TFA se evaporó mediante el uso de gas nitrógeno y el conjugado se precipitó mediante el uso de éter etílico frío. Luego, el matraz se sometió a centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante de éter etílico. Luego, el gránulo se liofilizó durante toda la noche para eliminar el exceso de éter etílico.

I.4 - Purificación del conjugado:

El conjugado se purificó por medio de HPLC de fase inversa mediante el uso de una columna preparativa PHENOMENEX™ Luna™ C18(2) de 10 µm (250 × 50 mm) con un gradiente:

- 5
- t = 0-5 minutos: eluyente A (TFA al 0,1 % en agua) que comprende 1 % de eluyente B (TFA al 0,1 % en acetonitrilo (ACN));
 - t = 5-45 minutos: eluyente B aumenta linealmente del 1 % al 75 % en eluyente A.

10 El conjugado puro tuvo un tiempo de retención de ≈ 24 minutos. El pico recolectado se sometió a evaporación rotatoria para eliminar el solvente orgánico y se liofilizó.

Se obtuvieron así 13 mg del conjugado con una pureza > 95 % determinada con un AGILENT™ Series LC-MS 1100 mediante el uso de una columna analítica RESTREK™ Ultra IBD de 3 µm (150 × 2,1 mm) con gradiente:

- 15
- t = 0-2 minutos: eluyente B (H₂O al 100 %);
 - t = 2-17 minutos: eluyente B disminuye linealmente de 100 % a 0 % en eluyente A (TFA al 0,1 % en ACN).

20 La masa del péptido puro se confirmó con el AGILENT™ Series LC-MS 1100 acopladas con una HEWLETT PACKARD™ Series MSD 1100: esperado 1638,91; observado 1638,7.

El conjugado se almacenó a -80 °C para después marcarse con plomo.

II - Radiomarcación del conjugado de la invención:

25 Para estudios in vivo de distribución y eficacia en ratones, el día de la inyección a los ratones se prepararon conjugados marcados con ²¹²Pb o ²⁰³Pb, denominado en adelante como "conjugado²¹²Pb" y "conjugado²⁰³Pb", respectivamente, en base a la actividad específica en el momento de la conjugación y se diluyeron para obtener la actividad particular necesaria en el momento de la inyección.

30 Para ello, el conjugado obtenido en el punto I anterior se descongeló y se diluyó en agua libre de metales. Luego, se añadió un volumen apropiado de la solución conjugada así obtenida a un vial criogénico que contiene posiblemente volúmenes apropiados de 0,4 M de acetato de amonio ácido ascórbico, etanol y soluciones de tween. A esto le siguió un volumen apropiado de una solución de acetato de ²¹²Pb (ORANO MED) o una solución de cloruro de ²⁰³Pb (LANTHEUS) cuyo pH puede haberse ajustado con una solución de NaOH/acetato de amonio 0,4 M.

35 Las muestras se incubaron a 50 °C durante 10 minutos y se realizó la quelación de ²¹²Pb o ²⁰³Pb por los conjugados se verificó mediante la medición de ²¹²Pb o ²⁰³Pb permaneció libre en las muestras mediante el uso de cromatografía de capa fina instantánea (iTLC).

III - Estudios in vivo con conjugados marcados con plomo de la invención:

A continuación:

- 45
- * los ratones desnudos atímicos usados son Hsd: ratones Desnudos Atímicos-Foxn1nu de ENVIGO™;
 - * los ratones inmunocompetentes usados son Hsd: ratones ICR (CD-1™) de ENVIGO™;
 - * las células de cáncer de próstata humano PC-3 usadas son células ATCC™ CRL-1435™ de la ATCC™;
 - * el contador gamma automático usado es el contador PERKIN ELMER™ Wizard²™; mientras
- 50
- * "Tampón 1" se refiere a una mezcla de solución salina, ácido ascórbico 23 mM, 0,08 % (v/v) de Tween™ 20 y 5 % (v/v) de etanol.
 - * "Tampón 2" se refiere a una mezcla de solución salina, ácido ascórbico 20 mM, 0,02 % (v/v) de Tween™ 80 y 5 % (v/v) de etanol.

55 III.1 - Estudio de biodistribución del conjugado de ²¹²Pb en ratones portadores de xenoinjerto:

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la biodistribución del conjugado marcado con ²¹²Pb con una actividad específica de 10 µCi por 14 ng en ratones desnudos atímicos portadores de un tumor de células de cáncer de próstata humano.

60 Marcación con * ²¹²Pb del conjugado de 10 µCi por 14 ng de conjugado:

65

Soluciones	Volúmenes	²¹² Pb libre
Conjugado (17 ng/μL)	88,2 μL	<5 %
²¹² Pb (1,99 μCi/μL)	753,8 μL	

5

* Preparación de la dosis del conjugado de ²¹²Pb de ≈ 10 μCi/100 μL:

Soluciones	Volúmenes
Conjugado de ²¹² Pb (0,507 μCi/μL)	811,4 μL
Tampón 1	2788,6 μL

10

15

Se prepararon jeringas de insulina que contienen cada una 100 μL de la solución resultante de la mezcla del conjugado de ²¹²Pb/tampón 1 y que corresponde a una dosis del conjugado de ²¹²Pb de ≈ 10 μCi/100 μL, para inyectar a los ratones.

* Diseño del estudio:

20

Se inyectaron por vía subcutánea, en el flanco derecho, 15 ratones desnudos atímicos macho, de 7-8 semanas de edad y un peso de 27,74 ± 1,87 g al inicio del estudio, con 10⁶ células de cáncer de próstata humano PC-3 en 100 μL de medio RPMI-1640/Matrigel™ (v/v: 1/1).

25

Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron los 200-300 mm³ (como se determinó mediante la fórmula: volumen = 0,5 × largo × ancho²).

Luego, cada ratón recibió por vía intravenosa (en la vena de la cola) una dosis del conjugado de ²¹²Pb.

30

Después de esto, los ratones se dividieron en 3 grupos de 5, denominados como "grupo A", "grupo B" y "grupo C" respectivamente.

35

Los ratones del grupo A se sacrificaron 1 hora posterior a la inyección de la dosis; los ratones del grupo B se sacrificaron 4 horas posteriores a la inyección de la dosis, mientras que los ratones del grupo C se sacrificaron 24 horas posteriores a la inyección de la dosis.

40

Se recolectaron sangre, órganos reproductores, intestino delgado, colon con ciego, bazo, páncreas, riñones, estómago, hígado, pulmón, corazón, cerebro, hueso femoral, grasa abdominal, músculo esquelético, cola (como sitio de inyección) y tumor PC-3 de cada ratón sacrificado, se pesaron y se transfirieron a tubos individuales para el contador gamma automático.

45

Se contaron los tubos durante dos minutos. También se contó para cada grupo de ratones, un estándar que consiste en 5 μL de la solución inyectada a los ratones.

El fondo se restó automáticamente de los conteos.

El estándar también se usó para la corrección de la descomposición.

50

Se calculó el por ciento de la dosis inyectada por gramo, expresado como %ID/g, para cada órgano recolectado (media ± desviación estándar).

* Resultados:

Los resultados se ilustran en la figura 1.

55

Como se muestra en esta figura, 1 hora posterior a la inyección de la dosis, la más alta captación (≈ 12 %ID/g) del conjugado de ²¹²Pb se observa en el páncreas probablemente debido a la conocida expresión de GRPR en el páncreas.

60

Sin embargo, la captación del conjugado de ²¹²Pb en el tumor también es alto (≈ 6 %ID/g) y disminuye ligeramente a las 4 y 24 horas posteriores a la inyección de la dosis.

El conjugado de ²¹²Pb tiene un rápido aclaramiento que da como resultado una alta relación tumor/sangre.

65

III.2 - Estudio de biodistribución del conjugado de ²⁰³Pb en ratones inmunocompetentes libres de tumores:

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la biodistribución del conjugado marcado con ^{203}Pb con una actividad específica de 10 μCi por 28 ng en ratones inmunocompetentes libres de tumores.

Marcación con ^{203}Pb del conjugado de 10 μCi por 28 ng de conjugado:

5	Soluciones	Volúmenes	^{203}Pb libre
	Conjugado (1 mg/mL)	8,4 μL	<5 %
10	^{203}Pb (108,3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	24,6 μL	
	Acetato de amonio (0,4 M)	475,4 μL	
	Ácido ascórbico (500 mM)	33,3 μL	
15	NaOH (1 M)	2 μL	

* Preparación de la dosis del conjugado de ^{203}Pb de $\approx 10 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$:

20	Soluciones	Volúmenes
	Conjugado de ^{203}Pb (2,78 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	356,7 μL
	Tampón 1	8643,3 μL

Se prepararon jeringas de insulina que contienen cada una 100 μL de la solución resultante de la mezcla del conjugado de ^{203}Pb /tampón 1 y que corresponde a una dosis del conjugado de ^{203}Pb de $\approx 10 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$, para inyectar a los ratones.

* Diseño del estudio:

30 ratones macho y 30 hembras CD1 inmunocompetentes, de 7-8 semanas de edad y con un peso de $27,75 \pm 2,52 \text{ g}$ para los machos y $25,91 \pm 2,75 \text{ g}$ para las hembras al inicio del estudio, recibieron por vía intravenosa una dosis del conjugado de ^{203}Pb .

Después de esto, los ratones se dividieron en 6 grupos de 10, denominados como grupos A, B, C, D, E y F respectivamente, cada uno de los grupos comprende 5 machos y 5 hembras.

Los ratones del grupo A se sacrificaron 5 minutos posteriores a la inyección de la dosis; los ratones del grupo B se sacrificaron 30 minutos posteriores a la inyección de la dosis; los ratones del grupo C se sacrificaron 1 hora posterior a la inyección de la dosis; los ratones del grupo D se sacrificaron 4 horas posteriores a la inyección de la dosis, mientras que los ratones del grupo E se sacrificaron 24 horas posteriores a la inyección de la dosis.

Los ratones del grupo F se colocaron en jaulas metabólicas y se recolectaron sus excreciones urinarias y fecales a las 4 horas, 24 horas y 48 horas posteriores a la inyección de la dosis; se sacrificaron a las 48 horas posteriores a la inyección de la dosis.

Se recolectaron sangre, vejiga, órganos reproductores, intestino delgado, colon con ciego, bazo, páncreas, riñones, estómago, hígado, pulmón, corazón, cerebro, hueso femoral, grasa abdominal, músculo esquelético, glándulas salivales y cola de cada ratón sacrificado, se pesaron y se transfirieron a tubos individuales para el contador gamma automático.

Se contaron los tubos durante dos minutos. También se contó para cada grupo de ratones, un estándar que consiste en 5 μL de la solución inyectada a los ratones.

El fondo se restó automáticamente de los conteos.

El estándar también se usó para la corrección de la descomposición.

También se realizó el conteo de las excreciones de los ratones del grupo F.

Se calculó el por ciento de la dosis inyectada por gramo, expresado como %ID/g, para cada órgano recolectado (media \pm desviación estándar), mientras que se calculó el por ciento de la dosis inyectada, expresada como %ID, para las excreciones de los ratones del grupo F (media \pm desviación estándar).

* Resultados:

Los resultados se ilustran en las figuras 2A a 2G.

Como se muestra en las figuras 2A a 2F, el conjugado de ^{203}Pb tiene un perfil de biodistribución seguro tanto en ratones macho como hembras.

5

De hecho, hay una alta captación inicial ($> 30\%$ ID/g a los 5 minutos posteriores a la inyección de la dosis) del conjugado de ^{203}Pb en el páncreas, pero el %ID/g está más abajo de 10 para todos los órganos solo 4 horas posteriores a la inyección de la dosis.

10

No se observan diferencias significativas de %ID/g entre los ratones macho y hembras, excepto en las captaciones renales, que son mayores en el punto temporal de 5 minutos en los ratones hembra, probablemente porque los ratones hembras tienen riñones más pequeños que los de los ratones macho, lo que produce un mayor %ID por gramo de órgano.

15

Además, la figura 2G muestra que el conjugado de ^{203}Pb se elimina principalmente por excreción renal.

III.3 - El estudio de la biodistribución del conjugado de ^{212}Pb en ratones portadores de xenoinjertos a diferentes actividades específicas:

20

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la biodistribución del conjugado marcado con ^{212}Pb con una actividad específica que varía de 10 μCi por 28 ng a 10 μCi por 280 ng en ratones desnudos atímicos portadores de un tumor de células de cáncer de próstata humano.

Marcación con * ^{212}Pb del conjugado de 10 μCi por 28 ng de conjugado:

25

Soluciones	Volúmenes	^{212}Pb libre
Conjugado (17 ng/ μL)	82,4 μL	<5 %
^{212}Pb (2,04 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	245 μL	
Ácido ascórbico (500 mM)	16,3 μL	

30

Marcación con * ^{212}Pb del conjugado de 10 μCi por 140 ng de conjugado:

35

Soluciones	Volúmenes	^{212}Pb libre
Conjugado (1 mg/mL)	7 μL	<5 %
^{212}Pb (2,04 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	245 μL	
Ácido ascórbico (500 mM)	16,3 μL	

40

Marcación con * ^{212}Pb del conjugado de 10 μCi por 280 ng de conjugado:

45

Soluciones	Volúmenes	^{212}Pb libre
Conjugado (1 mg/mL)	14 μL	<5 %
^{212}Pb (2,04 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	245 μL	
Ácido ascórbico (500 mM)	16,3 μL	

50

* Preparación de la dosis del conjugado de ^{212}Pb de $\approx 10\ \mu\text{Ci}/100\ \mu\text{L}$:

55

Actividad específica	Soluciones	Volúmenes
10 μCi por 28 ng	Conjugado de ^{212}Pb (1,32 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	134,9 μL
	Tampón 1	1365,1 μL
10 μCi por 140 ng	Conjugado de ^{212}Pb (1,56 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	114,2 μL
	Tampón 1	1385,8 μL
10 μCi por 280 ng	Conjugado de ^{212}Pb (1,65 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	107,9 μL
	Tampón 1	1392,1 μL

65

Se prepararon jeringas de insulina que contienen cada una 100 μL de una de las soluciones resultantes de la mezcla del conjugado de ^{212}Pb /tampón 1 y que corresponde a una dosis del conjugado de ^{212}Pb de $\approx 10 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$, para inyectar a los ratones.

5 * Diseño del estudio:

Se inyectaron por vía subcutánea, en el flanco derecho, 30 ratones desnudos atímicos macho, de 7-8 semanas de edad y un peso de $27,89 \pm 2,27 \text{ g}$ al inicio del estudio, con 10^6 células de cáncer de próstata humano PC-3 en 100 μL de medio RPMI-1640/Matrigel™ (v/v: 1/1).

10

Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron los 200-300 mm^3 .

Los ratones se dividieron en tres grupos de 10, denominados como grupos A, B y C respectivamente.

15

Cada ratón del grupo A recibió por vía intravenosa una dosis del conjugado de ^{212}Pb con actividad específica igual a 10 μCi por 28 ng; cada ratón del grupo B recibió por vía intravenosa una dosis del conjugado de ^{212}Pb con actividad específica igual a 10 μCi por 140 ng mientras que cada ratón del grupo C recibió por vía intravenosa una dosis del conjugado de ^{212}Pb con actividad específica igual a 10 μCi por 280 ng.

20

Se sacrificaron 5 ratones de cada uno de los grupos A, B y C 1 hora posterior a la inyección de la dosis, mientras que se sacrificaron 5 ratones de cada uno de los grupos A, B y C 4 horas posteriores a la inyección de la dosis.

25

Se recolectaron sangre, órganos reproductores, intestino delgado, colon con ciego, bazo, páncreas, riñones, estómago, hígado, pulmón, corazón, cerebro, hueso femoral, grasa abdominal, músculo esquelético, cola y tumor PC-3 de cada ratón sacrificado, se pesaron y se transfirieron a tubos individuales para el contador gamma automático.

30

Se contaron los tubos durante dos minutos. También se contaron los estándares que consisten de 5 μL de las soluciones inyectadas a los ratones.

El fondo se restó automáticamente de los conteos.

Los estándares también se usaron para la corrección de la descomposición.

35

Se calculó el por ciento de la dosis inyectada por gramo, expresado como %ID/g, para cada órgano recolectado (media \pm desviación estándar).

* Resultados:

40

Los resultados se ilustran en las figuras 3A a 3C.

Como se muestra en estas figuras, cuanto menor sea la actividad específica del conjugado de ^{212}Pb , menor es la captación en el órgano sano, sin afectar sin embargo la captación en el tumor.

45

III.4 - Estudio de la eficacia del conjugado de ^{212}Pb en ratones portadores de xenoinjerto:

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia de un ciclo de tratamiento (ciclo 1) o tres ciclos de tratamiento (ciclos 1, 2 y 3) mediante el uso del conjugado de la invención, marcado con ^{212}Pb con una actividad específica de 10 μCi por 14 ng, en ratones desnudos atímicos portadores de un tumor de células de cáncer de próstata humano.

50

Marcación con * ^{212}Pb del conjugado de 10 μCi por 14 ng de conjugado:

55

Ciclos	Soluciones	Volúmenes	^{212}Pb libre
Ciclo 1	Conjugado (17 ng/ μL)	44,12 μL	<5 %
	^{212}Pb (2,42 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	310 μL	
	Ácido ascórbico (500 mM)	20,67 μL	
Ciclo 2	Conjugado (17 ng/ μL)	29,4 μL	<5 %
	^{212}Pb (2,77 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	734,2 μL	

65

ES 2 989 009 T3

	Ácido ascórbico (500 mM)	48,95 µL	
5	Ciclo 3	Conjugado (17 ng/µL)	58,8 µL
		²¹² Pb (4,9 µCi/µL)	204,1 µL
		Ácido ascórbico (500 mM)	13,6 µL
			<5 %

10 * Preparación de ²¹²Pb Dosis de conjugado de Pb de ≈ 10 µCi/100 µL:

Ciclos	Soluciones	Volúmenes
15	Ciclo 1	Conjugado de ²¹² Pb (1,36 µCi/µL)
		Solución salina
20	Ciclo 2	Conjugado de ²¹² Pb (0,354 µCi/µL)
		Solución salina
25	Ciclo 3	Conjugado de ²¹² Pb (2,35 µCi/µL)
		Solución salina

30 Se prepararon jeringas de insulina que contienen cada una 100 µL de una de las soluciones resultante de la mezcla del conjugado de ²¹²Pb/solución salina y que corresponde a una dosis del conjugado de ²¹²Pb de ≈ 10 µCi/100 µL, para inyectar a los ratones.

* Diseño del estudio:

35 Se inyectaron por vía subcutánea, en el flanco derecho, 40 ratones desnudos atímicos macho, de 7-8 semanas de edad y un peso de 28,58 ± 1,97 g al inicio del estudio, con 10⁶ células de cáncer de próstata humano PC-3 en 100 µL de medio RPMI-1640/Matrigel™ (v/v: 1/1).

Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron los 200-300 mm³.

40 20 ratones recibieron por vía intravenosa una dosis del ciclo 1 a los 10 días posteriores a la inyección de células cancerosas, mientras que 10 ratones recibieron por vía intravenosa una dosis de 100 µL de solución salina estéril (control).

45 De los 20 ratones que habían recibido la dosis del ciclo 1, 10 recibieron además una dosis del ciclo 2 a los 24 días posteriores a la inyección de células cancerosas y una dosis del ciclo 3 a los 38 días posteriores a la inyección de células cancerosas.

Durante el estudio, los ratones cuyo volumen tumoral alcanzó los 2000 mm³ se sacrificaron inmediatamente.

50 Además, los ratones se sacrificaron antes de la terminación programada del estudio cuando mostraron signos de angustia o dolor insoportable debido a la carga tumoral, efectos secundarios de las inyecciones o una combinación de dos o más de los siguientes criterios de terminación: pérdida de peso aguda (por ejemplo, pérdida de peso del 15 % en dos días consecutivos); mal estado del tumor (por ejemplo, ulceración, marcas de dientes o heridas abiertas); desaliño/falta de aseo durante 5 días; letargo o movilidad reducida durante 3 días; debilidad/problemas de equilibrio durante 5 días; apariencia jorobada; diarrea; parálisis; anemia grave e hipotermia).

* Resultados:

60 Los resultados se ilustran en las figuras 4A y 4B.

65 Como se muestra en la figura 4A, uno o tres ciclos de tratamiento mediante el uso del conjugado de la invención conducen a un tiempo de supervivencia medio que aumenta de 7,9 semanas (control) a 13,9 semanas (3 ciclos).

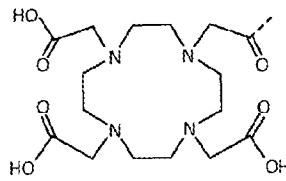
No hay diferencia significativa entre uno y tres ciclos de tratamiento.

Es posible que el intervalo de tiempo entre dos dosis sucesivas en los tres ciclos de tratamiento sea subóptimo y que la eficacia de un tratamiento con dosis múltiples pueda aumentarse mediante la optimización del intervalo de tiempo entre dos dosis sucesivas.

IV - Estudios comparativos:

IV.1 - Impacto de un cambio de quelante en la biodistribución en ratones portadores de xenoinjertos:

El presente estudio tuvo como objetivo comparar la biodistribución del conjugado de la invención, marcado con ²¹²Pb, en ratones desnudos atímicos portadores de un tumor de células de cáncer de próstata humano con el de un conjugado también marcado con ²¹²Pb y solamente se diferencia del conjugado de la invención en que el quelante corresponde a DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) y es de fórmula:



donde la línea de puntos representa el enlace covalente al enlazador.

Para mayor claridad, el conjugado de la invención se denomina en adelante como "conjugado DOTAM", mientras que el conjugado comparativo se denomina en adelante como "conjugado DOTA".

* Preparación del conjugado DOTA no marcado:

El conjugado DOTA no marcado se preparó al seguir el mismo protocolo, como se describió en el punto I anterior, excepto que DOTAM se reemplazó con DOTA en la etapa de conjugación del quelante a la secuencia peptídica.

Marcación con * ²¹²Pb del conjugado DOTAM y del conjugado DOTA de 10 µCi por 280 ng de conjugado:

Conjugados	Soluciones	Volúmenes	²¹² Pb libre
Conjugado DOTAM	Conjugado (1 mg/µL)	16,8 µL	< 5 %
	Ácido ascórbico (500 mM)	8 µL	
	Etanol absoluto	10 µL	
	Tween™ 80	0,04 µL	
	Agua libre de metales	28,8 µL	
	²¹² Pb (4,4 µCi/µL)	136,4 µL	
Conjugado DOTA	Conjugado (1 mg/µL)	16,8 µL	< 5 %
	Ácido ascórbico (500 mM)	8 µL	
	Etanol absoluto	10 µL	
	Tween™ 80	0,04 µL	
	Agua libre de metales	28,8 µL	
	²¹² Pb (4,4 µCi/µL)	136,4 µL	

* Preparación de la dosis del conjugado de ^{212}Pb -DOTAM y del conjugado ^{212}Pb -DOTA de $\approx 10 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$:

Conjugados	Soluciones	Volúmenes
5 Conjugado de ^{212}Pb -DOTAM	Conjugado de ^{212}Pb -DOTAM (2,73 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	86,7 μL
	Tampón 2	1863,3 μL
Conjugado de ^{212}Pb -DOTA	Conjugado de ^{212}Pb -DOTA (3,14 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	75,4 μL
	Tampón 2	1874,6 μL

10 Se prepararon jeringas de insulina que contienen cada una 100 μL de una de las soluciones resultante de la mezcla del conjugado de ^{212}Pb -DOTAM/tampón 2 y del conjugado de ^{212}Pb -DOTA/tampón 2, y que corresponde a una dosis de $\approx 10 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$, para inyectar a los ratones.

15 * Diseño del estudio:

Se inyectaron por vía subcutánea, en el flanco derecho, 30 ratones desnudos atímicos macho, de 7-8 semanas de edad y un peso de $27,90 \pm 1,9 \text{ g}$ al inicio del estudio, con 10^6 células de cáncer de próstata humano PC-3 en 100 μL de medio RPMI-1640/Matrigel™ (v/v: 1/1).

20 Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron los 200-300 mm^3 .

Los ratones se dividieron en 6 grupos de 5, denominados como grupos A, B, C, D, E y F respectivamente.

25 Cada ratón de los grupos A, B y C recibió por vía intravenosa una de la dosis del conjugado de ^{212}Pb -DOTAM mientras cada ratón de los grupos E, F y F recibió por vía intravenosa una dosis del conjugado de ^{212}Pb -DOTA.

30 Los ratones de los grupos A y D se sacrificaron 1 hora posterior a la inyección de la dosis; los ratones de los grupos B y E se sacrificaron 4 horas posterior a la inyección de la dosis, mientras que los ratones de los grupos C y F se sacrificaron 24 horas posterior a la inyección de la dosis.

35 Se recolectaron sangre, órganos reproductores, intestino delgado, colon con ciego, bazo, páncreas, riñones, estómago, hígado, pulmón, corazón, cerebro, hueso femoral, grasa abdominal, músculo esquelético, cola, glándulas salivales y tumor PC-3 de cada ratón sacrificado, se pesaron y se transfirieron a tubos individuales para el contador gamma automático.

Se contaron los tubos durante dos minutos. También se contaron los estándares que consisten de 5 μL de las soluciones inyectadas a los ratones.

40 El fondo se restó automáticamente de los conteos.

Los estándares también se usaron para la corrección de la descomposición.

45 Se calculó el por ciento de la dosis inyectada por gramo, expresado como %ID/g, para cada órgano recolectado (media \pm desviación estándar).

* Resultados:

Los resultados se ilustran en la figura 5.

50 Como se muestra en esta figura, el conjugado de ^{212}Pb -DOTAM tiene un perfil de biodistribución superior al conjugado de ^{212}Pb -DOTA con mayor retención tumoral durante las primeras 24 horas.

55 Se observa una mayor captación inicial en el páncreas 1 hora posterior a la inyección de la dosis del conjugado de ^{212}Pb -DOTAM.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que GRPR se expresa en el páncreas y esta mayor captación inicial posiblemente sea una traducción de la mayor afinidad de unión del conjugado de ^{212}Pb -DOTAM sobre el conjugado de ^{212}Pb -DOTA para células que expresan GRPR.

60 IV.2 - Impacto de un cambio de enlazador en la biodistribución en ratones:

Estudio en ratones portadores de xenoinjertos:

65 El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la biodistribución de un conjugado marcado con ^{212}Pb con una actividad específica de 10 μCi por 10 ng y que solo se diferencia del conjugado de la invención en que este

comprende un enlazador constituido por una cadena de tres residuos de ácido glutámico, en ratones desnudos atímicos portadores de un tumor de células de cáncer de próstata humano.

Este conjugado se denomina en adelante como "conjugado de ^{212}Pb -3Glu".

5

* Preparación del conjugado 3Glu no marcado:

El conjugado 3Glu no marcado se preparó al seguir el mismo protocolo, como se describió en el punto I anterior, excepto que los dos residuos de β -alanina se reemplazaron con tres residuos glutámicos en la etapa de preparación de la secuencia peptídica.

10

Marcación con * ^{212}Pb del conjugado 3Glu de 10 μCi por 10 ng de conjugado:

Soluciones	Volúmenes	^{212}Pb libre
Conjugado de 3Glu (17 ng/ μL)	14,7 μL	<5 %
^{212}Pb (0,586 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	427 μL	

15

20

* Preparación de la dosis del conjugado ^{212}Pb -3Glu de $\approx 10 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$:

Soluciones	Volúmenes
Conjugado de ^{212}Pb -3Glu (0,415 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	203,6 μL
Solución salina	546,4 μL

25

30

Se prepararon jeringas de insulina que contienen cada una 100 μL de la solución resultante de la mezcla del conjugado de ^{212}Pb -3Glu/solución salina y que corresponde a una dosis del conjugado de ^{212}Pb -3Glu de $\approx 10 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$, para inyectar a los ratones.

35

* Diseño del estudio:

Se inyectaron por vía subcutánea, en el flanco derecho, 5 ratones desnudos atímicos macho, de 7-8 semanas de edad y un peso de $21,25 \pm 0,9 \text{ g}$ al inicio del estudio, con 10^6 células de cáncer de próstata humano PC-3 en 100 μL de medio RPMI-1640/Matrigel™ (v/v: 1/1).

40

Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron los 200-300 mm^3 .

Cada ratón recibió por vía intravenosa una dosis del conjugado de ^{212}Pb -3Glu.

Los ratones se sacrificaron 4 horas posteriores a la inyección de la dosis.

45

Se recolectaron sangre, vejiga, órganos reproductores, intestino delgado, colon con ciego, bazo, páncreas, riñones, estómago, hígado, pulmón, corazón, cerebro, hueso femoral, grasa abdominal, músculo esquelético, cola y tumor PC-3 de cada ratón sacrificado, se pesaron y se transfirieron a tubos individuales para el contador gamma automático.

50

Se contaron los tubos durante dos minutos. También se contaron los estándares que consisten en 5 μL de las soluciones inyectadas a los ratones.

55

El fondo se restó automáticamente de los conteos.

Los estándares también se usaron para la corrección de la descomposición.

Se calculó el por ciento de la dosis inyectada por gramo, expresado como %ID/g, para cada órgano recolectado (media \pm desviación estándar).

60

* Resultados:

Los resultados se ilustran en la figura 6.

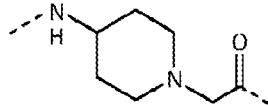
65

Como se muestra en esta figura, el simple remplazo del enlazador $-\beta\text{-Ala-}\beta\text{-Ala-}$ con un enlazador $-\text{Glu-Glu-}$ da como resultado un perfil de biodistribución completamente diferente ya que no se observa una captación inicial significativa en el páncreas ni una captación tumoral significativa para el conjugado de $^{212}\text{Pb-3Glu}$.

5 Estudio en ratones inmunocompetentes libres de tumores:

El estudio tuvo como objetivo evaluar la biodistribución de un conjugado marcado con ^{212}Pb con una actividad específica de 10 mCi por 4,1 ng y que solo se diferencia del conjugado de la invención en que este comprende un enlazador constituido por un grupo 4-amino-(1-carboximetil)piperidinilo, de fórmula:

10



15

donde las líneas de puntos representan los enlaces covalentes al DOTAM y al antagonista GRPR respectivamente, en ratones inmunocompetentes libres de tumores.

20

Este conjugado se denomina en adelante como "conjugado $^{212}\text{Pb-ACMP}$ ".

* Preparación del conjugado ACMP no marcado:

25

El conjugado ACMP no marcado sigue el mismo protocolo como se describió en el punto I anterior, excepto que la síntesis de péptidos se detuvo después del acoplamiento de DPhe y 4-amino-(1-carboximetil)piperidina que se conjugó a la secuencia de péptidos antes de conjugar el DOTAM.

Marcación con * ^{212}Pb del conjugado ACMP de 10 μCi por 4,1 ng de conjugado:

30

Soluciones	Volúmenes	^{212}Pb libre
Conjugado de ACMP (17 ng/ μL)	12,05 μL	<5%*
^{212}Pb (1,07 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	467 μL	
* La quelación tardó 30 minutos.		

35

* Preparación de la dosis del conjugado de $^{212}\text{Pb-ACMP}$ de $\approx 10 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$:

40

Soluciones	Volúmenes
Conjugado de $^{212}\text{Pb-ACMP}$ (0,49 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	177,6 μL
Solución salina	572,4 μL

45

Se prepararon jeringas de insulina que contienen cada una 100 μL de la solución resultante de la mezcla del conjugado de $^{212}\text{Pb-ACMP}$ /solución salina y que corresponde a una dosis del conjugado de $^{212}\text{Pb-ACMP}$ de $\approx 10 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$, para inyectar a los ratones.

50

* Diseño del estudio:

Se inyectaron por vía intravenosa 5 ratones hembra inmunocompetentes CD1, de 7-8 semanas de edad, con una dosis del conjugado de $^{212}\text{Pb-ACMP}$.

55

Los ratones se sacrificaron 4 horas posteriores a la inyección de la dosis.

Se recolectaron sangre, vejiga, órganos reproductores, intestino delgado, colon con ciego, bazo, páncreas, riñones, estómago, hígado, pulmón, corazón, cerebro, hueso femoral, grasa abdominal y músculo esquelético de cada ratón sacrificado, se pesaron y se transfirieron a tubos individuales para un contador gamma automático.

60

Se contaron los tubos durante dos minutos. También se contaron los estándares que consisten de 5 μL de las soluciones inyectadas a los ratones.

65

El fondo se restó automáticamente de los conteos.

Los estándares también se usaron para la corrección de la descomposición.

Se calculó el por ciento de la dosis inyectada por gramo, expresado como %ID/g, para cada órgano recolectado (media \pm desviación estándar).

5

* Resultados:

Los resultados se ilustran en la figura 7.

10

Como se muestra en esta figura, el simple remplazo del enlazador $-\beta$ -Ala- β -Ala- con un enlazador 4-amino-(1-carboximetil)piperidinilo da como resultado un perfil de seguridad significativamente menor con una captación en los riñones que es 5 veces mayor.

Referencias citadas EP-A-2 252 628

15

20

25

30

35

40

45

50

55

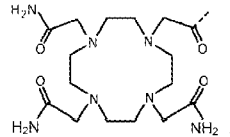
60

65

REIVINDICACIONES

1. Conjugado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el conjugado es de fórmula: C-L-A, en donde C es un quelante, L es un enlazador unido covalentemente al quelante y A es un antagonista del receptor del péptido liberador de gastrina unido covalentemente al enlazador, caracterizado porque:

- el quelante tiene la fórmula:

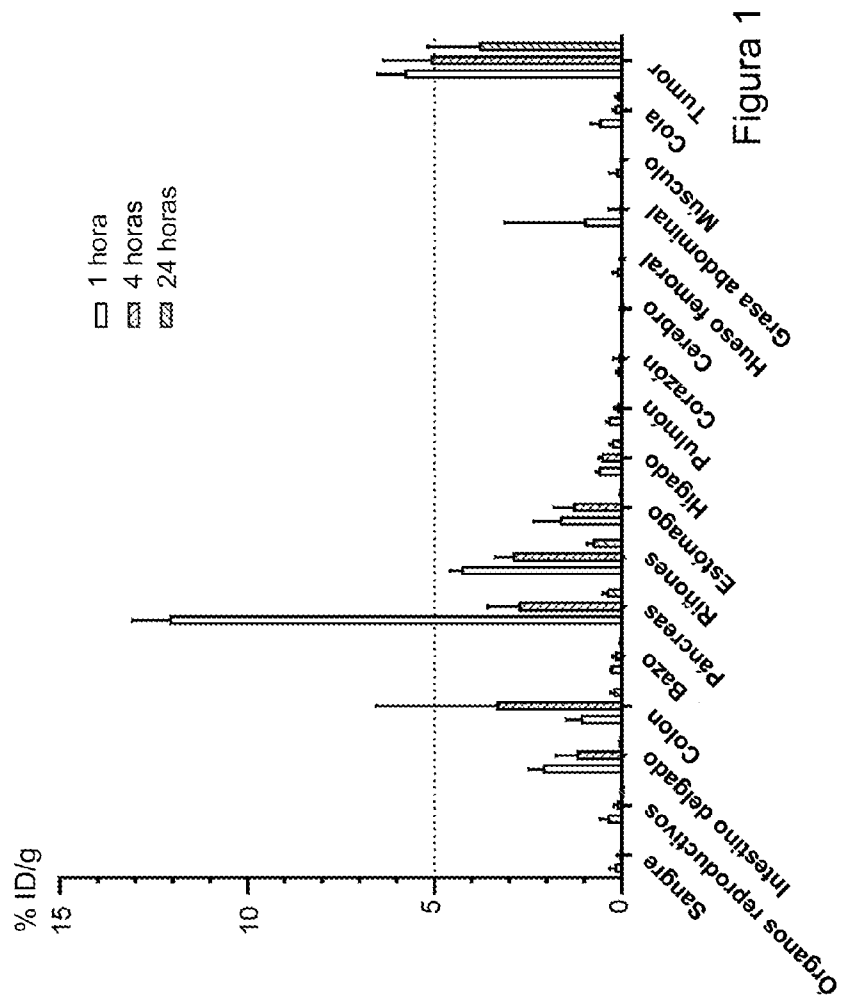


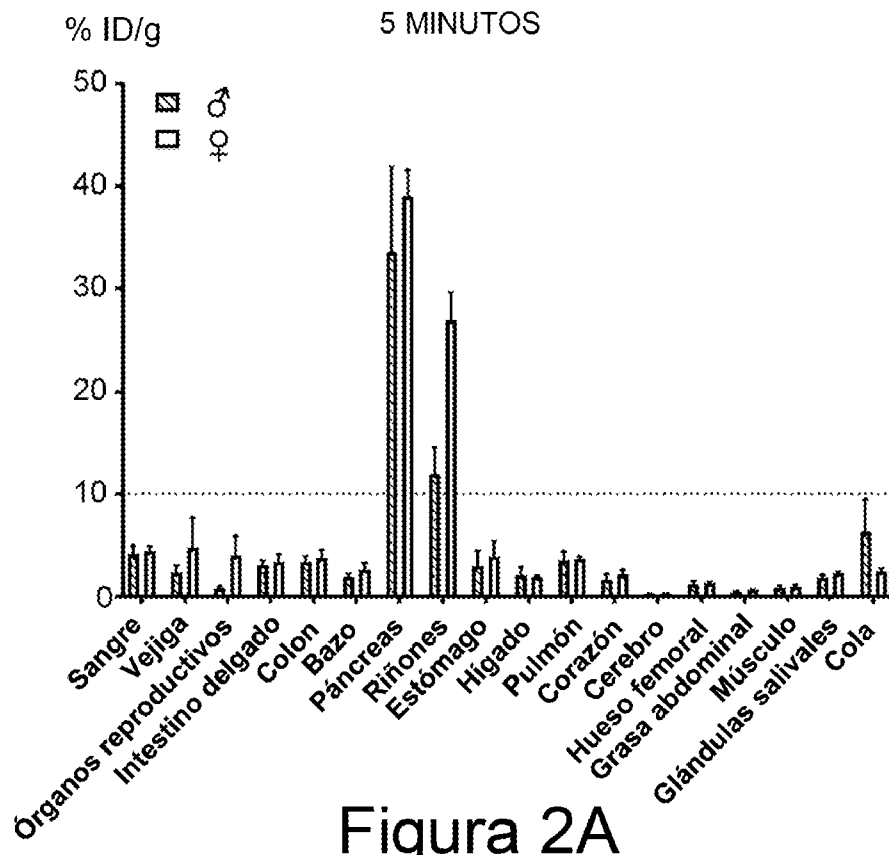
donde la línea de puntos representa el enlace covalente al enlazador;

- el enlazador tiene la fórmula: -β-Ala-β-Ala-; y

- el antagonista del receptor del péptido liberador de gastrina tiene la secuencia de aminoácidos: -DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂ (SEQ ID NO: 1).

2. Conjugado o sal de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un radionúclido quelado mediante el quelante.
3. Conjugado o sal de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el radionúclido es un radionúclido de plomo, preferentemente ²⁰³Pb o ²¹²Pb.
4. Composición, caracterizada porque comprende un conjugado o sal de acuerdo con la reivindicación 1, en un medio farmacéuticamente aceptable.
5. Radiofármaco, caracterizado porque comprende un conjugado o sal de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en un medio farmacéuticamente aceptable.
6. Conjunto de partes, caracterizado porque comprende al menos:
- un primer contenedor que contiene un conjugado o sal de acuerdo con la reivindicación 1; y
 - un segundo contenedor que contiene un radionúclido.
7. Conjunto de partes de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el radionúclido es un radionúclido de plomo, preferentemente ²⁰³Pb o ²¹²Pb.
8. Uso de un conjugado o sal de acuerdo con la reivindicación 1, para preparar un radiofármaco, que comprende una quelación de un radionúclido mediante el quelante del conjugado o sal del mismo.
9. Uso de un conjunto de partes de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para preparar un radiofármaco, que comprende una quelación del radionúclido mediante el quelante del conjugado o sal del mismo.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que el radionúclido es un radionúclido de plomo, preferentemente ²⁰³Pb o ²¹²Pb.
11. Radiofármaco de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en la obtención de imágenes in vivo o el tratamiento de un cáncer en el que se sobreexpresa el receptor del péptido liberador de gastrina.
12. Radiofármaco para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el cáncer es un cáncer de próstata, de mama o de pulmón, preferentemente un cáncer de próstata.





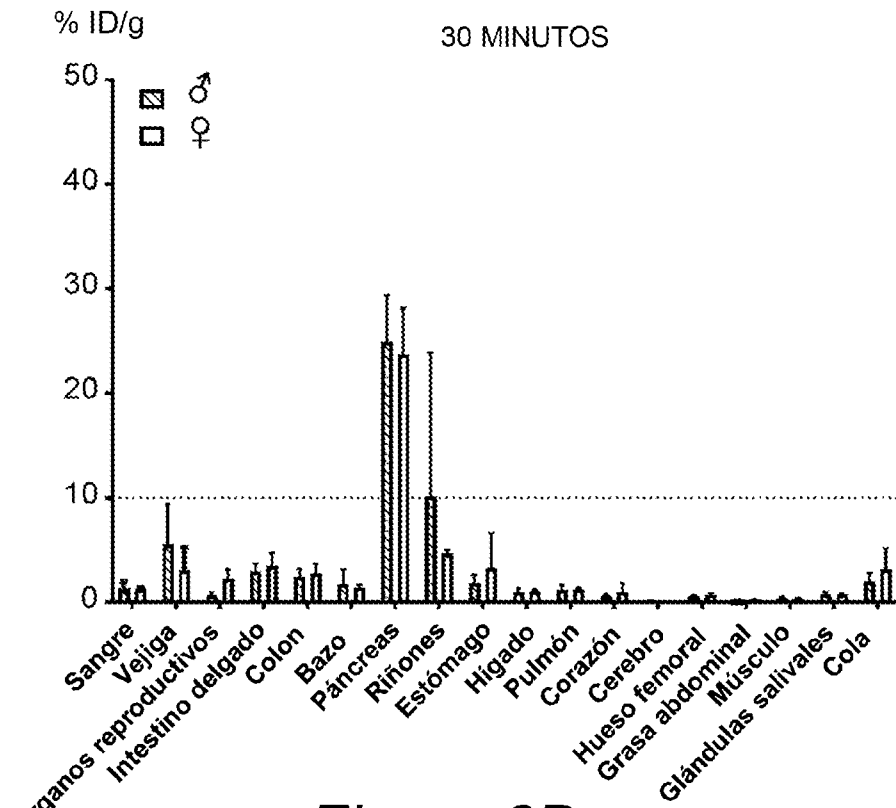
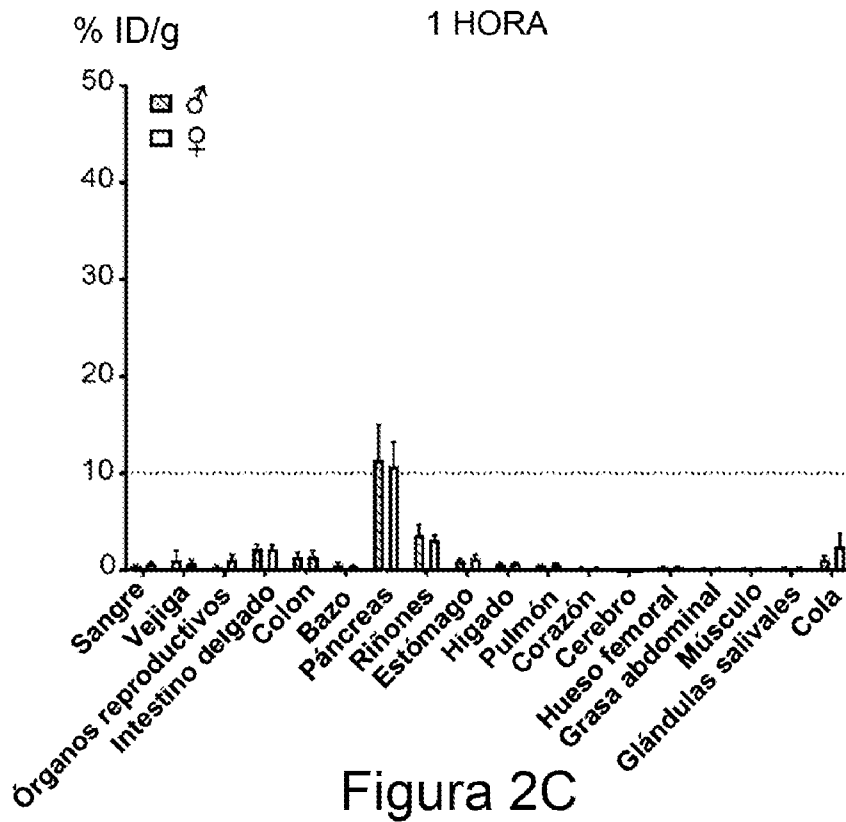
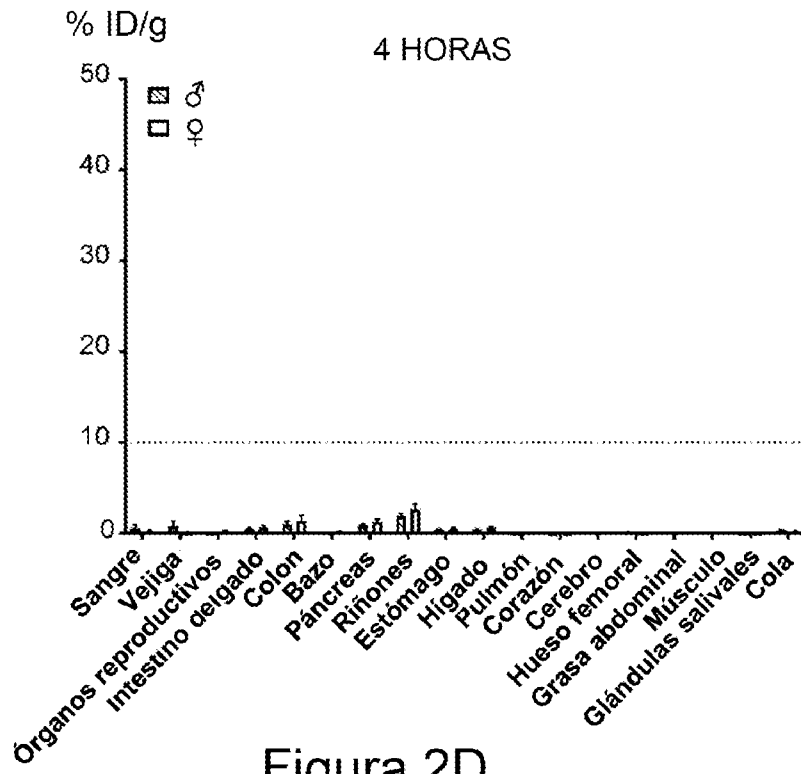


Figura 2B





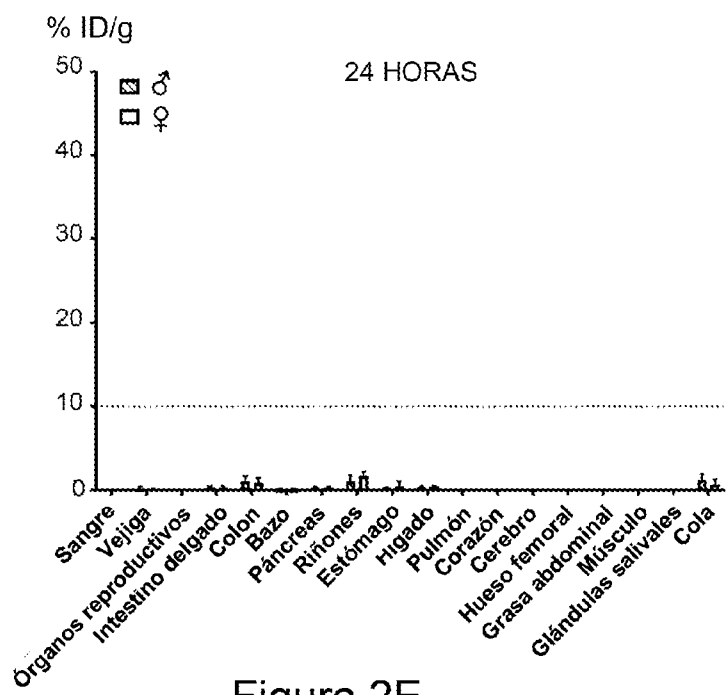


Figura 2E

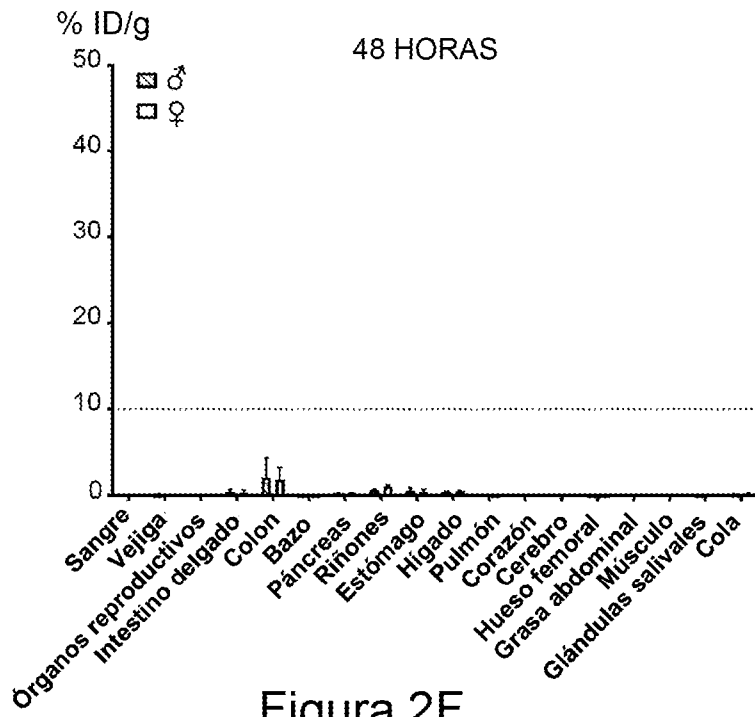


Figura 2F

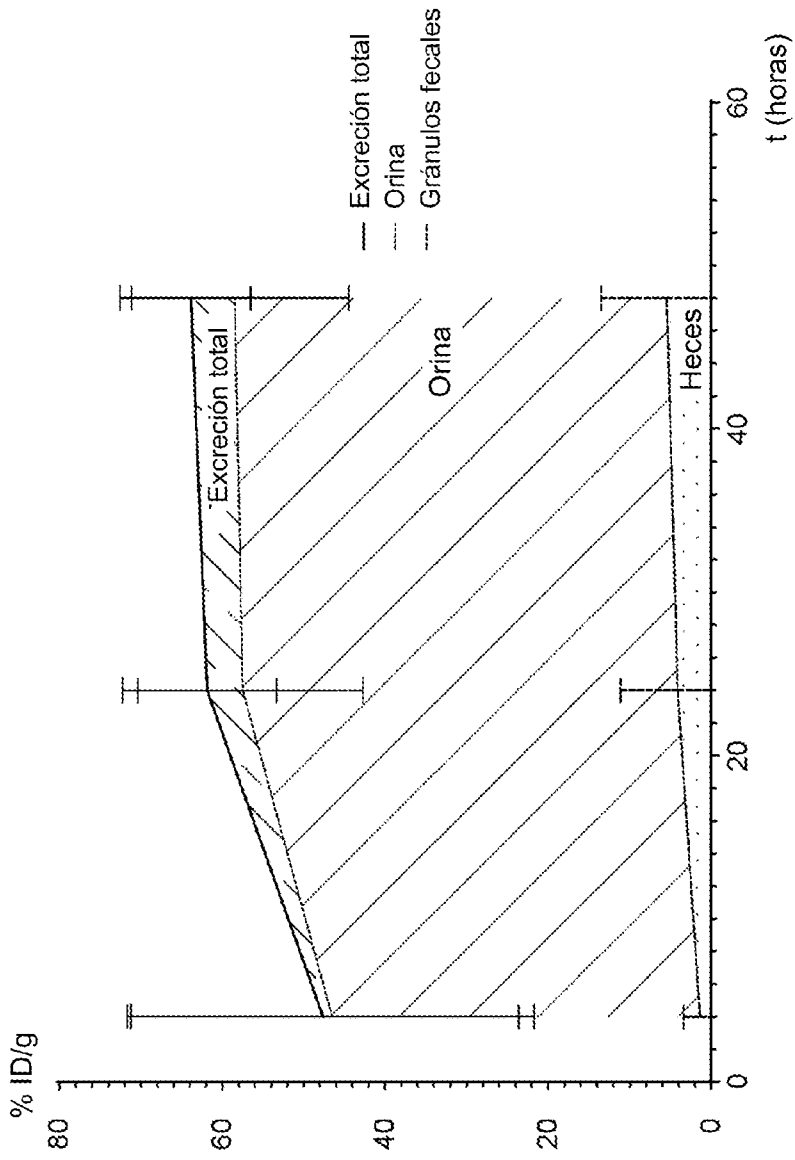


Figura 2G

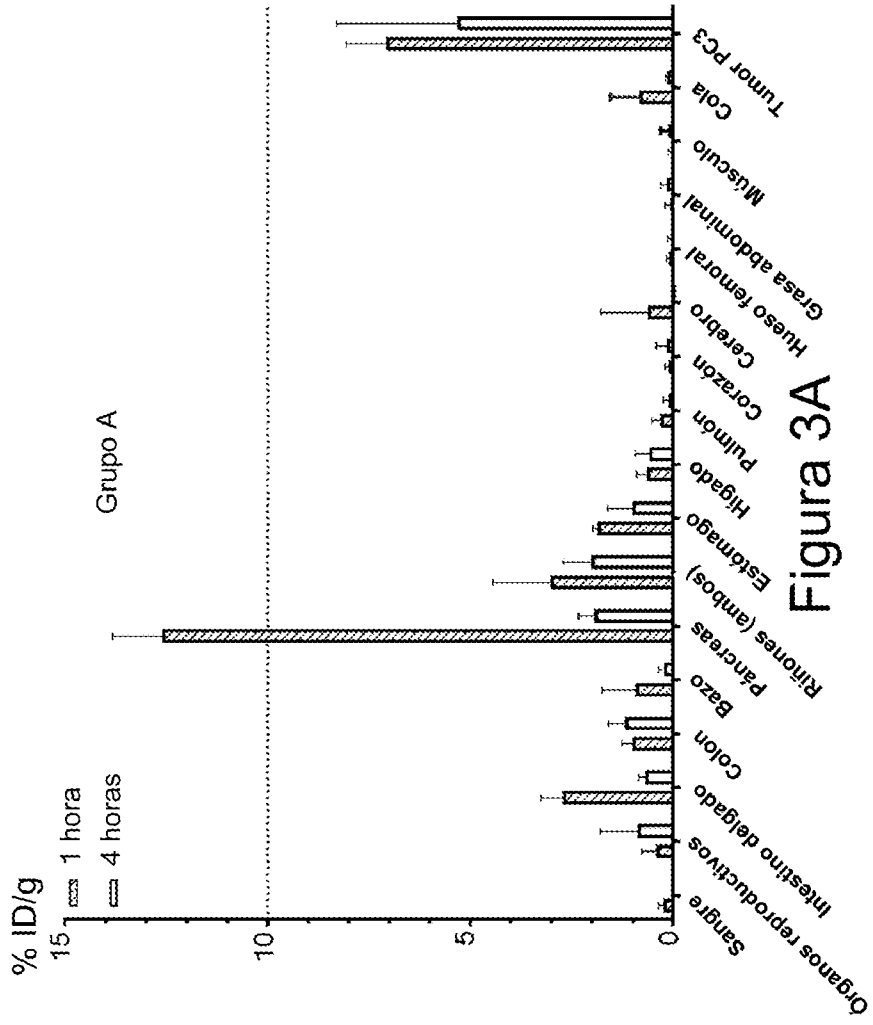


Figura 3A

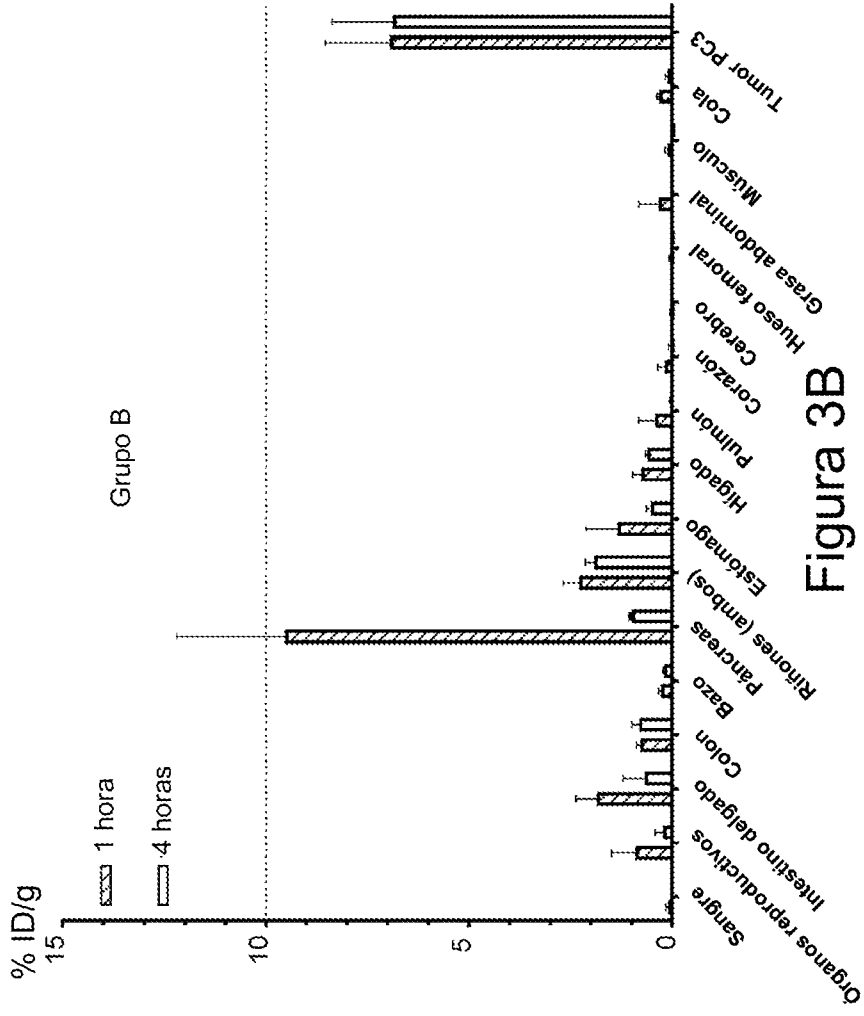


Figura 3B

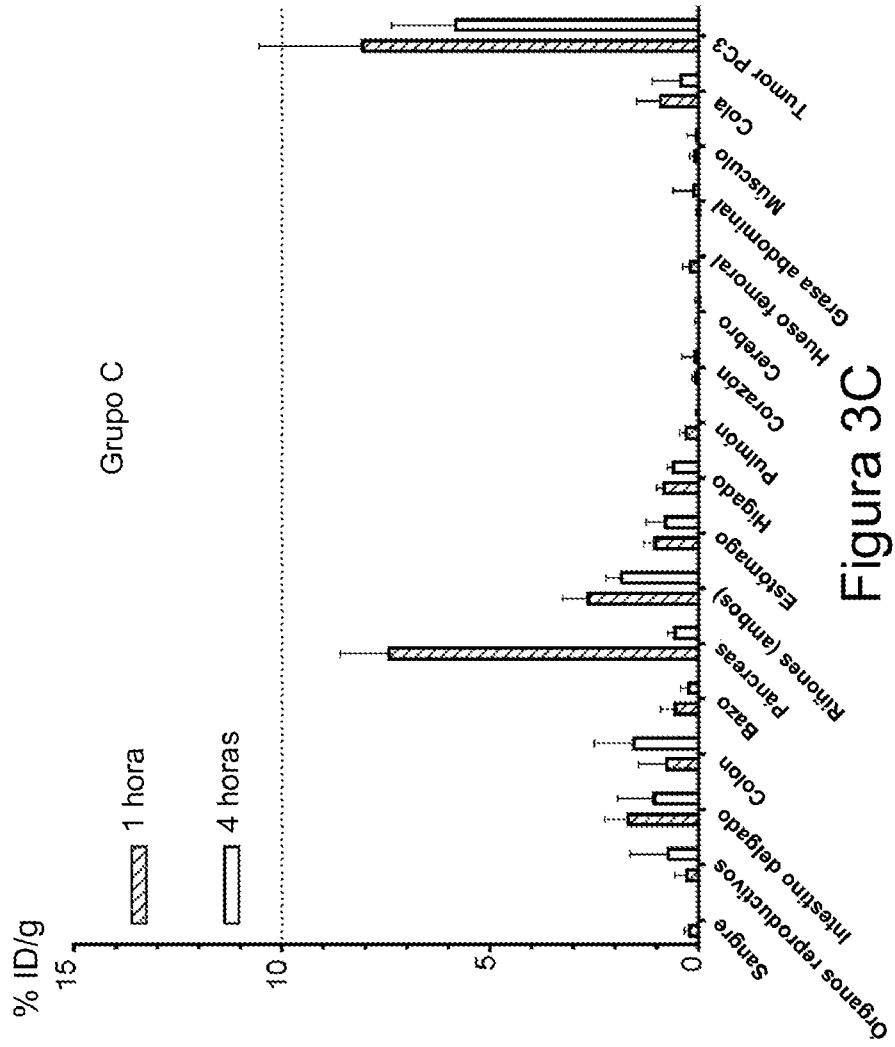


Figura 3C

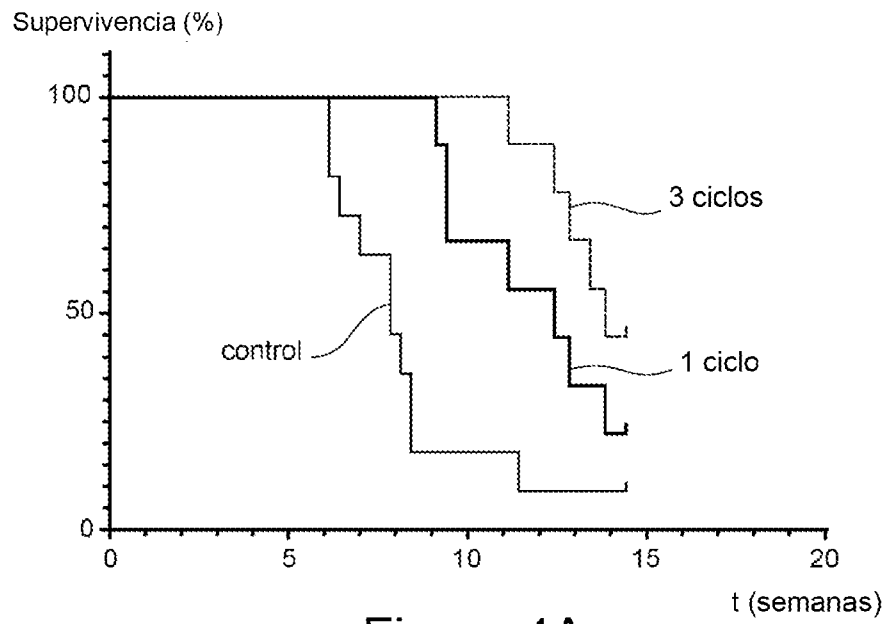


Figura 4A

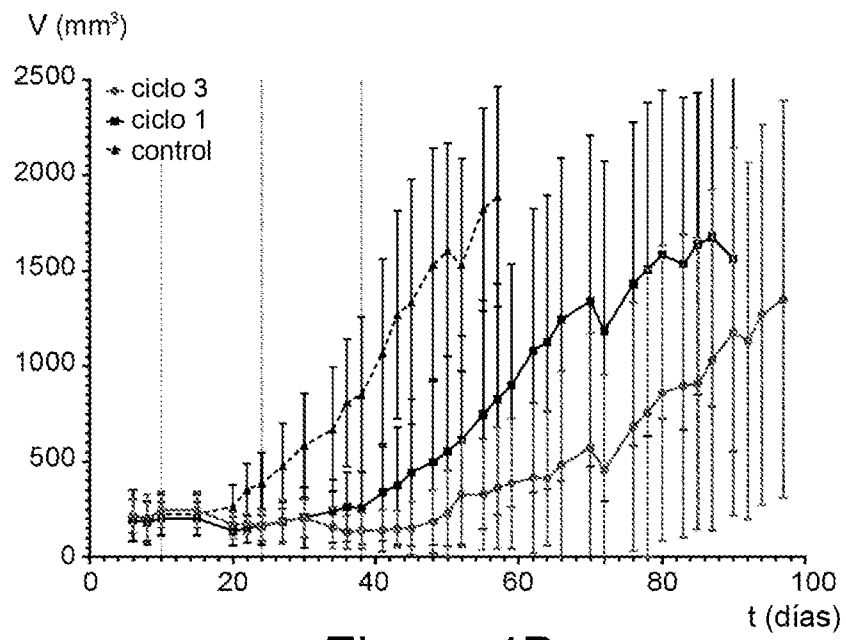


Figura 4B

