



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 590**

51 Int. Cl.:

C07D 487/08 (2006.01)

C07F 1/08 (2006.01)

A61K 51/02 (2006.01)

A61K 49/12 (2006.01)

A61K 49/14 (2006.01)

A61K 49/16 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00902480 .3**

86 Fecha de presentación : **05.01.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1147111**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2001**

54 Título: **Criptatos y métodos para diagnóstico y tratamiento.**

30 Prioridad: **05.01.1999 AU PP8038/99**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **AUSTRALIAN NUCLEAR SCIENCE AND
TECHNOLOGY ORGANISATION**
New Illawarra Road
Lucas Heights, New South Wales 2234, AU
The Australian National University

72 Inventor/es: **Smith, Suzanne, Virginia;**
Harrowfield, John, M.;
Di Bartolo, Nadine, Marie y
Sargeson, Alan, Mcleod

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Criptatos y métodos para diagnóstico y tratamiento.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a criptatos útiles como quelantes. En particular, la presente invención se refiere a derivados funcionalizados de ciertos criptatos. Estos derivados funcionalizados son adecuados para usar en radio-

10 **Antecedentes de la invención**

Los compuestos radiomarcados son útiles como radiofármacos, agentes de imaginología o similares, que son especialmente útiles, pero no exclusivamente, para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades inclusive el cáncer.

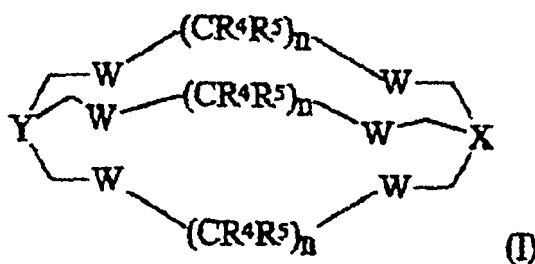
Jackson *et al* (*Nucl Med. Biol.* Vol. 18, N° 8 pp. 855-858, 1991) divulgan un complejo de cromo tipo jaula del ligando $(\text{NH}_2)_2\text{Sar}$ como un posible medio de contraste de IRM (Imaginología por Resonancia Magnética) para aplicaciones diagnósticas. También divulgan el complejo de ^{57}Co de $(\text{NH}_2)_2\text{Sar}$. WO 90/12050 divulga ligandos macrocíclicos, como DOTA, conjugados a moléculas que son el objetivo, y sus complejos metálicos, para usar en imaginología diagnóstica y radioterapia.

Los compuestos radiomarcados conocidos tienen la desventaja de que, cuando están en uso, el núclido radiomarcado puede separarse del compuesto portador causando problemas y posibles complicaciones en las aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Aún más, los radiofármacos conocidos tienden a ser inespecíficos en su biodistribución en todo el organismo de un sujeto.

La presente invención procura mejorar las desventajas mencionadas del estado anterior de la técnica proporcionando compuestos que sean capaces de ser radiomarcados más rápidamente, dirigidos específicamente a una determinada área de tejido o de un órgano en un sujeto y que sean más estables y menos tóxicos que los compuestos del estado anterior de la técnica. Aún más, los compuestos de la presente invención son característicamente adecuados para usar en formulaciones farmacéuticas. Otro objetivo típico de la presente invención es proporcionar un método de diagnóstico o tratamiento de una enfermedad en un sujeto.

35 **Resumen de la invención**

De conformidad con una primera realización de la presente invención, se provee de un compuesto que es capaz de ser radiomarcado de fórmula general (I):



50 en la cual n representa un número entero entre 2 y 4,

donde cada R^4 y R^5 se selecciona independientemente entre -H, CH_3 , COOH , NO_2 , CH_2OH , H_2PO_4 , HSO_3 , CN , $\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ y CHO ;

55 X e Y son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en C-R, N, P y C-Z en donde R se selecciona entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, nitroso, amino, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, ciano, $-\text{COOR}'$, COCOOR' , $\text{NH-CO-CH}_2\text{Br}$, $-\text{NH-CO-CH}=\text{CH-COOR}'$ en donde R' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, donde al menos uno de los grupos X e Y es C-Z;

60 W se selecciona del grupo que consiste en NH, S y O; y

Z es un grupo funcionalizado capaz de unir dicho compuesto de fórmula (I) a una unidad de reconocimiento mo-

65 lecular, seleccionada entre , , $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{Ar}-\text{NH}_2$ y $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{Ar}-\text{NCS}$,

donde p es un número entero entre 1 y 4 y Ar es fenilo opcionalmente sustituido;

donde dichos sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en amino, halógeno, hidroxilo, mercapto, nitro, ciano, tiociano, alquilo, alcoxi, halogenoalquilo, acilo, acilamino, aciloxi, carboxilo, alcóxicarboxilo, carbamoilo, piridilamino, carboxialquilcarbamoilo, N-carboxialquilcarbamoilo, sulfo, sulfamoilo, sulfamoilo mono o dialquilado o sulfamoilo fenilado que tenga opcionalmente uno o más sustituyentes alquilo, alquilsulfonilo, alcóxisulfonilo, fenilsulfonilo que opcionalmente contenga hidroxilo o fenoxisulfonilo;

o una sal de éstos farmacéuticamente aceptable.

Se comprenderá que en toda esta especificación, el término “unidad de reconocimiento molecular” incluye un anticuerpo, una proteína, un péptido, un carbohidrato, un ácido nucleico, un oligonucleótido, un oligosacárido, un liposoma u otra molécula que pueda formar parte de un par de enlace específico.

Típicamente en un compuesto de fórmula (I), cada R^4 y R^5 es H; W es NH; y n es entre 2 y 4, más típicamente 2 ó 3, aún más típicamente 2.

Según se usa aquí, el término “arilo” hace referencia a residuos únicos, polinucleares, conjugados y fusionados de hidrocarburos aromáticos o sistemas heterocíclicos aromáticos. Algunos ejemplos de dichos grupos son fenilo, bifenilo, terfenilo, cuaterfenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, antraceno, dihidroantraceno, benzantraceno, dibenzantraceno, fenantraceno, fluoreno, pireno, indeno, azuleno, criseno, piridilo, 4-fenilpiridilo, 3-fenilpiridilo, tienilo, furilo, pirilo, indolilo, piridazinilo, pirazolilo, tiazolilo, pirimidinilo, quinolilo, isoquinolilo, benzofuranilo, benzotienilo, purinilo, quinazolinilo, fenazinilo, acridinilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, heteroarilo, piridina y Het-CH=CH₂- y similares. Típicamente el arilo es fenilo, piridilo, naftilo, antraceno o similares, y el heteroarilo es típicamente piridina y Het-CH=CH₂. Aún más típicamente, el arilo es fenilo.

Según se usa aquí, el término “aralquilo” se refiere a grupos alquilo sustituidos con uno o más grupos arilo según se definieron previamente. Algunos ejemplos de dichos grupos son bencilo, 2-feniletilo y 1-feniletilo.

Según se usa aquí, el término “opcionalmente sustituido” significa que la porción descrita como opcionalmente sustituida puede llevar uno o más sustituyentes seleccionados entre amino, halógeno, hidroxilo, mercapto, nitro, ciano, tiociano, alquilo, alcoxi, halogenoalquilo, acilo, acilamino, aciloxi, carboxilo, alcóxicarboxilo, carbamoilo, piridilamino, carboxialquilcarbamoilo, N-carboxialquilcarbamoilo, sulfo, sulfamoilo, sulfamoilo mono o dialquilado o sulfamoilo fenilado que puede tener uno o más sustituyentes alquilo, alquilsulfonilo, alcóxisulfonilo, fenilsulfonilo que contenga opcionalmente hidrógeno o fenoxisulfonilo.

De conformidad con una segunda realización de la presente invención, también se provee de un compuesto de fórmula (I) según se describe en la primera realización de la presente invención que es acompañado con un ion metálico.

El ion metálico se selecciona típicamente entre ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ^{99m}Tc, Ga, In, Co, Re, Fe, Au, Ag, Rh, Pt, Bi, Cr, W, Ni, V, Pb, Ir, Zn, Cd, Mn, Ru, Pd, Hg, Ti y el grupo de elementos lantánidos de la tabla periódica como Sm, Ho, Gd, Tb, Sc, Y, y los actínidos.

El ion metálico es además típicamente un radionúclido seleccionado del grupo que consiste en ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ^{99m}Tc, y los radionúclidos de In(III), Ga(III), Fe(III), Cu(II), Ti(IV) y otros radionúclidos de los lantánidos, Re, Sm, Ho e Y.

De conformidad con una tercera realización de la presente invención, también se provee de una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según se describe en la primera realización de la presente invención o un complejo metálico, un complejo radiomarcado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

De conformidad con una cuarta realización de la presente invención, también se provee de una formulación diagnóstica que comprende un compuesto de fórmula (I) según se describe en la primera realización de la presente invención o un complejo metálico, un complejo radiomarcado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste y un reductor, en un portador farmacéuticamente aceptable.

De conformidad con una quinta realización de la presente invención, también se provee del uso de un compuesto de fórmula (I) o de un complejo metálico, un complejo radiomarcado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste en la preparación de un medicamento para el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad en un sujeto.

De conformidad con una sexta realización de la presente invención, también se provee de un compuesto de fórmula (I) según se describe en la primera realización de la presente invención o un complejo metálico, un complejo radiomarcado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste cuando se usa en el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad en un sujeto.

De conformidad con una séptima realización de la presente invención, también se provee de un compuesto conjugado que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según se describe en la primera realización de la presente

invención o un complejo metálico, un complejo radiomarcado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste unido al menos a una unidad de reconocimiento molecular que puede ser un anticuerpo, una proteína, un péptido, un carbohidrato, un oligonucleótido, un oligosacárido, un liposoma o similares.

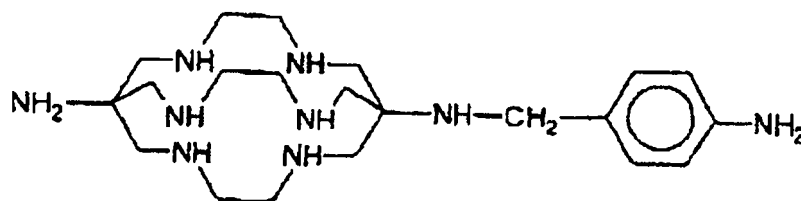
De conformidad con una octava materialización de la presente invención, se provee del uso de un compuesto conjugado según se describe en la séptima realización de la presente invención en la preparación de un medicamento para el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad en un sujeto.

De conformidad con una novena realización de la presente invención, se provee de un compuesto conjugado según se describe en la séptima realización de la presente invención cuando se usa en el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad en un sujeto.

De conformidad con una décima realización de la presente invención, se provee del uso de un compuesto de fórmula (I) o un complejo metálico, un complejo radiomarcado, un compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste en la preparación de un medicamento para imaginología en un sujeto.

De conformidad con una undécima realización de la presente invención, se provee de un compuesto de fórmula (I) o un complejo metálico, un complejo radiomarcado, un compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste cuando se usa en imaginología en un sujeto.

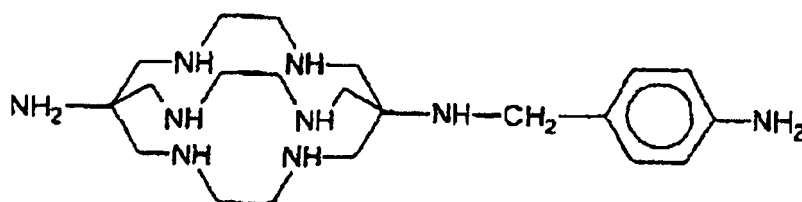
De conformidad con una decimosegunda realización de la presente invención, se provee de un compuesto de fórmula (I) con la siguiente estructura:



Descripción detallada de la invención

Los compuestos de fórmula (I) comprenden los compuestos donde n representa un número entero entre 2 y 4, más típicamente 2 ó 3 y aún más típicamente 2. Al menos uno de los grupos X e Y es un grupo C-Z donde Z es según se definió previamente y p es entre 1 y 4, más típicamente entre 1 y 2 y aún más típicamente 1. Generalmente, uno de los grupos X es un grupo C-Z y el otro es un grupo C-R, donde R es según se definió previamente.

Un ejemplo de un compuesto de fórmula (I) es:



El grupo Z en un compuesto de fórmula (I) puede proporcionar un punto de unión de un compuesto de fórmula (I) a una unidad de reconocimiento molecular.

La unidad de reconocimiento molecular es típicamente un anticuerpo, una proteína, un péptido, un oligonucleótido o un oligosacárido. En particular, la unidad de reconocimiento molecular es típicamente un anticuerpo y más típicamente un anticuerpo monoclonal.

Por lo tanto, los compuestos de fórmula (I) proporcionan un método de unión de iones metálicos radionúclidos como In (III), Ga(III), Fe(III), Tc(IV) o Tc(V), Re(VII), Cu(II), Ti(IV), otros radionúclidos de los lantánidos, Renio, Samario, Holmio, Itrio y similares, a unidades de reconocimiento molecular como anticuerpos monoclonales, proteínas específicas de receptores, péptidos u oligonucleótidos, para imaginología y tratamiento *in vivo*.

Los compuestos de fórmula general (I) se preparan de manera característica por unión de un grupo funcional de enlace a un criptato adecuado. Los métodos de síntesis de criptatos útiles como precursores de los compuestos de fórmula (I) en los que W es NH se describen en la Patente de los Estados Unidos N° 4,497,737 a nombre de Sargeson *et al*, cuya divulgación se incorpora aquí para referencia. Otros criptatos donde W es S u O se pueden preparar por métodos análogos. Sargeson *et al* describen la síntesis de criptatos metálicos tipo jaula mediante la condensación de

un complejo tris-(diamina) ion metálico según se describe en la columna 3 líneas 30 a 35 con formaldehído y un nucleófilo adecuado. Para obtener los compuestos de fórmula (I), se selecciona un nucleófilo apropiado de modo de obtener el grupo de enlace funcionalizado Z deseado según se define en la fórmula (I). En particular, se hace referencia a la columna 4 líneas 17 a 27 de la Patente de los Estados Unidos N° 4,497,737. Alternativamente, se puede unir un grupo de enlace funcionalizado Z a un grupo funcional de un criptato preparado por los métodos enseñados por Sargeson *et al* (por ejemplo consulte Ejemplo 9 de la columna 9 línea 65 a la columna 12 línea 10 de Sargeson *et al*) mediante técnicas de síntesis corrientes. Si es necesario, se puede introducir un grupo protector dentro de la estructura del criptato para proteger la funcionalidad latente del grupo de enlace funcionalizado Z deseado según se define en la fórmula (I) durante la síntesis del precursor del criptato deseado. Se describen grupos protectores adecuados, por ejemplo en Greene, T.W., *Protective Groups in Organic Synthesis* (John Wiley & Sons, New York, 1981) y McOmie, J.F.W., *Protective Groups in Organic Chemistry* (Plenum Press, London, 1973).

Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) donde dicho grupo Z comprende un grupo amino mono o disustituido y donde el sustituyente es alquilo opcionalmente sustituido, se preparan fácilmente tratando el compuesto amino con el alquilo halosustituido adecuado. De manera característica, el compuesto de fórmula (I) donde Z es $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ se puede preparar tratando un compuesto de fórmula (I) donde R es NH_2 con $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ en presencia de NaHCO_3 o similar con protección adecuada.

Se pueden preparar compuestos de fórmula (I) donde R^1 es -NCS haciendo reaccionar el compuesto amino con tiofosgeno (consulte WO87/12631), Kozak *et al.*, Cancer Res. 49, 2639 (1989). Los compuestos de haluro de ácido sustituidos se producen haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (I) donde R es NH_2 con BrCH_2COBr a 4°C de acuerdo con el procedimiento de C J Mathias *et al.*, Bioconjugate Chem., 1, 204 (1990). Los compuestos con una porción electrófila también se pueden preparar por métodos conocidos en el ambiente, como los de ACC Chem. Res. 17, 202-209 (1984). Se pueden formar compuestos con ésteres activos $(\text{CH}_2)_p\text{-C(O)-X}$ mediante los procedimientos de Bodanszky M, *The Peptide Analysis Synthesis Biology*, Ed. E. Gross y J Meienhofer, Vol 1. pp 105-196, Academic Press, Inc., Orlando, FL. (1979) y Bodanszky M, *Principles of Peptide Synthesis*, pp 9-58, Springer-Verlag, New York, (1984). Se pueden preparar otros compuestos de fórmula (I) a partir de dichos compuestos mediante procedimientos corrientes como los descritos en Modern Synthetic Reactions, H O House, 2^{da} edición, Benjamin, Inc. Filipinas, 1972.

En una realización típica, se pueden preparar compuestos de fórmula (I) en los cuales X o Y es C-Z, donde el grupo Z es un grupo $\text{NH}(\text{CH}_2)_p\text{R}^1$ o $\text{NH}(\text{CH}_2)_p\text{ArR}^1$ mediante una reacción de condensación de base de Schiff de un compuesto de fórmula (I) (o un complejo metálico de éste) en el cual X o Y es NH_2 con un aldehído de fórmula $\text{HC(O)(CH}_2)_p\text{R}^1$ o $\text{HC(O)(CH}_2)_p\text{ArR}^1$. (Más típicamente, la reacción de condensación de base de Schiff se lleva a cabo de manera más apropiada entre un complejo de cobre de los compuestos de fórmula (I) en los cuales X o Y es NH_2 con un aldehído de fórmula $\text{HC(O)(CH}_2)_p\text{R}^1$ o $\text{HC(O)(CH}_2)_p\text{ArR}^1$). En una forma particular de esta realización, se obtiene un compuesto de fórmula (I) mediante la reacción de nitrobenzaldehído con el complejo de cobre de un aminocriptato como el descrito por Sargeson *et al*. La reacción se lleva a cabo típicamente en atmósfera de gas inerte y en presencia de solvente y diluyentes característicamente inertes para los reactivos. Los solventes adecuados comprenden hidrocarburos alifáticos, aromáticos o halogenados como benceno, tolueno, xilenos; clorobenceno, cloroformo, cloruro de metileno, cloruro de etileno; éteres y compuestos etéreos como dialquiléter, etilenglicol mono o dialquiléter, THF, dioxano; alcoholes como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol; cetonas como acetona, metiletilcetona; nitrilos como acetonitrilo o 2-metoxipropionitrilo; amidas N,N-dialquiladas como dimetilformamida; dimetilsulfóxido, tetrametilurea; así como las mezclas de estos solventes entre sí. Si la amina o una sal de ésta es soluble en agua, entonces el medio de reacción puede ser agua a baja temperatura. Los compuestos de fórmula (I) se pueden convertir en sales farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos conocidos.

De manera característica, para uso médico, las sales de los compuestos de la presente invención serán sales farmacéuticamente aceptables; aunque se pueden usar otras sales en la preparación del compuesto de la invención o de la sal farmacéuticamente aceptable de éste. Por sal farmacéuticamente aceptable se quiere dar a entender las sales que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica ni similares excesivas y que están de acuerdo con una relación riesgo/beneficio razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en el ambiente.

Se pueden preparar sales adecuadas, farmacéuticamente aceptables, de los compuestos de la presente invención mezclándolos con un ácido farmacéuticamente aceptable como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido metansulfónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido oxálico, ácido carbónico, ácido tartárico o ácido cítrico. Por consiguiente las sales adecuadas, farmacéuticamente aceptables, de los compuestos de la presente invención incluyen sales de adición de ácido.

Por ejemplo, S. M. Berge *et al* describen detalladamente sales farmacéuticamente aceptables en *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66:1-19. Las sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos de la invención, o por separado haciendo reaccionar la función base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencensulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canfersulfonato, citrato, ciclopentanpropionato, digluconato, dodecilsulfato, etansulfonato, fumarato, glucoheptanato, glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, bromhidrato, clorhidrato, yodohidrato, 2-hidroxi-etansulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metansulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluensulfo-

nato, undecanoato, valerato, sales y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como cationes amonio, amonio cuaternario y amina atóxicos, incluidos pero no exclusivamente, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares.

5

El radiomarcado de los compuestos de fórmula (I) y sus sales se puede realizar usando procedimientos conocidos en el ambiente. Por ejemplo, el radiomarcado del quelante con ^{67}Cu se puede lograr agregando cobre en una solución acuosa de acetato a un compuesto de fórmula (I) en una solución acuosa e incubando a temperatura ambiente.

10 Alternativamente, el radiomarcado de un compuesto de fórmula (I) con tecnecio, por ejemplo, se puede lograr agregando un reductor como las sales estannosas, generalmente cloruro estannoso, a una solución acuosa de un compuesto de fórmula (I), seguido de reacción con solución acuosa de pertecnetato de sodio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$). Se cree que el orden de mezclado de estos tres componentes no es crítico. Sin embargo, típicamente el reductor se agrega al quelante de fórmula (I). Otros reductores adecuados comprenden ditionitos de metales alcalinos como ditionito de sodio, boro-

15 hidruro de sodio, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, otros ditionitos solubles como ditionito de potasio o ditionito de amonio, un bisulfito o metabisulfito soluble como bisulfito de sodio, bisulfito de potasio, bisulfito de litio, bisulfito de amonio, metabisulfito de sodio, metabisulfito de potasio, metabisulfito de litio o metabisulfito de amonio o una solución acuosa de dióxido de azufre.

20 Se puede obtener fácilmente Tecnecio-99m en forma de una solución acuosa de pertecnetato de sodio de generadores comerciales de molibdeno-99/tecnecio-99m o alternativamente, se puede usar $^{99\text{m}}\text{Tc}$ instantáneo. Cu-64 se puede comprar a Australian Nuclear Science & Technology Organisation y el ^{67}Cu se puede obtener del Departamento de Energía de los EE.UU. Brookhaven, EE.UU.

25 Los compuestos conjugados de la séptima realización de esta invención se pueden formar mediante la reacción de un complejo metálico radiomarcado de un compuesto de fórmula (I) junto con una unidad de reconocimiento molecular. Los radionúclidos útiles para formar complejos con los compuestos de fórmula (I) comprenden típicamente iones metálicos con al menos dos estados de oxidación, muy típicamente un estado de oxidación de +2 o +3. En una materialización típica, el complejo radiomarcado metálico se selecciona entre ^{64}Cu , ^{67}Cu y $^{99\text{m}}\text{Tc}$, Sm, Ho, Re, Sc, Cu,

30 Pd, Rh, e Y. Los iones metálicos más típicos comprenden ^{64}Cu , ^{67}Cu y $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Estos complejos metálicos radiomarcados se hacen reaccionar después con una unidad de reconocimiento molecular. La unidad de reconocimiento molecular radiomarcada formada de este modo es útil para aplicaciones de diagnóstico, terapéuticas y de radioimagenología.

35

Alternativamente se puede preparar primero un conjugado de un compuesto de fórmula (I) y después radiomarcarlo.

Por lo tanto, el radiomarcado de las unidades de reconocimiento molecular como materiales proteicos usando

40 compuestos de fórmula (I) se puede conducir de dos maneras, a saber:

(a) premarcando un compuesto de fórmula (I) con un radionúclido adecuado, seguido de la conjugación del compuesto radiocomplejado resultante con el material proteico u otro material

45 o

(b) conjugando el compuesto de fórmula (I) con el material proteico u otro material para su posterior radiomarcado.

La formación de un compuesto conjugado de fórmula (I) se logra generalmente mediante la reacción del grupo de enlace funcionalizado con un grupo tiol, amino, carboxilo, hidroxilo, aldehído, aromático o heteroaromático presente en la unidad de reconocimiento molecular. Por ejemplo, un grupo amino o hidroxilo del grupo de enlace funcionalizado se puede hacer reaccionar con un grupo carboxilo libre de la unidad de reconocimiento molecular, o viceversa. De manera adecuada se puede emplear un agente de acoplamiento como una carbodiimida para facilitar la reacción de acoplamiento.

55

Los compuestos conjugados de acuerdo con la séptima realización de la presente invención pueden contener más de una molécula de un compuesto de fórmula (I) para cualquier unidad de reconocimiento molecular. La formación de complejos metálicos y el radiomarcado de los compuestos de fórmula (I) y de sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden realizar usando procedimientos conocidos en el ambiente. Por ejemplo, el radiomarcado de los compuestos conjugados con ^{64}Cu se puede lograr agregando una solución acuosa de acetato de ^{64}Cu al compuesto conjugado en una solución acuosa e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. También se puede proporcionar a los radioquímicos, técnicos, radiofarmacéuticos, médicos o similares una preparación que comprenda un conjugado sin completar de acuerdo con la invención en forma de un juego de reactivos para radiomarcado inmediatamente antes del uso.

60

En una forma típica de esta invención, el juego de reactivos comprende un primer envase que contiene un ion metálico de radiomarcado, generalmente en solución y un segundo envase que contiene un compuesto conjugado según se describe en la octava realización de la presente invención. El uso del juego de reactivos implica después la mezcla de los contenidos de dichos primero y segundo envases para obtener el compuesto conjugado radiomarcado.

65

Típicamente, los compuestos de fórmula (I) o el complejo metálico, el complejo radiomarcado o la sal farmacéuticamente aceptable de éste son útiles para marcar unidades de reconocimiento molecular que se van a usar en métodos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades. En particular, las unidades de reconocimiento molecular radiomarcadas típicas, son anticuerpos monoclonales y fragmentos de éstos; péptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos o liposomas o una parte de un par de enlace específico.

Las aplicaciones de las unidades de reconocimiento molecular radiomarcadas comprenden el diagnóstico, la imagenología y el tratamiento de enfermedades como el cáncer. Típicamente, los compuestos de fórmula (I) y sus complejos metálicos y/o sales tienen un uso diagnóstico como agentes de imagenología *in vitro* e *in vivo*. El método de diagnóstico que usa los agentes de imagenología precitados resultará de la localización de los compuestos conjugados radiomarcados en órganos y tejidos específicos en un sujeto.

El método de diagnóstico incluirá de manera característica, primero la administración de una cantidad eficaz de un compuesto radiomarcado de fórmula (I) a un sujeto; y luego el control del sujeto después de un período adecuado para evaluar la presencia o ausencia por ejemplo de un cáncer como se evidenciaría por la localización del radiomarcador en un sitio particular en el sujeto. De manera característica, el paso de control proporcionará información con respecto a la ubicación de cualquier cáncer si estuviera presente. La cantidad o dosis eficaz del compuesto radiomarcado de fórmula (I) dependerá de la cantidad de radiactividad deseada necesaria para la aplicación diagnóstica en equilibrio con el requisito de seguridad de no exposición del sujeto, en particular de sus órganos y tejidos, a cantidades perjudiciales de radiación. Las dosis apropiadas para cualquier aplicación pueden ser determinadas por las personas especializadas en la materia basándose sólo en su experiencia de rutina, según lo que aquí se instruye.

El método de tratamiento incluirá típicamente compuestos de fórmula (I) o los complejos metálicos, los complejos radiomarcados y/o las sales farmacéuticamente aceptables de éstos que sean útiles como agentes citotóxicos. En una realización típica, la terapia de la enfermedad comprende el tratamiento del cáncer, de los trastornos por células anómalas y el tratamiento de los tumores. En dichas aplicaciones, el compuesto radiomarcado de fórmula (I) se conjuga típicamente con una unidad de reconocimiento molecular que es capaz de unirse específicamente al tumor o la célula anómala. Ejemplos de dichas unidades de reconocimiento molecular comprenden una parte de los pares de enlace específicos que son conocidos por los expertos en la materia y comprenden típicamente pares antígeno/anticuerpo y similares.

El método de tratamiento incluirá típicamente la administración de una cantidad eficaz de un compuesto radiomarcado de fórmula (I) a un sujeto. La cantidad o dosis eficaz dependerá de la cantidad deseada de radiactividad necesaria para la aplicación diagnóstica en equilibrio con el requisito de seguridad de no exposición del sujeto, en particular de sus órganos y tejidos, a cantidades perjudiciales de radiación. Las dosis apropiadas para cualquier aplicación pueden ser determinadas por las personas especializadas en la materia basándose sólo con su experiencia de rutina, según lo que aquí se instruye.

Típicamente el tratamiento durará lo que durara la enfermedad y los tiempos de contacto tendrían la duración de la enfermedad.

Además, será obvio para cualquier experto en la materia que la cantidad óptima y el espaciamiento entre dosis individuales de un compuesto de la presente invención serán determinados por la naturaleza y la entidad de la enfermedad en tratamiento, la forma, la vía y el sitio de administración, y la naturaleza del vertebrado en particular que se esté tratando. Además, esas condiciones óptimas pueden ser determinadas por las técnicas convencionales.

Asimismo será obvio para una persona con la capacitación corriente en la materia que el ciclo óptimo de tratamiento, tal como, la cantidad de dosis del compuesto de la presente invención que se administre por día durante un número definido de días, puede ser evaluado por dichas personas usando las pruebas convencionales para la determinación del ciclo de un tratamiento.

También están incluidos dentro del alcance de la presente invención los profármacos del compuesto de la invención. De manera característica, los profármacos serán derivados funcionales de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la primera realización de la invención, los cuales se convierten fácilmente *in vivo* en el compuesto necesario para usar en la presente invención según se describe aquí. Los procedimientos típicos para la selección y la preparación de los profármacos son conocidos por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en H. Bundgaard (Ed), *Design of Prodrugs*, Elsevier, 1985.

Cuando el compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la primera realización de la invención o un complejo metálico un complejo radiomarcado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste se usan en el tratamiento de una enfermedad se pueden administrar solos. Sin embargo, en general es preferible que estos compuestos sean administrados conjuntamente con otros tratamientos quimioterápicos administrados convencionalmente a los pacientes para tratar enfermedades. Por ejemplo, un tumor se puede tratar convencionalmente con cirugía y el compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la primera realización de la invención o un complejo metálico, un complejo radiomarcado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para prolongar la latencia de micrometástasis y para estabilizar e inhibir el crecimiento de cualquier tumor primario residual.

Típicamente, cuando se usan en el tratamiento de tumores sólidos, los compuestos de la presente invención se pueden administrar con agentes quimioterápicos como: adriamicina, taxol, fluorouracilo, melfalán, cisplatino, alfa interferón, COMP (ciclofosfamida, vincristina, metotrexato y prednisona), etopósido mBACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y dexametasona), PROMACE/MOPP (prednisona, metotrexato (profilaxis anticitotóxica con leucovorina)) doxorubicina, ciclofosfamida, taxol, etopósido/mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona, vincristina, vinblastina, angiinhibidores, TNP-470, polisulfato de pentosán, factor plaquetario 4, angiostatina, LM-609, SU-101, CM-101, Techgalan, talidomida, SP-PG y similares. Otros quimioterápicos incluyen agentes alquilantes como mostazas de nitrógeno incluidos mecloretamina, melfan, clorambucilo, ciclofosfamida e ifosfamida; nitrosoureas incluidas carmustina, lomustina, semustina y estreptozocina; alquilsulfonatos incluido busulfán; triazinas incluida dacarbazina; etileniminas incluidas tiotepa y hexametilmelamina; análogos del ácido fólico incluido metotrexato; análogos de la pirimidina incluido 5-fluorouracilo, arabinósido de citocina; análogos de la purina incluidas 6-mercaptopurina y 6-tioguanina; antibióticos antitumorales incluida actinomicina D; las antraciclinas incluidas doxorubicina, bleomicina, mitomicina C y metramicina; hormonas y antagonistas de hormonas incluidos tamoxifeno y corticoesteroides y agentes misceláneos incluidos cisplatino y brequinar.

Cuando el compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la primera realización de la invención o un complejo metálico, un complejo radiomarcado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste se usan en el tratamiento de una enfermedad se pueden administrar solos. Sin embargo, en general es preferible que sean administrados como formulaciones farmacéuticas. En general las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por las personas con la capacitación corriente en la materia y consiguientemente pueden incluir un portador, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables.

Estas formulaciones se pueden administrar por las vías corrientes. En general, las combinaciones se pueden administrar por vía tópica, transdérmica, intraperitoneal, intracraneal, intracerebroventricular, intracerebral, intravaginal, intrauterina, oral, rectal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular). Además, el compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la primera realización de la invención o un complejo metálico, un complejo radiomarcado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, se pueden incorporar en polímeros biodegradables que permitan la liberación sostenida, los cuales se implantan en la proximidad del lugar donde se desea la liberación del fármaco, por ejemplo, en el sitio de un tumor o se implantan de modo que los agentes activos se liberen sistémicamente con lentitud. También se pueden usar minibombas osmóticas para proporcionar a través de cánulas una liberación controlada de altas concentraciones de los principios activos en el sitio de interés como, por ejemplo, directamente en un desarrollo metastásico o en el suministro vascular a ese tumor.

Los portadores, diluyentes y adyuvantes deben ser "aceptables" en términos de compatibilidad con los otros ingredientes de la formulación y ausencia de nocividad para el receptor.

Algunos ejemplos de portadores o diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico y veterinario son agua desmineralizada o destilada; solución salina; aceites vegetales como aceite de maní, aceite de alazor, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceites de sésamo como aceite de maní, aceite de alazor, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de arachis o aceite de coco; aceites de silicona, incluidos polisiloxanos, como metilpolisiloxano, fenilpolisiloxano y metilfenilpolisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales como parafina líquida, parafina blanda o escualeno; derivados de celulosa como metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica o hidroxipropilmetilcelulosa; alcoholes inferiores, por ejemplo etanol o isopropanol; arilalcanoles inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina; ésteres de ácidos grasos como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polivinilpirrolidona; agar; carragenina; goma tragacanto o goma de acacia y vaselina. Típicamente, el portador o portadores constituirán de 10% a 99,9% en peso de las preparaciones.

Para la administración como una solución o suspensión inyectable, los portadores o diluyentes atóxicos parenteralmente aceptables pueden incluir, solución de Ringer, solución salina isotónica, solución salina amortiguada con fosfato, etanol y 1,2 propilenglicol.

Los adyuvantes incluyen típicamente, emolientes, emulsionantes, espesantes, conservantes, bactericidas y amortiguadores del pH.

Los métodos para la elaboración de preparaciones que sean parenteralmente administrables son evidentes para los expertos en la materia y se describen más detalladamente, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 15ava ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., que se incorpora aquí para referencia.

Las unidades de reconocimiento molecular radiomarcadas especialmente los anticuerpos radiomarcados son particularmente útiles en medicina, por ejemplo, en la localización de tipos de tejidos específicos y en el tratamiento de trastornos celulares. Los anticuerpos radiomarcados también se pueden usar para dirigir iones metálicos a un tipo de tejido específico, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Un uso típico de los compuestos radiomarcados de fórmula (I) es el radiomarcado de anticuerpos monoclonales específicos para cáncer de colon, de ovario, linfoma, de mama y/o de vejiga, con radionúclidos emisores beta de metales como Sm, Ho, Re, Sc, Cu, Pd, Pb, Rh e Y para el tratamiento del cáncer mencionado precedentemente. Otro

uso típico es en el radiomarcado de un anticuerpo monoclonal específico para metástasis del cáncer de colon con fines diagnósticos y de tratamiento.

En otra realización típica, el anticuerpo en el compuesto conjugado puede ser una molécula de anticuerpo completa o un fragmento de éste o un análogo de cualquiera de éstos, siempre que el anticuerpo comprenda una región de unión específica. Puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado o un fragmento de éste. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo recombinante. El anticuerpo puede ser específico para cualquier cantidad de determinantes antigénicos, pero en general es específico para un determinante antigénico.

En otra realización típica, se provee del radiomarcado de anticuerpos monoclonales con ^{67}Cu (emisor beta y gamma) y ^{64}Cu (emisor de positrones y beta), para radioinmunogammagrafía combinada (RIS) (SPECT (tomografía computada con emisión de fotón único y TEP tomografía por emisión de positrones) y radioinmunoterapia (RIT). Otros radionúclidos comprenden emisores Auger donde el compuesto de fórmula (I) se acopla al anticuerpo monoclonal y se marcan con isótopos que emiten auger como Fe-59 o Cu-64.

Aún en otra realización típica, se provee de una radioinmunoterapia predirigida en dos pasos en la que se inyecta en un sujeto un anticuerpo monoclonal con una primera molécula del marcador unida a él. Una vez que el anticuerpo dejó el sistema y se localizó en el tumor, se administra una segunda inyección al sujeto. Esta segunda inyección incluye típicamente el complejo radiomarcado de fórmula (I) unido a una segunda molécula del marcador que reconoce a la primera molécula del marcador en el anticuerpo dirigido. Alternativamente, la segunda inyección puede ser la segunda molécula del marcador sola y una vez que dejó el sistema, se administra al sujeto el complejo radiomarcado de fórmula (I) unido a la primera molécula del marcador. Ambos procedimientos producen amplificación del sitio que es el objetivo y reducen la exposición del complejo radiomarcado al tejido normal. Más típicamente, la primera molécula del marcador es biotina y la segunda molécula del marcador es avidina o estreptavidina. Aún más típicamente, la primera molécula del marcador es más pequeña que el anticuerpo dirigido.

La invención también proporciona un procedimiento en dos pasos que incluye la administración de un conjugado anticuerpo-ADN o anticuerpo-oligonucleótido seguida del marcado dirigido con un ADN complementario u oligonucleótido complementario radiomarcados. Este procedimiento también proporciona amplificación del sitio que es el objetivo y reduce la exposición del complejo radiomarcado al tejido normal.

La invención también proporciona un uso de los compuestos de fórmula (I) o los complejos metálicos, los complejos radiomarcados, los compuestos conjugados o las sales farmacéuticamente aceptables de éstos como agentes de Imaginología por Resonancia Magnética (IRM). En esta forma de la invención; se forma de manera típica un complejo del compuesto de fórmula (I) o un conjugado de la séptima realización, con un ion metálico paramagnético, en general Fe (III), Mn(II). que puede usarse como un agente de contraste para mejorar imágenes. Además, este tipo de complejos se puede emplear en forma de una formulación farmacéutica donde el complejo esté presente con un portador, excipiente o vehículo de ésta farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones farmacéuticas descritas para las diferentes realizaciones de esta invención comprenden típicamente una formulación en forma de una suspensión, solución u otra formulación adecuada. Se puede usar un medio de suspensión fisiológicamente aceptable con o sin adyuvantes. Más típicamente, las formulaciones farmacéuticas están en una forma farmacéutica líquida y todavía más típicamente en una forma inyectable. Aún más típicamente, las formulaciones inyectables se disuelven en portadores adecuados fisiológicamente aceptables conocidos en el ambiente.

El uso industrial de los compuestos de fórmula (I) comprende además su unión a superficies sólidas como polímeros para usar en la concentración de iones metálicos y purificación del agua, o su unión a la superficie de un electrodo para la detección de iones metálicos específicos.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se ilustrará más a fondo, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas; en donde:

Las figuras 1a y 1b son representaciones gráficas de la estabilidad sérica del complejo de ^{67}Cu del compuesto (4) a los días 0 y 7 respectivamente;

La figura 2 es una representación gráfica del efecto del pH en la complejación del ^{64}Cu con el compuesto (3);

La figura 3 es una representación gráfica de la biodistribución de un complejo de ^{64}Cu del compuesto (4);

La figura 4 es una representación gráfica de la biodistribución de un complejo de ^{64}Cu del compuesto (1);

La figura 5 es una representación gráfica de la biodistribución de un complejo de ^{64}Cu del compuesto (3); y

La figura 6 es una representación gráfica de la biodistribución del compuesto conjugado de B72.3 marcado con ^{64}Cu conjugado con el compuesto (3) en ratones atímicos portadores de un tumor.

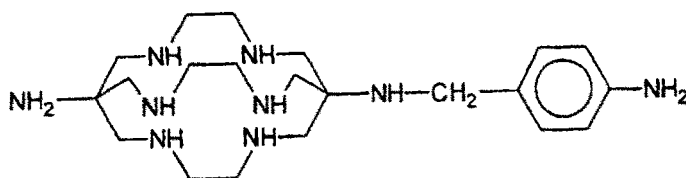
La figura 7 es una representación gráfica del efecto radioterapéutico de 30 MBq del compuesto conjugado de B72.3 marcado con ^{64}Cu conjugado con el compuesto (3) en ratones atímicos portadores de tumor.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes sirven sólo para ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitantes de la generalidad de la descripción anterior.

Ejemplo 1

Preparación del compuesto (3)

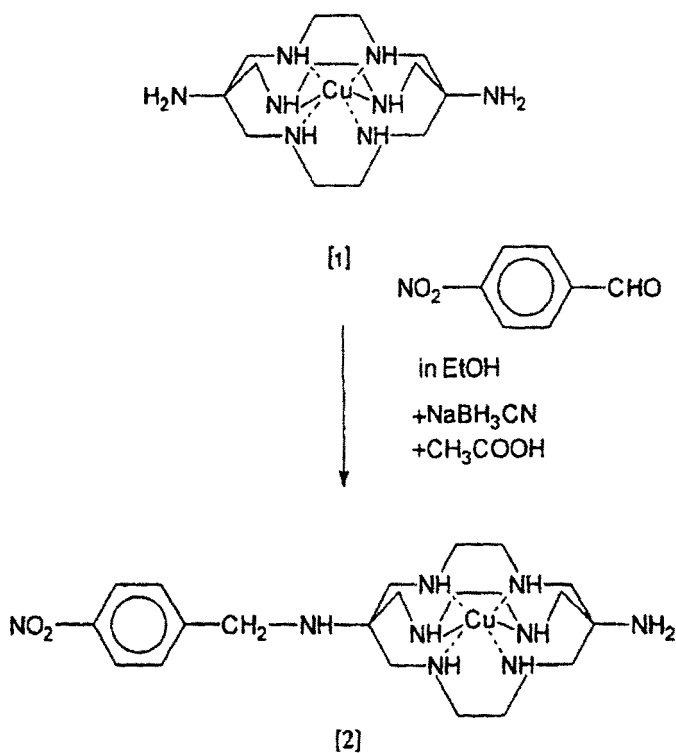


Compuesto (3)

La preparación del compuesto (3) se ilustra en los esquemas 1 y 2.

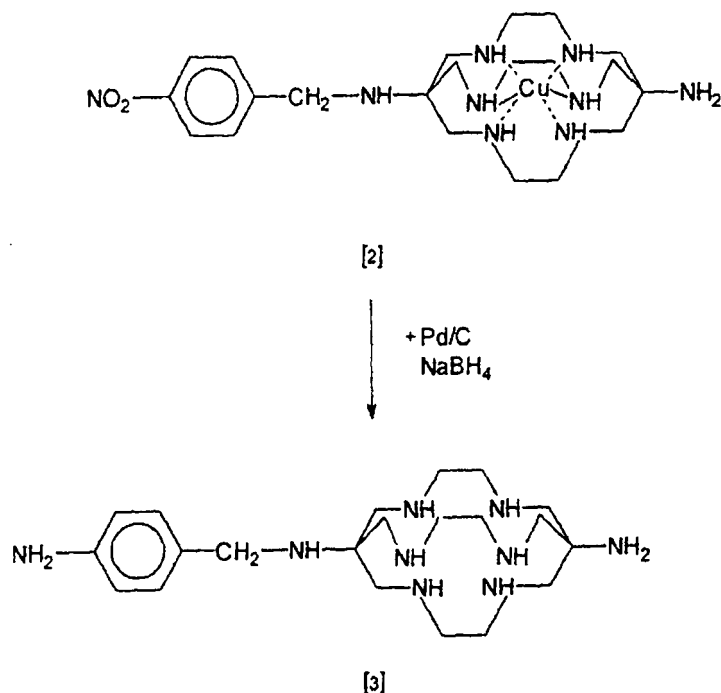
Esquema I

Reacción de condensación de base de Schiff del compuesto (1) con *p*-nitrobenzaldehído



Esquema 2

Reducción del compuesto (2) a compuesto (3)



A. Preparación del compuesto (2)

El compuesto (2) se prepara por reacción de base de Schiff del compuesto (1) con p-nitrobenzaldehído. La síntesis del compuesto (1) se describe en *Aust. J. Chem* (1994) 47, 143-179. Se disuelve un complejo de cobre del compuesto (1) en etanol seco (2,4 mmoles en 100 ml) y se agrega p-nitrobenzaldehído (2,2 mmoles). La mezcla de reacción se evapora hasta sequedad y se reconstituye (con etanol seco) dos veces para eliminar toda el agua. La mezcla de reacción se vuelve a reconstituir en etanol seco y se agita durante 30 min en atmósfera de nitrógeno. Se agregan cianoborohidruro de sodio (25 mmoles), ácido acético glacial (2 mmoles) y tamices moleculares de 3 Å activados y la reacción se deja en agitación durante toda la noche. La mezcla se filtra, se evapora hasta sequedad y se extrae con cloroformo y agua (100 ml:200 ml). La capa de agua se diluye a 2 L, se sorbe sobre SP Sephadex C25 y se eluye con acetato de sodio 0,3 M. (Esquema 1).

B. Preparación del compuesto (3)

Al catalizador de paladio/C (20 mg) en agua (0,5 ml) se le agrega borohidruro de sodio (50 mg) en agua (0,5 ml) en atmósfera de nitrógeno. Después a esta mezcla se le agrega compuesto (2) (30 mg) disuelto en hidróxido de sodio aproximadamente 0,1 M (0,5 ml). La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante otros 30 min o hasta que la solución se vuelva transparente. Se enfría un vial de vidrio de 2 ml en hielo. La mezcla se filtra a través de un filtro de 0,22 mm y se introduce en el vial enfriado para eliminar el catalizador de paladio/C en suspensión. A este filtrado enfriado se le agrega ácido clorhídrico concentrado gota a gota hasta que todo el borohidruro de sodio en exceso se enfríe (es decir hasta que cese el desprendimiento de gas al agregar ácido). La cantidad de producto se determina mediante titulación con una concentración conocida de ⁶⁴Cu según se describe en el Ejemplo 2. El producto se almacena congelado a pH < 1 en un vial con tapón de goma en atmósfera de nitrógeno. Rendimiento: > 95% (Esquema 2). El producto final se caracteriza por ¹H-NMR en D₂O a 298 K (Bruker Avance DPX 400). ¹H NMR 3,28 ppm, m, 6H, CH₂ (jaula); 3,39 ppm, m, 6H, CH₂ (jaula); 3,59 ppm, s, 6H, CH₂ (jaula); 3,71 ppm, s, 6H, CH₂ (jaula); 4,45 ppm, s, 2H, CH₂; 7,51 ppm, d, 2H, Ar; 7,70 ppm, d, 2H, Ar.

Ejemplo 2

Complejación del ⁶⁴Cu por el compuesto (3)

Se investigó el efecto del pH en la complejación del ⁶⁴Cu por el compuesto (3). El compuesto (3) se diluyó en soluciones amortiguadoras de pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 y 9,0. Se agregó una cantidad suficiente de ⁶⁴Cu y la tasa de complejación se controló a (t = 1; 2,5; 5; 10; 60 y 90 min) (consulte el método a continuación) por Cromatografía en Capa Fina Instantánea (ITLC-SG). La complejación completa (> 98%) se logró en el plazo de 1 min para todos los pH > 4,0. La tasa de complejación a pH 3,0 fue más lenta. (Figura 2).

Control de la complejación por ITLC-SG

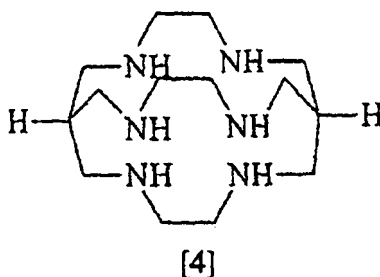
Se cargaron las tiras de ITLC-SG (10 cm X 0,8 cm) con ~ 1 mL de la mezcla de reacción a 1 cm de la parte inferior de la tira (origen) y se desarrollaron en un solvente que contenía acetato de sodio 0,1 M (pH 4,5):etanol 9:1. El complejo ^{64}Cu -compuesto (3) permanece en el origen ($R_f = 0,0$), y el ^{64}Cu "libre" aparece con el frente del solvente ($R_f = 1,0$).

Un método típico de radiomarcado del ligando se logra ajustando el pH de una solución acuosa del ligando a pH 5,0. Se agrega suficiente volumen de solución de $^{64/67}\text{Cu}$ (generalmente en HCl 0,02 M o diluido en solución amortiguadora de acetato de sodio 0,1 M de pH 5,0) como para formar un complejo 1:1. La eficacia del marcado se determina por ITLC-SG como se describió antes. Se observa una especie radioquímica principal.

Ejemplo 3

Estabilidad sérica del complejo de ^{67}Cu del compuesto (4)

Se llevaron a cabo estudios de estabilidad sérica incubando un complejo de ^{67}Cu de las especies relacionadas (4) en plasma humano a 37°C.



A diversos intervalos, el complejo se separó del plasma por cromatografía de exclusión por tamaño y se evaluó la ruptura del complejo. Los resultados indicaron que no más de 2% del cobre se pierde del quelante durante las primeras 174 horas en 37°C. (Figura 1a y 1b).

Ejemplo 4

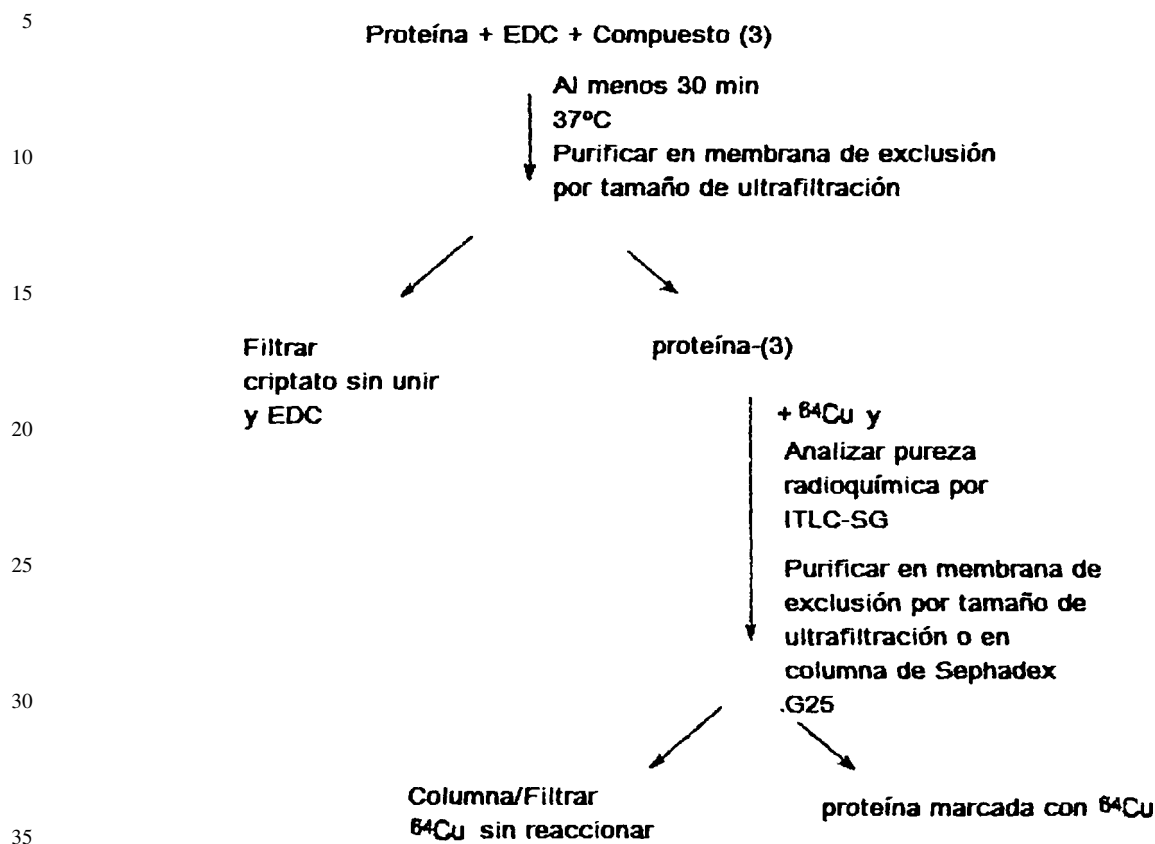
Síntesis de B72.3 conjugado con (3) usando 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (EDC)

Un método típico de radiomarcado de un anticuerpo (como B72.3) es incubar el anticuerpo con el ligando (como el compuesto (3)) en presencia de EDC a pH 5,0 durante 30 min a 37°C. El ligando y los subproductos de EDC sin reaccionar se eliminan mediante el lavado con solución amortiguadora (pH 5,0) en una membrana de exclusión por tamaño de ultrafiltración. El inmunoc conjugado purificado se expone a un ligero exceso de $^{64/67}\text{Cu}$. La reacción se deja proceder a temperatura ambiente, y el marcado se completa en menos de 5 min. El exceso de $^{64/67}\text{Cu}$ se elimina por lavado con EDTA en PBS 0,1 M (pH 7,2) en una membrana de exclusión por tamaño de ultrafiltración o mediante separación en una columna de exclusión por tamaño (Sephadex G25, eluido con PBS pH 7,2). (Esquema 3).

Se optimizaron las condiciones para el radiomarcado de B72.3 con respecto al tiempo de incubación (30 min), el pH de la reacción (5,0), la concentración de B72.3 (5 mg/ml) y la relación molar B72.3:EDC:ligando (1:1000:250).

Esquema 3

Síntesis de proteína conjugada con compuesto (3) usando EDC



Ejemplo 5

Biodistribución de los complejos Cu de (1), (3) y (4) en ratones Balb/C

Se evaluó la biodistribución de los complejos de ^{64}Cu de los compuestos (1), (3) y (4) (inyección intravenosa de 0,10 ml) en ratones balb/c (5 animales por cada tiempo correspondiente a la toma de datos) a intervalos de 3, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos. Los estudios de biodistribución se realizaron por duplicado. La biodistribución del radiomarcador se presenta en las tablas 1, 2 y 3, y se ilustra diagramáticamente en las figuras 3, 4 y 5.

Ejemplo 6

Evaluación del conjugado de B72.3 marcado con ^{64}Cu con el compuesto (3) en ratones atímicos portadores de un tumor

El anticuerpo B72.3 reconoce al antígeno TAG-72 que se expresa en tumores colorrectales y ováricos. El modelo animal usado en este estudio usa células LS174t que también expresan el antígeno TAG-72. La biodistribución del inmunoconjugado marcado con ^{64}Cu (inyección intravenosa de 0,10 ml) se evaluó en ratones atímicos portadores de un tumor LS174t (5 animales por cada tiempo correspondiente a la toma de datos) a intervalos de 1, 3, 5, 24 y 48 horas. Los estudios de biodistribución se realizaron por duplicado. La biodistribución del radiomarcador se presenta en la tabla 4 y se ilustra diagramáticamente en la figura 6a; la biodistribución del complejo de los compuestos (1) (2) y (3) muestra que si el ligando realmente se separa del anticuerpo de alguna manera saldrá rápidamente del sistema y no liberará el ^{64}Cu .

ES 2 278 590 T3

Leyenda para las tablas

5	Activity	Actividad
	Adrenals	Suprarrenales
	Biodistribution of ...	Biodistribución de ...
10	BLADDER	VEJIGA
	Bladder wall	Pared vesical
	BLOOD	SANGRE
15	BONE	HUESO
	Bone Surfaces	Superficies óseas
	Brain	Cerebro
20	Breasts	Mamas
	COMPLEXATION OF	COMPLEJACIÓN DE
25	CONTROL MICE NOT INJECTED	RATONES DE CONTROL SIN INYECTAR
	⁶⁴ Cu-labelled compound	Compuesto marcado con ⁶⁴ Cu
30	Days	Días
	Dose	Dosis
	Dose per	Dosis por cada
35	Effective dose	Dosis eficaz
	Experiment	Experimento
	EXPERIMENT DAY NO	Nº DE DÍA DEL EXPERIMENTO
40	Extension of mouse life relative to	Prolongación de la vida del ratón con relación a
	FRACTION OF ANIMALS	FRACCIÓN DE ANIMALES QUE
45	SURVIVING	SOBREVIVEN
	Gallbladder wall	Pared de la vesícula biliar
	GIT	TUBO DIGESTIVO
50	HEART	CORAZÓN
	Heart wall	Pared cardíaca
	HR	H
55	HOUR	HORA
	%ID THYROID	% DI TIROIDES
60	% INJECTED DOSE PER GRAM	% DE DOSIS INYECTADA POR GRAMO
	KIDNEY	RIÑÓN
65	KIDNEY:BLOOD	RIÑÓN:SANGRE

ES 2 278 590 T3

	KIDNEY:LIVER	RIÑÓN:HÍGADO
	LIVER	HÍGADO
5	LLI wall	Pared del colon descendente
	LUNGS	PULMONES
	Maximum Radiation Dose	Cálculos de dosis de
10	Estimates for ...	radiación máxima para ...
	MEAN	MEDIA
	MICE INJECTED WITH	RATONES A LOS QUE SE
15		INYECTÓ
	MUSCLE	MÚSCULO
	nu/nu mice	ratón atímico
20	ORGAN	ÓRGANO
	Ovaries	Ovarios
	Pancreas	Páncreas
25	Part B	Parte B
	RADIOTHERAPEUTIC EFFECT OF	EFECTO RADIOTERAPÉUTICO DE
30	Ratio of Target:Non Target	Relación entre las dosis en
	Doses each	el órgano que es el
	Radioimmunoconjugate	objetivo y el órgano que no
35		lo es para cada
		radioinmunoconjugado
	Red Marrow	Médula roja
40	SD	DE
	Serum Stability Of (...) AT T	Estabilidad sérica de (...) A
	= 0	T = 0
45	S factor	Factor S
	SKIN	PIEL
	Small intestine	Intestino delgado
50	SPLEEN	BAZO
	STOMACH	ESTÓMAGO
55	Survival	Supervivencia
	TAIL	COLA
	Testes	Testículos
60	THYROID	TIROIDES
	Thymus	Timo
	TIME	TIEMPO
65	Total Body	Todo el organismo

ES 2 278 590 T3

	Total Body Dose for 7 days	Dosis para todo el organismo durante 7 días
5	Total Dose	Dosis total
	TUMOUR	TUMOR
	TUMOUR BEARING NUDE MICE	RATONES ATÍMICOS PORTADORES
10		DE TUMOR
	TUMOUR:BLOOD	TUMOR:SANGRE
	TUMOUR:KIDNEY	TUMOR:RIÑÓN
15	TUMOUR:LIVER	TUMOR:HÍGADO
	Tumour Mass	Masa del tumor
20	ULI wall	Pared del intestino delgado
	UNITS	UNIDADES
	URINE	ORINA
25	Uterus	Útero
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

TABLA I.
⁶⁴Cu-labelled compound (4)
 % INJECTED DOSE PER GRAM

TIME	3 MIN		5 MIN		10 MIN		15 MIN		20 MIN		30 MIN	
ORGAN	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.
LIVER	1.81	0.30	1.59	0.12	1.16	0.06	0.64	0.06	5.01	0.55	5.76	0.58
SPLEEN	2.26	0.43	2.17	0.29	1.28	0.14	0.67	0.15	0.52	0.08	0.35	0.07
KIDNEY	20.08	4.98	18.62	4.09	14.79	6.26	7.52	0.54	25.99	3.24	30.26	4.50
MUSCLE	1.76	0.23	2.10	0.59	1.24	0.27	1.73	1.32	0.36	0.06	1.27	1.43
SKIN	5.98	0.31	6.46	0.56	4.21	0.68	2.76	0.10	1.73	0.45	1.42	0.42
BONE	1.60	0.25	1.56	0.24	1.28	0.23	1.60	0.41	0.89	0.51	0.65	0.10
LUNGS	5.85	0.03	5.28	0.46	2.84	1.09	2.09	0.24	1.13	0.30	0.92	0.15
HEART	3.25	0.34	2.66	0.14	1.60	0.36	1.08	0.18	0.51	0.08	0.47	0.17
BLOOD	8.25	0.32	7.08	0.22	4.41	0.78	2.71	0.57	1.40	0.12	1.07	0.21
BLADDER	13.15	6.81	28.05	18.33	69.91	54.03	8.17	4.96	16.38	20.77	25.38	35.78
STOMACH	3.53	0.56	3.04	0.29	1.84	0.55	0.89	0.37	0.70	0.14	0.65	0.10
GIT	2.62	0.08	2.16	0.20	1.49	0.31	1.07	0.18	0.89	0.05	0.80	0.04

TABLE 2.
⁶⁴Cu-labelled compound (1)

TIME ORGAN	% INJECTED DOSE PER GRAM																	
	3 MIN		5 MIN		10 MIN		15 MIN		20 MIN		30 MIN							
	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.						
LIVER	2.29	0.22	1.50	0.17	1.42	0.22	0.82	0.19	0.69	0.15	0.50	0.08						
SPLEEN	2.09	0.52	1.48	0.21	1.54	0.25	1.44	0.76	0.69	0.12	0.52	0.16						
KIDNEY	23.18	11.73	11.50	1.34	12.80	1.83	6.77	1.40	7.77	0.67	4.95	0.92						
MUSCLE	1.81	0.32	1.81	0.59	2.39	1.14	2.28	1.66	1.17	1.02	1.33	1.59						
SKIN	5.82	0.42	5.59	0.59	5.48	1.07	2.61	0.44	2.96	0.72	1.63	0.08						
BONE	2.25	0.45	1.87	0.47	1.79	0.29	1.23	0.12	1.25	0.44	0.78	0.23						
LUNGS	6.51	1.28	4.45	0.54	3.91	1.98	2.06	0.32	2.73	0.61	0.85	0.31						
HEART	3.11	0.38	2.25	0.10	2.27	0.43	0.89	0.12	1.23	0.71	0.40	0.10						
BLOOD	8.68	1.35	6.32	0.70	5.45	0.81	2.48	0.31	2.63	0.29	1.14	0.25						
BLADDER	24.36	16.90	31.12	19.21	27.75	21.59	15.17	8.53	23.29	15.56	122.93	71.11						
STOMACH	3.50	0.64	2.73	0.36	2.08	0.80	1.50	0.46	1.16	0.06	0.74	0.04						
GIT	2.75	0.59	2.21	0.08	1.85	0.38	1.11	0.06	1.05	0.17	1.16	0.72						

TABLE 3.
⁶⁴Cu-labelled compound (3)

TIME ORGAN	% INJECTED DOSE PER GRAM											
	3 MIN	5 MIN	10 MIN	15 MIN	20 MIN	30 MIN	3 MIN	5 MIN	10 MIN	15 MIN	20 MIN	30 MIN
	MEAN	MEAN	MEAN	MEAN	MEAN	MEAN	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.
LIVER	1.94	2.00	1.46	1.24	1.04	0.72	0.17	0.52	0.39	0.23	0.08	0.02
SPLEEN	1.96	2.01	1.26	1.09	0.93	0.39	0.14	0.16	0.20	0.25	0.13	0.05
KIDNEY	22.41	18.99	13.41	10.26	9.98	5.95	5.77	2.98	3.04	1.76	1.73	0.27
MUSCLE	1.98	3.17	1.73	2.40	2.13	0.50	0.48	2.34	0.28	1.39	1.35	0.01
SKIN	5.63	6.18	4.86	4.49	3.41	1.45	1.05	1.17	1.14	1.03	1.10	0.13
BONE	1.68	2.11	1.29	1.36	1.11	0.72	0.04	0.60	0.43	0.24	0.08	0.10
LUNGS	5.48	5.74	4.00	3.25	2.59	1.13	0.61	1.07	0.79	0.64	0.50	0.01
HEART	2.79	3.00	2.03	1.56	1.24	0.50	0.36	0.59	0.58	0.29	0.05	0.11
BLOOD	7.74	8.19	5.23	4.39	3.05	1.25	0.43	1.53	1.28	0.59	0.44	0.02
BLADDER	11.36	12.31	14.36	10.54	13.45	2.74	4.02	4.09	9.79	9.64	16.47	2.02
STOMACH	2.69	3.11	2.35	1.91	1.54	0.60	0.51	0.79	0.65	0.45	0.33	0.04
GIT	2.66	2.88	1.80	2.92	1.05	0.55	0.29	0.46	0.38	2.46	0.22	0.03

TABLA 4.
⁶⁴Cu-labelled conjugate of B72.3 with compound (3)

TIME ORGAN	% INJECTED DOSE PER GRAM		1 HR		3 HR		5 HR		16 HR		24 HR		48 HR	
	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
LIVER	19.09	1.05	18.44	0.58	19.54	2.34	16.38	1.59	15.52	2.95	13.76	3.21	13.76	3.21
SPLEEN	11.51	1.13	8.35	1.19	10.17	0.98	10.08	1.75	8.47	1.89	8.44	1.57	8.44	1.57
KIDNEY	10.64	1.47	9.94	0.15	10.41	1.10	9.16	1.77	7.39	0.65	7.59	1.35	7.59	1.35
MUSCLE	1.45	0.52	1.48	0.23	1.45	0.16	1.98	0.27	2.54	0.54	1.72	0.42	1.72	0.42
SKIN	2.83	0.52	5.18	0.26	5.99	1.38	8.64	1.16	8.30	1.30	6.95	0.16	6.95	0.16
BONE	4.42	0.55	3.82	0.49	3.21	0.30	3.93	0.49	4.28	0.72	3.39	0.38	3.39	0.38
LUNGS	13.32	1.52	11.43	1.44	9.78	0.86	11.03	1.93	7.76	0.87	6.81	1.09	6.81	1.09
HEART	10.56	2.29	8.58	1.21	9.04	3.30	6.77	0.92	5.14	0.72	5.20	0.43	5.20	0.43
BLOOD	47.98	5.60	37.94	1.52	33.41	3.66	26.41	1.48	21.50	1.81	18.69	2.01	18.69	2.01
BLADDER	2.33	0.77	2.93	0.62	3.15	0.47	7.00	5.09	5.41	2.37	4.87	0.92	4.87	0.92
STOMACH	1.41	0.29	1.69	0.33	2.32	0.51	1.48	0.74	1.58	0.31	1.43	0.32	1.43	0.32
GIT	2.23	0.35	2.60	0.20	2.87	0.23	2.28	0.14	2.20	0.20	1.86	0.31	1.86	0.31
TAIL	5.03	0.73	4.96	0.83	5.64	1.82	6.14	2.47	5.18	1.20	4.08	0.30	4.08	0.30
TUMOUR	5.98	0.80	11.10	0.76	12.31	1.68	23.77	2.46	29.43	4.44	38.43	4.79	38.43	4.79

Table 5
Biodistribution of ¹²⁵I-B72.3 in nu/nu mice

% ID/g Time (hours) ORGAN	1	3	6	16	24	48	SD
	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	SD
LIVER	11.89	8.93	7.45	5.61	5.03	4.92	0.90
SPLEEN	10.17	6.92	6.27	5.20	4.33	4.58	1.25
KIDNEY	11.20	8.89	9.24	5.83	5.40	4.76	0.78
MUSCLE	1.69	2.40	3.04	2.55	2.70	2.48	0.33
SKIN	4.36	5.96	7.79	7.94	7.96	7.41	1.44
BONE	5.43	4.43	3.23	3.19	2.58	2.54	0.36
LUNGS	14.28	12.84	11.00	7.39	6.64	6.47	0.64
HEART	14.03	10.11	9.46	7.28	5.78	4.87	1.10
BLOOD	55.63	44.78	42.20	28.27	28.73	22.73	2.50
URINE	3.96	13.29	18.31	7.28	6.92	6.87	2.11
BLADDER	3.49	5.10	4.85	4.74	5.70	6.63	1.23
STOMACH	1.80	2.94	4.06	2.64	3.06	3.05	0.72
GIT	2.35	2.74	2.74	1.84	1.65	1.51	0.07
THYROID	8.76	17.29	38.66	29.47	85.96	549.83	353.44
TUMOUR	9.61	16.46	31.43	31.37	44.67	46.17	7.25
%ID THYROID	0.08	0.19	0.42	0.40	1.24	2.59	1.13
TUMOUR:BLOOD	0.2	0.4	0.7	1.1	1.6	2.0	0.5
TUMOUR:LIVER	0.8	1.8	4.2	5.6	8.9	9.4	3.2
TUMOUR:KIDNEY	0.9	1.9	3.4	5.4	8.3	9.7	3.1
KIDNEY:BLOOD	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
KIDNEY:LIVER	0.9	1.0	1.2	1.0	1.1	1.0	0.3

Table 6.
Biodistribution of ^{111}In -DTPA-B72.3 in nu/nu mice.

% ID/g Time (hours) ORGAN	1	3	6	16	24	48	SD
	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	SD
LIVER	13.4	10.54	11.2	7.27	8.43	7.59	0.72
SPLEEN	12.52	9.56	10.05	6.47	7.32	4.48	2.28
KIDNEY	15.41	12.04	14.13	15.59	13.97	15.04	1.57
MUSCLE	2.08	1.96	2.56	2.44	2.28	1.84	0.51
SKIN	4.17	7.54	9.31	9.48	8.44	7.54	0.75
BONE	5.9	4.59	3.85	5.81	5.52	5.23	0.9
LUNGS	18.58	13.14	13.03	8.06	6.58	7.07	1.93
HEART	11.9	9.59	11.71	6.25	4.99	3.95	0.45
BLOOD	56.19	39.03	38.23	26.51	21.78	17.04	0.89
URINE		5.23	3.96	4.46	4.46	4.43	1.56
BLADDER	11.82	5.59	8.31	7.68	6.88	4.28	0.39
STOMACH	2.43	2.49	2.2	1.53	1.47	1.47	0.44
GIT	2.12	2.44	2.33	2.17	2.04	2.33	0.2
TAIL	9.37	8.39	8.53	4.98	4.69	3.79	1.37
THYROID	18.66	25.91	8.09	7.37	8.51	4.45	0.91
TUMOUR	8.87	17.95	21.24	38.25	35	48.99	4
%ID THYROID	0.07	0.06	0.07	0.07	0.06	0.06	0.01
TUMOUR:BLOOD	0.2	0.5	0.6	1.4	1.6	2.9	0.4
TUMOUR:LIVER	0.7	1.7	1.9	5.3	4.2	6.5	1.1
TUMOUR:KIDNEY	0.6	1.5	1.5	2.5	2.5	3.3	0.6
KIDNEY:BLOOD	0.3	0.3	0.4	0.6	0.6	0.9	0.1
KIDNEY:LIVER	1.2	1.1	1.3	2.1	1.7	2.0	0.4

ES 2 278 590 T3

Se comprenderá que el término “SarAr” como se usa en las tablas y las descripciones siguientes se refiere al compuesto (3) según se muestra en el ejemplo 1.

TABLA 7

Maximum Radiation Dose Estimates for ⁶⁴Cu-SarAr-B72.3

Organ	Total Dose mGy/MBq	Total Dose Rad/mCi
Adrenals	0.030	0.111
Brain	0.018	0.068
Breasts	0.021	0.078
Gallbladder Wall	0.036	0.133
LLI Wall	0.094	0.347
Small Intestine	0.047	0.175
Stomach	0.029	0.107
ULI Wall	0.069	0.255
Heart Wall	0.075	0.278
Kidneys	0.129	0.477
Liver	0.152	0.563
Lungs	0.062	0.230
Ovaries	0.026	0.095
Muscle	0.013	0.047
Pancreas	0.030	0.110
Red Marrow	0.029	0.107
Bone Surfaces	0.030	0.111
Skin	0.019	0.069
Spleen	0.088	0.327
Thymus	0.023	0.086
Testes	0.019	0.072
Thyroid	0.020	0.074
Bladder Wall	0.019	0.070
Uterus	0.029	0.109
Total Body	0.024	0.090

Tumour	S factor	Dose	Dose
Mass (g)	rad/uCi-h	Gy	rad
0.1	2.25	17.80	1779.75
0.5	0.48	3.80	380.47
1.0	0.25	1.97	196.96
2.0	0.13	1.00	99.67

TABLA 8

Maximum Radiation Dose Estimate for ¹³¹ I-B72.3				
Organ	Total Dose		Total Dose	
	mGy/MBq		rad/mCi	
Adrenals	0.821		3.038	
Brain	0.514		1.902	
Breasts	0.603		2.231	
Gallbladder Wall	0.913		3.378	
LLI Wall	2.24		8.288	
Small Intestine	1.3		4.810	
Stomach	1.15		4.255	
ULI Wall	1.69		6.253	
Heart Wall	1.82		6.734	
Kidneys	2.41		8.917	
Liver	1.92		7.104	
Lungs	1.55		5.735	
Muscle	0.473		1.750	
Ovaries	0.768		2.842	
Pancreas	0.858		3.175	
Red Marrow	0.783		2.897	
Bone Surfaces	0.678		2.509	
Skin	0.547		2.024	
Spleen	2.04		7.548	
Testes	0.595		2.202	
Thymus	0.717		2.653	
Thyroid	44.6		165.020	
Bladder Wall	0.755		2.794	
Uterus	1.13		4.181	
Total Body	0.715		2.646	
Effective Dose	3.45	mSv/MBq	12.765	rem/mCi
(Tumour not included)				

Tumour	S factor	Dose per mCi	
		Gy	rad
Mass (g)			
0.1	3.6	982	98275
0.5	0.759	207	20720
1	0.393	107	10728
2	0.2	54	5460

Contribución de la actividad en el tumor a la dosis del órgano

Se supone que el tumor es una fuente pequeña ubicada en el tronco inferior que hará una contribución a todas las otras dosis de los órganos. Para que se pueda usar el programa de computación conocido como MIRDose 3, se supone que la actividad estará localizada en los ovarios. La dosis del ovario indicada precedentemente se calculó por separado. No es la dosis tumoral.

ES 2 278 590 T3

Tiempo de residencia en la vejiga - La actividad excretada por la vejiga es casi insignificante. El total de los tiempos de residencia en vejiga y orina de la tabla 5 se usó como la actividad en orina en el cálculo de la dosis. No se usó ningún modelo de excreción ni tiempo presupuesto de evacuación.

TABLA 9

Maximum Radiation Dose Estimates for ⁹⁰ Y			
	Organ	Total Dose mGy/MBq	Total Dose rad/mCi
	Adrenals	0.57	2.109
	Brain	0.57	2.109
	Breasts	0.57	2.109
	Gallbladder Wall	0.57	2.109
	LLI Wall	3.47	12.839
	Small Intestine	1.36	5.032
	Stomach	0.709	2.623
	ULI Wall	2.25	8.325
	Heart Wall	1.8	6.660
	Kidneys	7.87	29.119
	Liver	2.89	10.693
	Lungs	1.88	6.956
	Muscle	0.232	0.858
	Ovaries	0.57	2.109
	Pancreas	0.57	2.109
	Red Marrow	0.964	3.567
	Bone Surfaces	1.03	3.811
	Skin	0.57	2.109
	Spleen	2.32	8.584
	Testes	0.57	2.109
	Thymus	0.57	2.109
	Thyroid	1.72	6.364
	Bladder Wall	0.444	1.643
	Uterus	0.57	2.109
	Total Body	0.645	2.387
Tumour			
	Mass (g)	S rad/uCi-h	Dose per mCi Gy rad
	0.1	8.97	546 54585
	0.5	2.51	152.7 15274
	1	1.4	85.2 8519
	2	0.758	46.1 4613

Contribución de la actividad en el tumor a la dosis del órgano

Se supone que el tumor es una fuente pequeña ubicada en el tronco inferior que hará una contribución a todas las otras dosis de los órganos. Para que se pueda usar el programa de computación conocido como MIRDose 3, se supone que la actividad está ubicada en los ovarios. La dosis del ovario indicada precedentemente se calculó por separado. No es la dosis tumoral.

Tiempo de residencia en la vejiga: La actividad excretada por la vejiga es casi insignificante. El total de los tiempos de residencia en vejiga y orina de la tabla 5 se usó como la actividad en orina en el cálculo de la dosis. No se usó ningún modelo de excreción ni tiempo presupuesto de evacuación.

TABLA 10

Radiation Dose Estimate for ^{131}I -B72.3 (7 days)

Organ	Total Dose mGy/MBq	Total Dose rad/mCi
Adrenals	0.377	1.395
Brain	0.24	0.888
Breasts	0.276	1.021
Gallbladder Wall	0.418	1.547
LLI Wall	1.02	3.774
Small Intestine	0.587	2.172
Stomach	0.52	1.924
ULI Wall	0.769	2.845
Heart Wall	0.863	3.193
Kidneys	1.13	4.181
Liver	0.888	3.286
Lungs	0.727	2.690
Muscle	0.212	0.784
Ovaries	0.35	1.295
Pancreas	0.393	1.454
Red Marrow	0.358	1.325
Bone Surfaces	0.309	1.143
Skin	0.25	0.925
Spleen	0.951	3.519
Testes	0.272	1.006
Thymus	0.328	1.214
Thyroid	17.8	65.860
Bladder Wall	0.338	1.251
Uterus	0.497	1.839
Total Body	0.323	1.195

Tumour	Dose to 24 hour
Mass (g)	rad/mCi

0.1	2991
0.5	631
1	327
2	166

TABLA 11

Radiation Dose Estimates for ⁹⁰Y (7 days)

Organ	Total Dose mGy/MBq	Total Dose rad/mCi
Adrenals	0.5	1.850
Brain	0.365	1.351
Breasts	0.5	1.850
Gallbladder Wall	0.5	1.850
LLI Wall	2.87	10.619
Small Intestine	1.14	4.218
Stomach	0.603	2.231
ULI Wall	1.87	6.919
Heart Wall	1.53	5.661
Kidneys	6.5	24.050
Liver	2.41	8.917
Lungs	1.58	5.846
Muscle	0.194	0.718
Ovaries	0.4	1.480
Pancreas	0.5	1.850
Red Marrow	0.808	2.990
Bone Surfaces	0.858	3.175
Skin	0.5	1.850
Spleen	1.97	7.289
Testes	0.5	1.850
Thymus	0.5	1.850
Thyroid	1.43	5.291
Bladder Wall	0.38	1.406
Uterus	0.5	1.850
Total Body	0.546	2.020

Tumour Mass (g)	rad/mCi at 24 hour
0.1	6925
0.5	1938
1	1081
2	585

Estudio radioterapéutico

El estudio radioterapéutico se realizó en dos partes.

Parte A donde se calcularon las dosis teóricas para los órganos que son el objetivo y que no lo son para los radioinmunoconjugados análogos.

Parte B donde se inyectaron los diversos niveles radiactivos de ⁶⁴Cu-SarAr-B72.3 en ratones atómicos portadores de un tumor y se controló el efecto terapéutico del producto como una prolongación del tiempo de supervivencia del animal.

Estudio radioterapéutico - Parte A

Se realizaron estudios de biodistribución de B72.3 radiomarcado con ^{123}I y ^{111}In en ratones atómicos portadores de un tumor LS174t (consulte las tablas 5 y 6). Se realizaron cálculos estándar usando el programa de computación MIRDose 3 para comparar la dosis en los órganos que son el objetivo con la dosis en los órganos que no lo son de sus contrapartes terapéuticas análogas (^{90}Y y ^{131}I respectivamente) con ^{64}Cu -SarAr-B72.3 (consulte las tablas 7, 8 y 9).

Se calculó la dosis máxima acumulada teórica (que es equivalente a 10 veces la vida media de desintegración) para cada radioinmunoconjugado. La dosis corporal total de ^{64}Cu -SarAr-B72.3 fue significativamente inferior (0,09 rad/mCi) que la de los productos análogos (^{131}I -B72.3, 2,64 rad/mCi; ^{90}Y -B72.3, 2,387 rad/mCi). Se calcularon dosis máximas comparativas para tumores de diversos tamaños. Las dosis para ^{131}I -B72.3 y ^{90}Y -B72.3 parecen ser mejores que para ^{64}Cu -SarAr-B72.3. Sin embargo, la falta de estabilidad del radioinmunoconjugado en el sitio del tumor en los sistemas biológicos reales evita que el tumor reciba la dosis acumulada máxima.

En consecuencia las dosis para los órganos que son el objetivo y que no lo son se recalcularon suponiendo que los radioinmunoconjugados (^{131}I e ^{90}Y) eran estables durante aproximadamente 24 horas en el sitio del tumor y los órganos que no eran el objetivo se dosificaron durante 7 días como máximo permitiendo la depuración biológica natural. Se usó MIRDose 3 para recalcular la dosis para diversos órganos en estas condiciones (ver tablas 10 y 11). Las relaciones órgano que es el objetivo/órgano que no es el objetivo resultantes más importantes se muestran en la tabla 12.

TABLA 12

Ratio of Target:Non-Target Doses for each Radioimmunoconjugate

	^{64}Cu	^{131}I	^{90}Y
Tumour (0.1g):Kidneys	2094	716	288
Tumour (0.1g):Liver	1795	906	776
Total Body Dose for 7 days	0.09	1.195	2.020

* Se usó MIRDose 3 para calcular las dosis en órganos humanos suponiendo que los tiempos de residencia en el hombre son los mismos que en el modelo animal. Se reconoce que esto afecta a la exactitud de los cálculos de las dosis.

Estudio radioterapéutico - Parte B

Para evaluar el efecto terapéutico del ^{64}Cu , en un sistema biológico real, se inyectaron a ratones atómicos portadores de un carcinoma colorrectal LS174t diversas dosis (0, 10, 20, 30, 40 MBq) de ^{64}Cu -SarAr-B72.3.

Los resultados se muestran en la tabla 13 y un perfil típico de un estudio en la figura 1. Para todos los niveles de actividad superiores a 20 MBq se logró una prolongación significativa en la vida de los ratones. Siguen los detalles experimentales.

TABLA 13

Extension of mouse life relative to ^{64}Cu -SarAr-B72.3 - Part B

Experiment	Survival ¹ (Days)
Control ²	20-25
10 MBq	30-35
20 MBq	60-70
30 MBq	40-45
40 MBq	30-35

¹Más del 30% de los animales; ²Más de 50 animales de control;

Figura 1. Efecto radioterapéutico de 30 MBq de ^{64}Cu -SarAr-B72.3 en ratones atómicos portadores de un tumor.

ES 2 278 590 T3

Parte experimental del estudio radioterapéutico - Parte B

Modelo animal: Se trasplantó tejido tumoral LS174t de ratones atímicos a ratones atímicos para cada experimento.

5 *Selección de animales:* Sólo se seleccionaron animales con tumores de 3,5-5,5 mm 7 días después del trasplante para cada estudio. Hasta 10 animales por dosis.

Inyección: El producto se inyectó en ratones atímicos el día 7 después del trasplante del tejido tumoral.

10 *Dosis:* Se inyectaron diversas actividades de Cu-64-SarAr-B72.3 en los ratones. Los animales de control recibieron sólo anticuerpo.

Control de los animales: Los animales se controlaron para detectar cambios en el tamaño del tumor

15 Masa del animal

Anomalías en el comportamiento y físicas

(por ejemplo, movimiento/marcha, consumo de alimentos y encorvado)

20 (Para cualquiera de las características anteriores, aumentó la frecuencia de pesaje)

Histología, hematología y bioquímica:

25 Los animales se sacrificaron en momentos preestablecidos (2 días, 1, 2, 3, 4 semanas, 2, 3, 4, 5 y 6 meses).

Se controlaron los efectos radiotóxicos.

30 (lo que fue realizado por patólogos externos del Departamento de Anatomía y Patología Veterinaria, de la Universidad de Sydney)

Punto final del estudio:

35 1) Pérdida de peso corporal > 20%.

2) Rápida pérdida de peso > 10% de un día para otro.

3) Ulceración del tumor

40 4) Limitación del comportamiento normal (por ejemplo, capacidad para alimentarse o beber).

5) Tamaño tumoral 10 x 10 mm (Cancer Council Reino Unido).

Ejemplo 7

45 De conformidad con la descripción de la invención proporcionada precedentemente, se pueden elaborar preparaciones farmacéuticas específicas preferidas de la presente invención, cuyos ejemplos se proporcionan a continuación. Las siguientes formulaciones específicas se interpretarán como ejemplos meramente ilustrativos de las formulaciones y de ninguna manera como una limitación del alcance de la presente invención.

50 Un compuesto de fórmula (I) se puede administrar solo, aunque es preferible que se administre como una formulación farmacéutica.

Ejemplo 7(a)

55 *Preparación para la administración parenteral*

Una preparación farmacéutica de la presente invención para inyección intramuscular se podría elaborar de modo que contenga 1 mL de solución salina isotónica estéril y 1 mg del compuesto de fórmula (I).

60 De la misma manera, una preparación farmacéutica para infusión intravenosa puede comprender 250 ml de solución de Ringer estéril, y 5 mg del compuesto de fórmula (I).

65

Ejemplo 7(b)

Preparación parenteral inyectable

5 Una preparación farmacéutica de esta invención en una forma adecuada para administración mediante inyección se puede preparar mezclando 1% en peso del compuesto de fórmula (I) en 12% en volumen de propilenglicol y solución salina isotónica. La solución se esteriliza por filtración.

10 Se considera que las modificaciones y variaciones como las que resultarían evidentes para un experto se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Se comprenderá que la presente invención no debe estar limitada a la realización o realizaciones particulares descritas precedentemente.

15 Se entenderá que en toda la especificación, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, las palabras, “comprender”, “comprende”, “que comprende” u otras variaciones, significan que el número entero declarado está incluido y que no excluye a otros números enteros de estar presentes aunque esos otros números enteros no se declaren explícitamente.

20

25

30

35

40

45

50

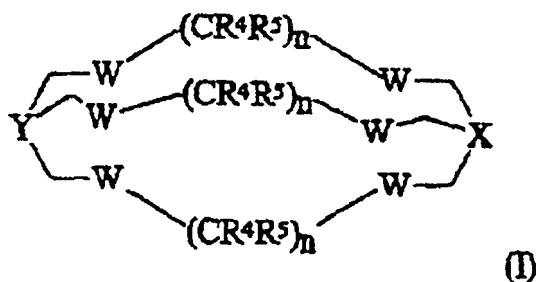
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto capaz de ser radiomarcado de fórmula general (I):



en la cual n representa un número entero entre 2 y 4,

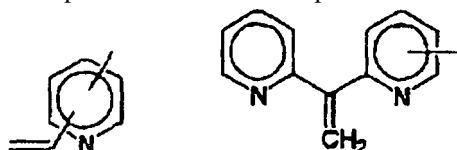
donde cada R^4 y R^5 se selecciona independientemente entre -H, CH_3 , $COOH$, NO_2 , CH_2OH , H_2PO_4 , HSO_3 , CN , $C(=O)NH_2$ y CHO ;

X e Y son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en C-R, N, P y C-Z en donde R se selecciona entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, nitroso, amino, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, ciano, $-COOR'$, $COCOOR'$, $NH-COCH_2Br$, $-NH-CO-CH=CH-COOR'$ en donde R' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, donde al menos uno de los grupos X e Y es C-Z;

W se selecciona del grupo que consiste en NH, S y O; y

Z es un grupo funcionalizado capaz de unir dicho compuesto de fórmula (I) a una unidad de reconocimiento

molecular, seleccionada entre NCS,



, $-NH-(CH_2)_p-Ar-NH_2$ y $-NH-(CH_2)_p-Ar-$

donde p es un número entero entre 1 y 4 y Ar es fenilo opcionalmente sustituido;

donde dichos sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en amino, halógeno, hidroxilo, mercapto, nitro, ciano, tiociano, alquilo, alcoxi, halogenoalquilo, acilo, acilamino, aciloxi, carboxilo, alcocicarboxilo, carbamoilo, piridilamino, carboxialquilcarbamoilo, N-carboxialquilcarbamoilo, sulfo, sulfamoilo, sulfamoilo mono o dialquilado o sulfamoilo fenilado que tenga opcionalmente uno o más sustituyentes alquilo, alquilsulfonilo, alcoxi-sulfonilo, fenilsulfonilo que opcionalmente contenga hidroxilo o fenoxisulfonilo;

o una sal de éstos farmacéuticamente aceptable.

2. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, donde W es NH.

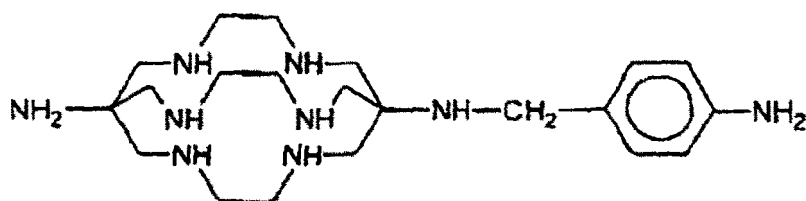
3. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde Z es $-NH-(CH_2)_p-Ar-NH_2$ o $-NH-(CH_2)_p-Ar-NCS$, y p es 1 ó 2.

4. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, donde W es NH y Z es $-NH-(CH_2)_p-Ar-NH_2$.

5. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, donde W es NH y Z es $-NH-(CH_2)_p-Ar-NCS$.

6. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, donde Ar es fenilo.

7. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 que es



ES 2 278 590 T3

8. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la unidad de reconocimiento molecular se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, una proteína, un péptido, un carbohidrato, un ácido nucleico, un oligonucleótido, un oligosacárido y un liposoma.
- 5 9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, donde la unidad de reconocimiento molecular es un anticuerpo.
- 10 10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho compuesto es acomplejado con un ión metálico que se selecciona del grupo que consiste en Cu, Tc, Ga, In, Co, Re, Fe, Au, Ag, Rh, Pt, Bi, Cr, W, Ni, V, Pb, Ir, Zn, Cd, Mn, Ru, Pd, Hg y Ti.
11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 10, donde el ión metálico se selecciona del grupo que consiste en Cu, Tc, Ga, In, Re, Fe, Au, Ag, Rh, Pt, Bi, Cr, W, Ni, V, Pb, Ir, Zn, Cd, Mn, Ru, Pd, Hg y Ti.
- 15 12. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 10, donde el ión metálico es un radionúclido que se selecciona del grupo que consiste en Cu, Tc, In, Ga, Fe, Ti y Re.
13. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 12, donde el radionúclido se selecciona entre ^{64}Cu y ^{67}Cu .
- 20 14. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, donde n es 3 ó 4 y el compuesto es acomplejado con un ión metálico que se selecciona entre los elementos del grupo de los lantánidos de la Tabla Periódica de los elementos.
- 25 15. Una preparación farmacéutica para radioimagenología o diagnóstico que comprende un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, una sal farmacéuticamente aceptable, un complejo metálico o un complejo radiomarcado de éste junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 16. El uso de un complejo radiomarcado de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o de una sal de éste farmacéuticamente aceptable para fabricar un medicamento para el diagnóstico de una enfermedad, la obtención de imágenes radiológicas o la radioterapia de una enfermedad.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicha enfermedad es cáncer.
- 35 18. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, donde dicho medicamento es para diagnosticar una enfermedad y el ión metálico es un radionúclido que se selecciona del grupo que consiste en Cu, Tc, Ga, In, Co, Re, Fe, Au, Ag, Rh, Pt, Bi, Cr, W, Ni, V, Pb, Ir, Zn, Cd, Mn, Ru, Pd, Hg y Ti.
19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, donde el ión metálico es un radionúclido que se selecciona del grupo que consiste en Cu, Tc, In, Ga, Fe, Ti y Re.
- 40 20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, donde el radionúclido se selecciona entre ^{64}Cu y ^{67}Cu .
21. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, donde dicho medicamento es para obtener imágenes radiológicas de una enfermedad y dicho ión metálico es un radionúclido seleccionado del grupo que consiste en Cu, Tc, Ga, In, Re, Fe, Au, Ag, Rh, Pt, Bi, Cr, W, Ni, V, Pb, Ir, Zn, Cd, Mn, Ru, Pd, Hg y Ti.
- 45 22. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, donde el ión metálico es un radionúclido que se selecciona del grupo que consiste en Cu, Tc, In, Ga, Fe, Ti y Re.
- 50 23. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde el radionúclido se selecciona entre ^{64}Cu y ^{67}Cu .
24. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, donde dicho medicamento es para radioterapia de una enfermedad, donde dicho ión metálico es un radionúclido que se selecciona del grupo que consiste en Cu, Ga, In, Co, Re, Fe, Au, Ag, Rh, Pt, Bi, Cr, W, Ni, V, Pb, Ir, Pt, Zn, Cd, Mn, Ru, Pd, Hg y Ti.
- 55 25. El uso de acuerdo con la reivindicación 24, donde el ión metálico es un radionúclido que se selecciona del grupo que consiste en Cu, In, Ga, Fe, Ti y Re.
- 60 26. El uso de acuerdo con la reivindicación 25, donde el radionúclido se selecciona entre ^{64}Cu y ^{67}Cu .
27. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde n es 3 ó 4 y el compuesto es acomplejado con un ión metálico radiomarcado que se selecciona entre los elementos del grupo de los lantánidos de la Tabla Periódica de los elementos.
- 65 28. Un compuesto conjugado que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o un complejo metálico, un complejo radiomarcado o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, unido al menos a una unidad de reconocimiento molecular que puede ser un anticuerpo, una proteína, un péptido, un carbohidrato, un oligonucleótido o un oligosacárido.

ES 2 278 590 T3

29. Un compuesto conjugado de acuerdo con la reivindicación 28, donde la unidad de reconocimiento molecular es un anticuerpo.

5 30. Una preparación farmacéutica que comprende un compuesto conjugado o un complejo metálico de éste de acuerdo con la reivindicación 28 ó 29, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

31. El uso de un complejo metálico radiomarcado de un compuesto conjugado de acuerdo con la reivindicación 28 ó 29, o de una sal de éste farmacéuticamente aceptable, para fabricar un medicamento para el diagnóstico de una enfermedad, la obtención de imágenes radiológicas o la radioterapia de una enfermedad.

10

32. El uso de acuerdo con la reivindicación 31, donde dicha enfermedad es cáncer.

33. El uso de acuerdo con la reivindicación 31 ó 32, donde dicho medicamento es para diagnosticar una enfermedad y dicho ión metálico es un radionúclido que se selecciona del grupo que consiste en Cu, Tc, Ga, In, Co, Re, Fe, Au, Ag, Rh, Pt, Bi, Cr, W, Ni, V, Pb, Ir, Zn, Cd, Mn, Ru, Pd, Hg y Ti.

15

34. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, donde el ión metálico es un radionúclido que se selecciona del grupo que consiste en Cu, Tc, In, Ga, Fe, Ti y Re.

20

35. El uso de acuerdo con la reivindicación 34, donde el radionúclido se selecciona entre ^{64}Cu y ^{67}Cu .

25

30

35

40

45

50

55

60

65

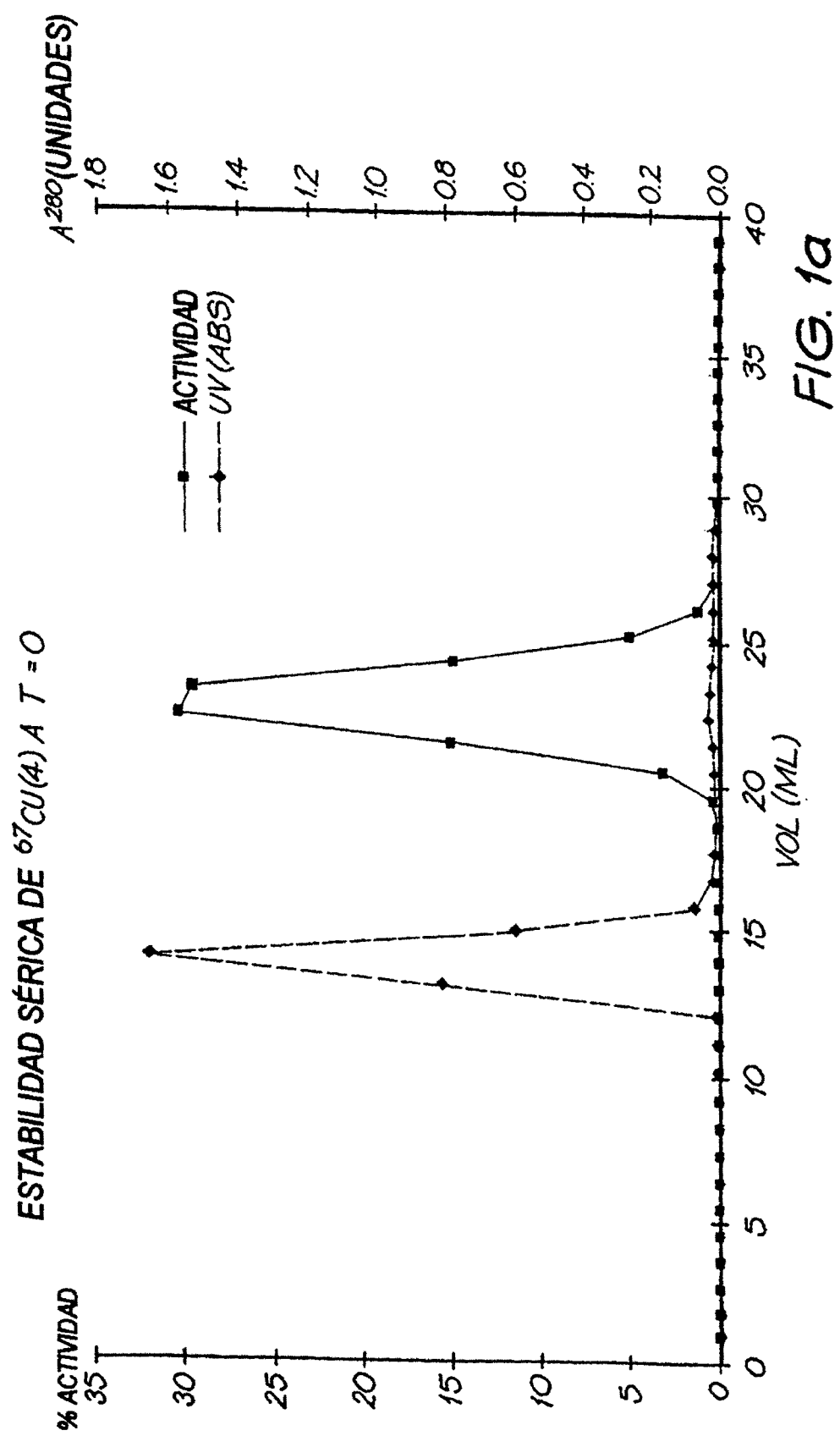


FIG. 1a

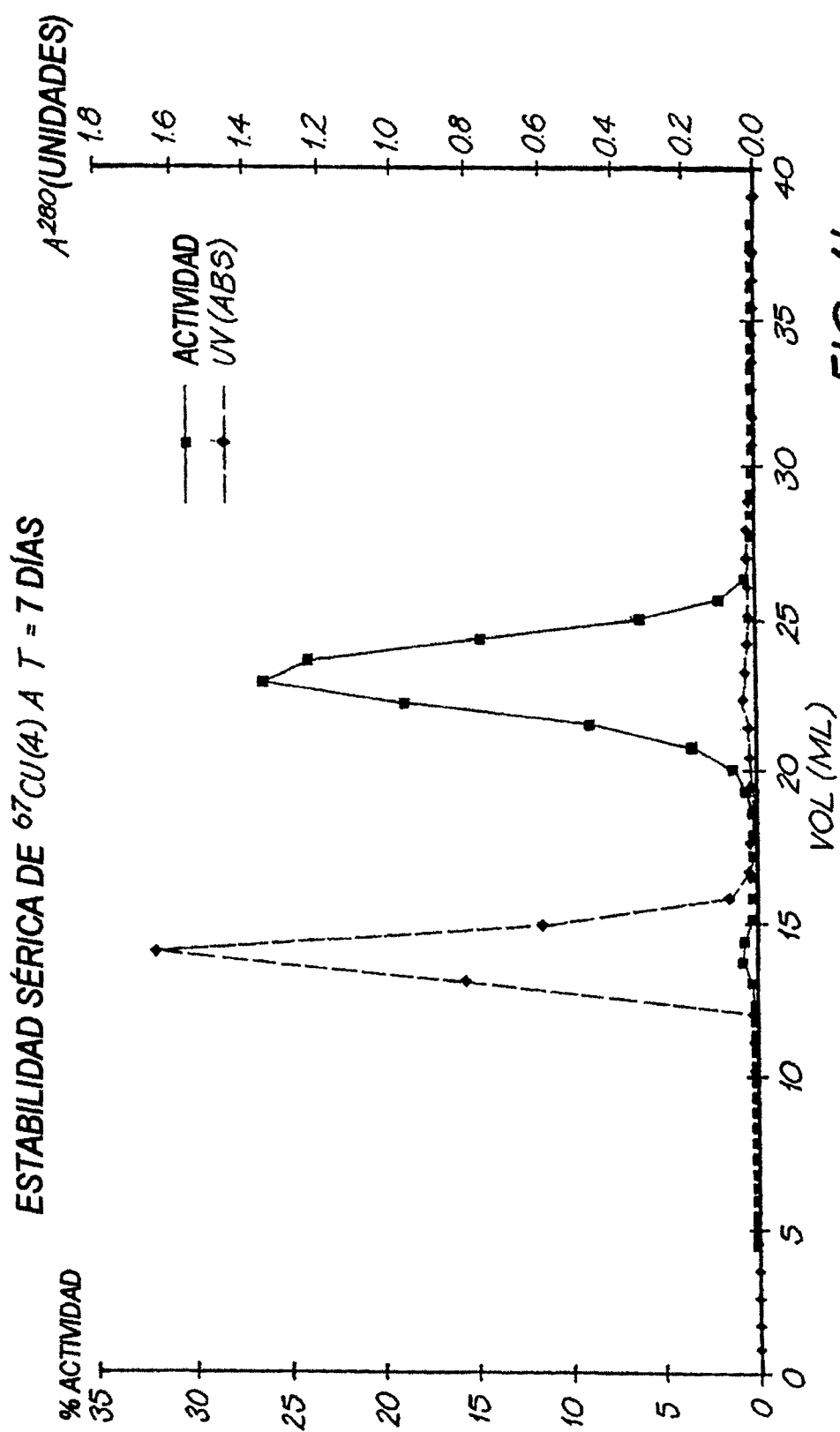


FIG. 1b

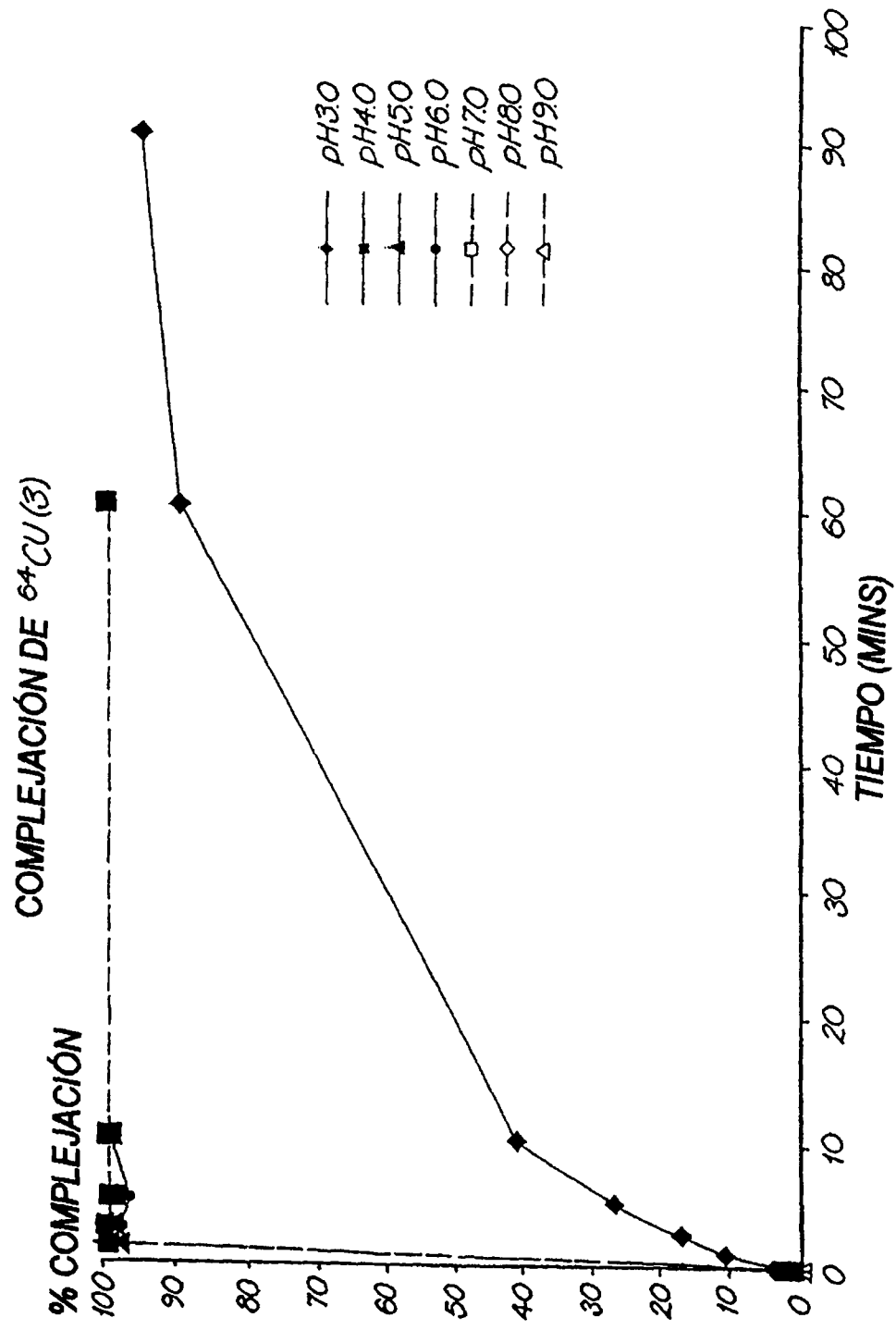
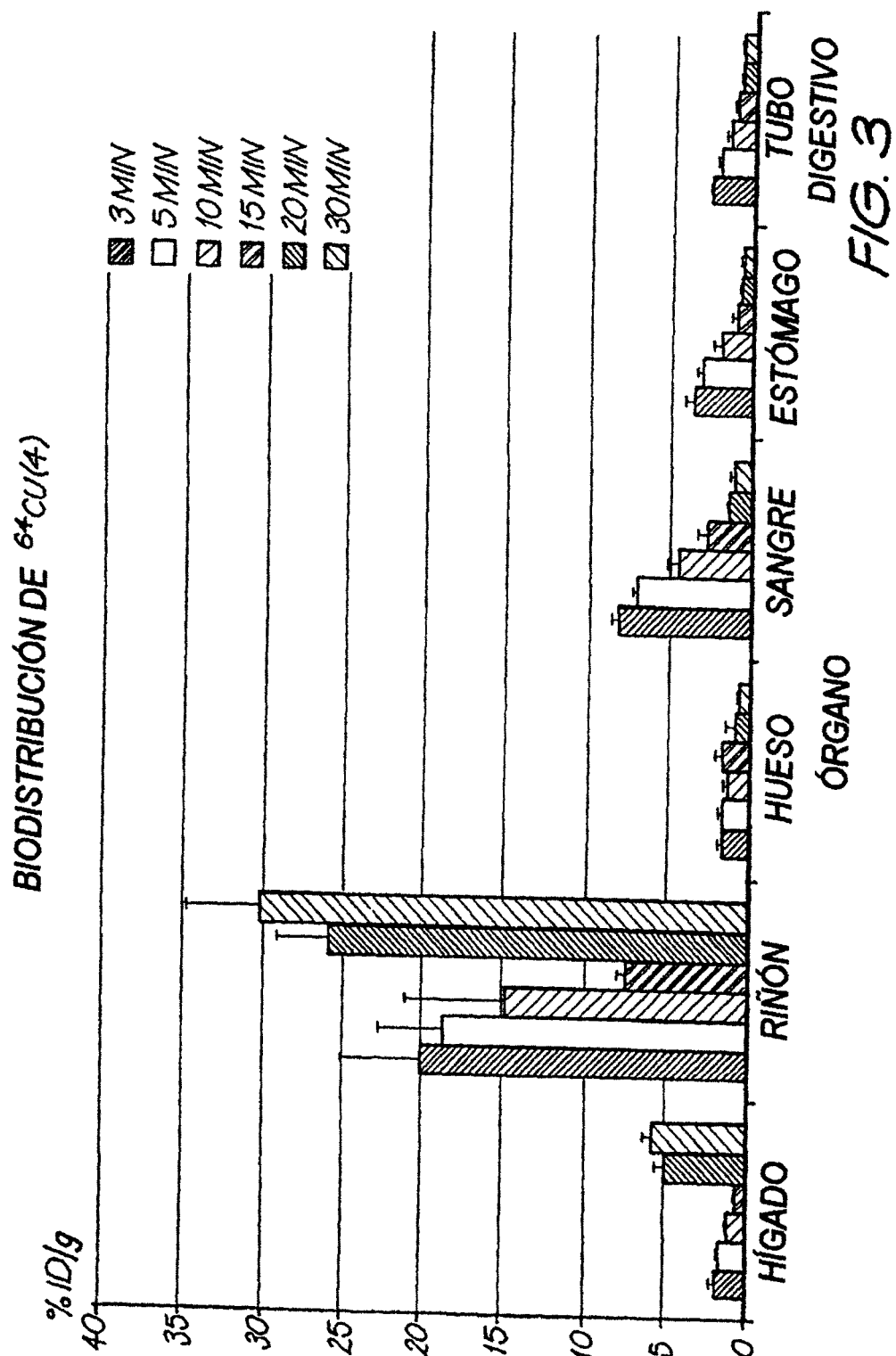


FIG. 2



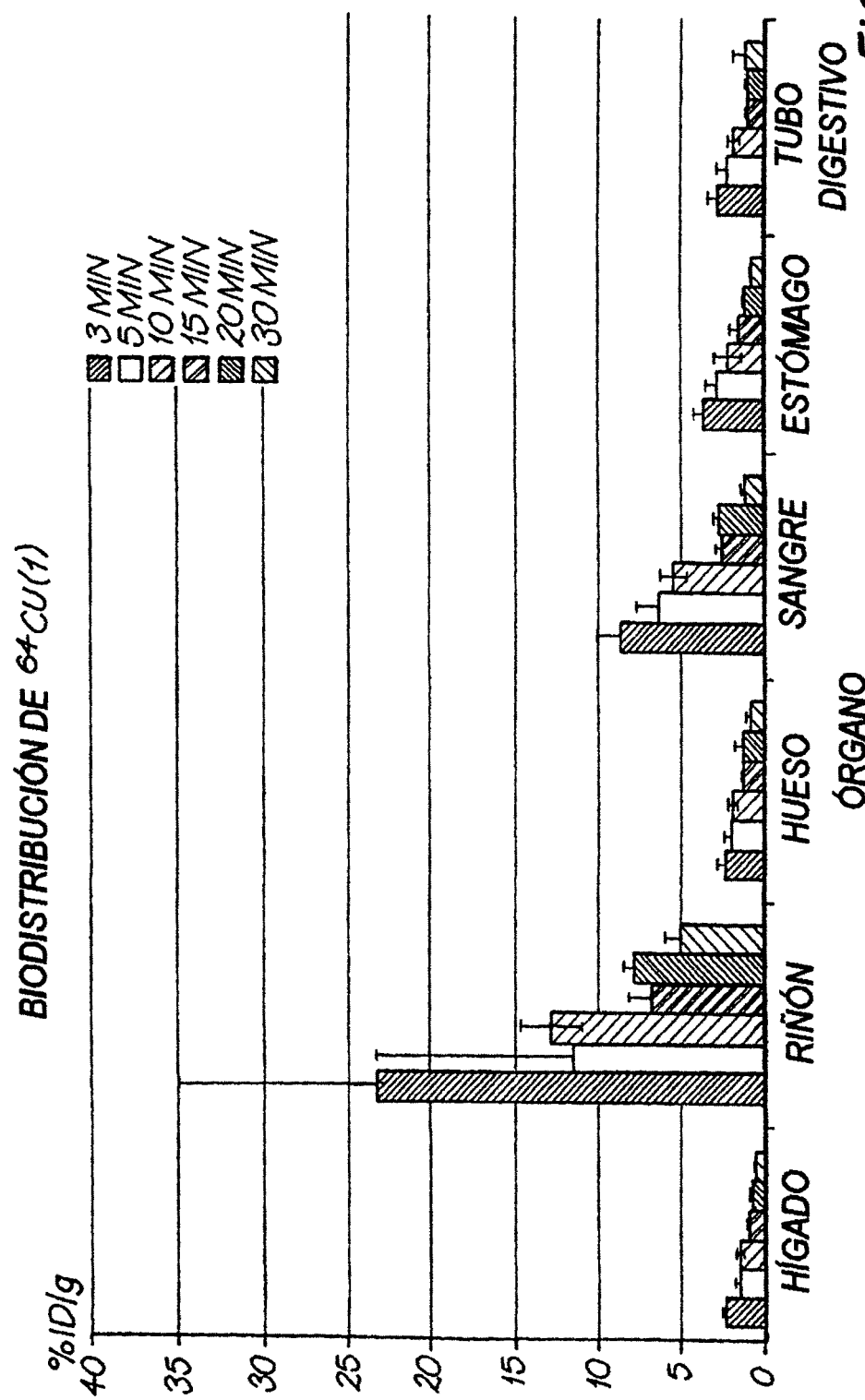
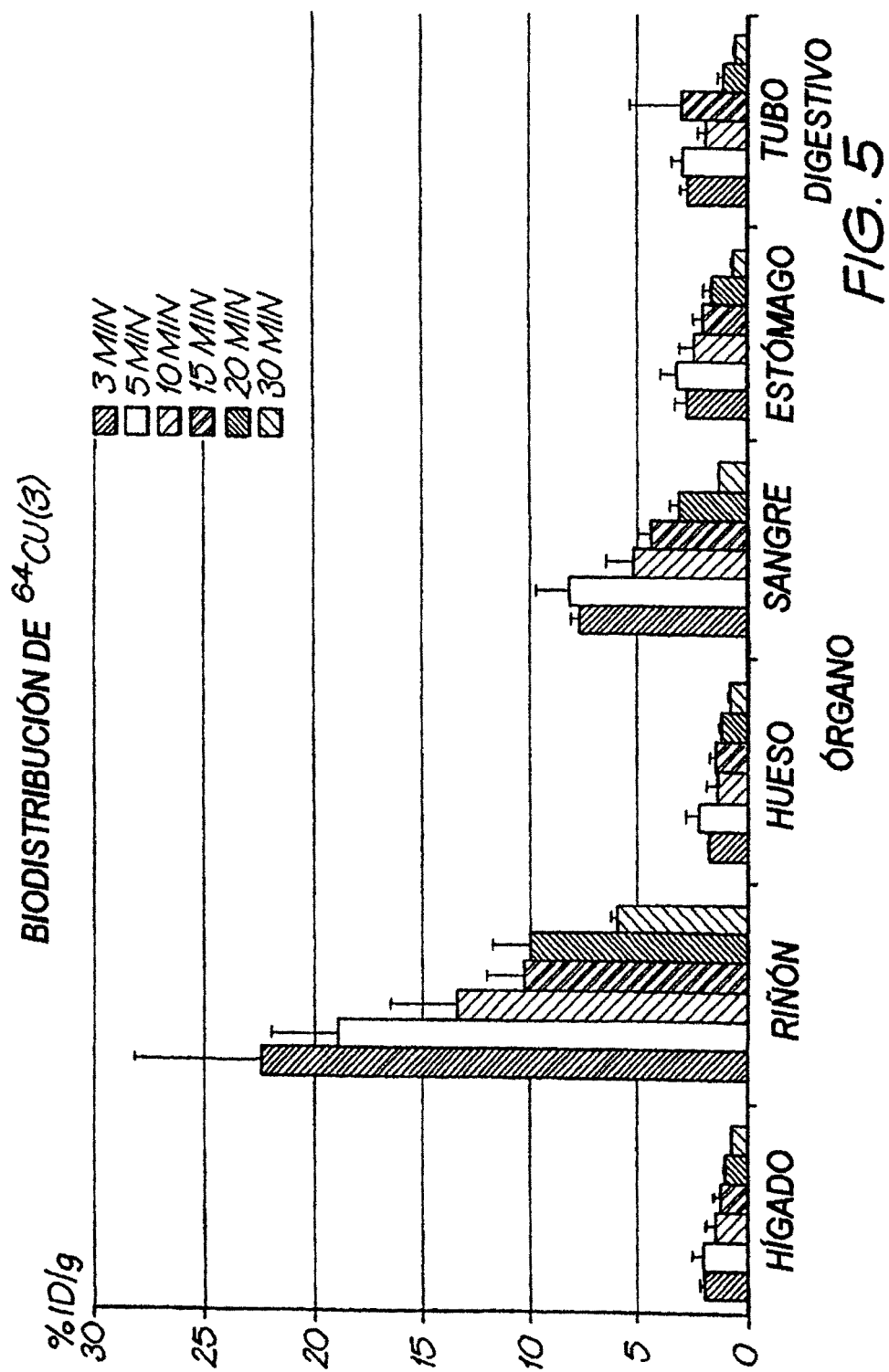


FIG. 4



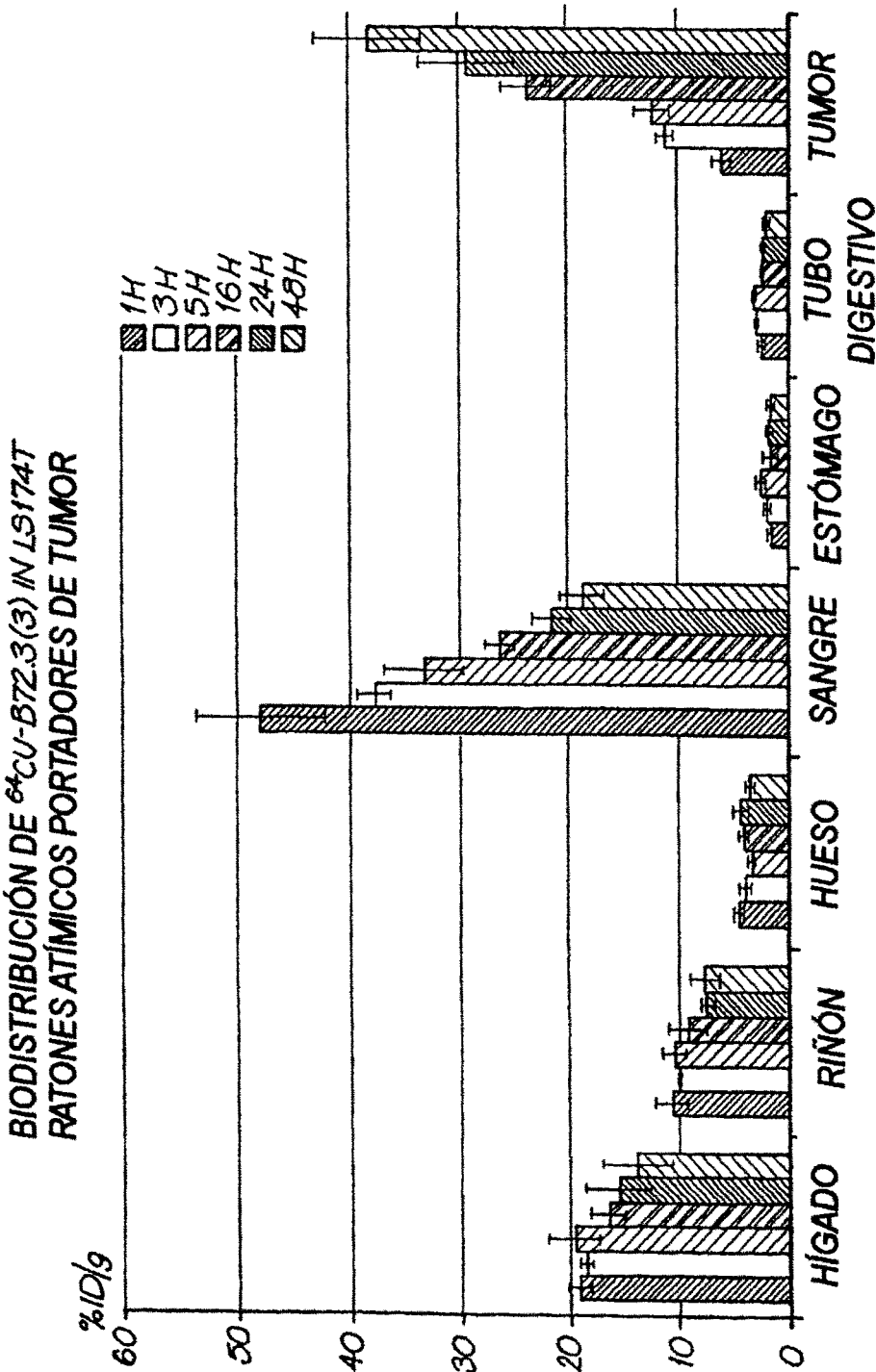


FIG. 6

