

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.05.06	(73) Titular(es): ENDOCYTE, INC.	
(30) Prioridade(s): 2002.05.06 US 378571 P	3000 KENT AVENUE WEST LAFAYETTE, IN	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.12.15	47906	US
(45) Data e BPI da concessão: 2014.04.23 119/2014	(72) Inventor(es): CHRISTOPHER PAUL LEAMON MATTHEW A PARKER	US US
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA	PT

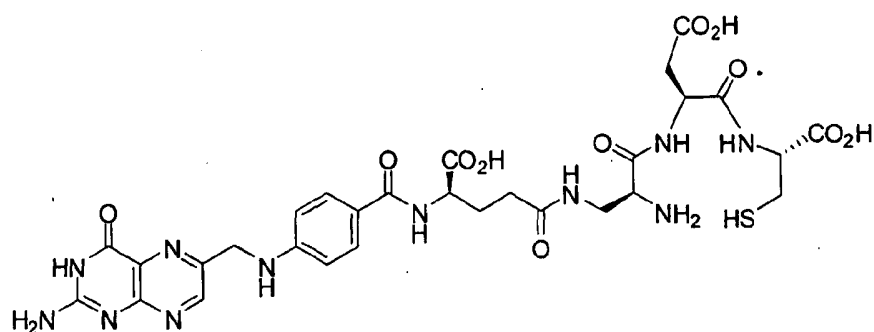
(54) Epígrafe: **AGENTES DE IMAGIOLOGIA DIRECIONADOS PARA RECETOR DE FOLATO**

(57) Resumo:

UM MÉTODO DE IMAGIOLOGIA DE UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS NUM ANIMAL, QUE COMPREENDE A ADMINISTRAÇÃO DE UMA QUANTIDADE EFICAZ DE UM COMPOSTO DA FÓRMULA QUELADO A UM CATIÃO DE UM RADIONUCLÍDEO. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS COMPOSTOS PARA A UTILIZAÇÃO NA IMAGIOLOGIA DE UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS.

RESUMO**"AGENTES DE IMAGIOLOGIA DIRECIONADOS PARA RECETOR DE FOLATO"**

Um método de imagiologia de uma população de células tumorais num animal, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um composto da fórmula



quelado a um catião de um radionuclídeo.

São também proporcionados compostos para a utilização na imagiologia de uma população de células tumorais.

DESCRIÇÃO

"AGENTES DE IMAGIOLOGIA DIRECIONADOS PARA RECETOR DE FOLATO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a compostos e métodos para direcionar um agente de imagiologia a células de um animal. Mais particularmente, agentes de imagiologia à base de radionuclídeo são direcionados a células que têm recetor para uma vitamina usando tal vitamina, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou um análogo do mesmo, como o ligando de direcionamento para o agente de imagiologia.

ANTECEDENTES E SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O transporte transmembranar é uma função celular crítica. Porque os praticantes têm reconhecido a importância do transporte transmembranar em muitas áreas da ciência biológica e médica, incluindo terapêutica com fármacos e transferência de genes, têm havido esforços significativos de investigação dirigida ao entendimento e aplicação de tais processos. Assim, por exemplo, tentou-se a administração transmembranar de ácidos nucleicos através da utilização de transportadores de proteína, transportadores de anticorpo, sistemas de administração lipossômica, eletroporação, injeção direta, fusão de células, transportadores virais, choque osmótico e transformação mediada por cálcio-fosfato. No entanto, muitas daquelas técnicas são limitadas tanto pelos tipos de células em que o transporte transmembranar ocorre, como pelas condições requeridas para transporte transmembranar bem-sucedido de moléculas exógenas. Além disso, muitas destas técnicas são limitadas pelo tipo e tamanho da molécula exógena que pode ser transportada através da membrana celular sem perda de bioatividade.

Um mecanismo para o transporte transmembranar de

moléculas exógenas que tem ampla aplicabilidade é a endocitose mediada por recetor. De maneira vantajosa, a endocitose mediada por recetor ocorre tanto *in vivo* como *in vitro*. A endocitose mediada por recetor envolve o movimento de ligandos ligados a recetor de membrana no interior de uma área ligada pela membrana através de invaginação da membrana. O processo é iniciado ou ativado pela ligação de um ligando específico do recetor ao recetor. Muitos sistemas endocitóticos mediados por recetor foram caracterizados, incluindo aqueles que resultam na internalização de galactose, manose, manose 6-fosfato, transferrina, asialoglicoproteína, folato, transcobalamina (vitamina B₁₂), α -2 macroglobulinas, insulina, e outros fatores de crescimento de péptidos, tais como fator de crescimento epidérmico (EGF).

A endocitose mediada por recetor foi utilizada para administrar moléculas exógenas, tais como proteínas e ácidos nucleicos, a células. Geralmente, um ligando específico é conjugado, quimicamente, por ligação covalente, iónica, ou hidrogénio, a uma molécula exógena de interesse, que forma uma molécula conjugada que tem uma fração (a porção de ligando) que é, ainda, reconhecida no conjugado por um recetor alvo. Usando esta técnica, a proteína fototóxica psoraleno foi conjugada com insulina e internalizada pela via endocitótica de recetor de insulina (Gasparro, Biochem. Biophys. Res. Comm. 141 (2), pp. 502-509, Dec. 15, 1986); o recetor específico de hepatócito para asialoglicoproteínas de galactose terminal foi utilizado para a administração transmembranar específica a hepatócitos de asialoorosomucoide-poli-lisina formando complexos de forma não covalente com um plasmídeo (Wu, G. Y., J. Biol. Chem., 262 (10), pp. 4429-4432, 1987); o recetor de célula para EGF foi utilizado para administrar polinucleótidos covalentemente ligados a EGF ao interior da célula (Myers, Pedido de Patente Europeia 86810614.7,

publicado em 6 de Jun., 1988); o recetor celular situado no intestino para o complexo de fator intrínseco de vitamina B₁₂ organometálica, foi usado para mediar a administração de um fármaco, uma hormona, um péptido bioativo e um imunogénio formando um complexo com vitamina B₁₂ ao sistema circulatório, após administração oral (Russell-Jones *et al.*, Pedido de Patente Europeia 86307849.9, publicado em 29 de Abril de 1987); o recetor de manose-6-fosfato foi usado para administrar lipoproteínas de densidade baixa a células (Murray, G. J. e Neville, D. M., Jr., J.Biol.Chem, Vol. 255 (24), pp. 1194-11948, 1980); o recetor da subunidade de ligação da toxina da cólera foi usado para administrar insulina a células que não possuem recetores de insulina (Roth e Maddox, J.Coll.Phys. Vol. 115, p. 151, 1983); e o recetor de gonadotropina coriónica humana foi utilizado para administrar uma cadeia a de ricina acoplada a HCG a células com o recetor de HCG apropriado (Oeltmann e Heath, J.Biol.Chem, vol. 254, p. 1028 (1979)).

Numa forma de realização, a presente invenção envolve o transporte transmembranar de um agente de imagiologia à base de radionuclídeo através de uma membrana que tem recetores para folato. Um recetor de folato que possui membrana celular recetor é colocado em contacto com um conjugado de agente de imagiologia-vitamina por um tempo suficiente para iniciar e permitir o transporte transmembranar do conjugado e é monitorizada a biodistribuição do conjugado de agente de imagiologia-vitamina no animal. Noutra forma de realização, a fração de folato simplesmente se liga a um recetor de vitamina da superfície celular, para concentrar o radionuclídeo quelado na superfície celular.

A invenção aproveita (1) a localização de recetores de vitamina e (2) os processos endocíticos mediados pelo recetor associado. Por exemplo, a invenção aproveita a expressão única, sobre-expressão ou expressão preferencial

de recetores de vitamina, transportadores ou outras proteínas apresentadas à superfície que se ligam especificamente a vitaminas, ou derivados ou análogos dos mesmos, em células tumorais ou outros tipos de célula que sobre-expressam tais recetores. Consequentemente, a invenção pode ser usada para detetar células, tais como células tumorais ou outros tipos de célula, que sobre-expressam recetores de vitamina, ou recetores para análogos ou derivados de vitamina, por meio do aproveitamento dos processos endocíticos mediados por recetor que ocorrem quando tais células são colocadas em contacto com o conjugado de agente de imagiologia-vitamina.

Os recetores de vitamina, tais como o recetor de folato de alta afinidade (FR), são expressos em níveis altos, por exemplo, em células de cancro. Relatou-se que os cancros epiteliais do ovário, glândula mamária, cólon, pulmão, nariz, garganta e cérebro todos expressam níveis elevados do FR. De facto, sabe-se que mais de 90 % de todos os tumores do ovário humano expressam quantidades grandes deste recetor. Assim, a presente invenção pode ser usada para a imagiologia de diagnóstico de uma variedade de tipos de tumor e de outros tipos de célula envolvidos em estados da doença.

Quelantes de radionuclídeo formando complexos com ligandos foram usados como sondas não invasivas para propósitos de imagiologia de diagnóstico. Por exemplo, péptido intestinal vasoativo, análogos de somatostatina e anticorpos monoclonais foram usados como ligandos para localizar radionuclídeos em células, tais como células tumorais. Anticorpos monoclonais, e vários fragmentos dos mesmos, receberam inicialmente a maior atenção porque se acreditava que o direccionamento exato específico a tumor poderia ser alcançado usando anticorpos monoclonais como ligandos de direccionamento. Infelizmente, esta abordagem foi problemática porque i) os anticorpos têm tempos de

circulação prolongados devido ao seu grande tamanho, o que é desfavorável para propósitos de imagiologia, ii) os anticorpos são caros para produzir, iii) os anticorpos podem ser imunogênicos e, conseqüentemente, precisam ser humanizados quando doses múltiplas são usadas e iv) as razões de tecido não alvo para tumor (T/NT) de radionuclídeos ligados a anticorpos são subótimas. Assim, o foco tem sido recentemente dirigido à utilização de ligandos específicos de tumor menores que não têm tais limitações.

As vitaminas, tais como ácido fólico, foram usadas para o direcionamento de agentes de imagiologia a células tumorais e são vantajosos por causa do seu tamanho pequeno. O primeiro complexo de direcionamento à base de ácido fólico descrito para a imagiologia de tumor *in vivo* foi um derivado de histamina contendo ^{125}I do. Este complexo não foi considerado um candidato clínico relevante por causa do componente de radionuclídeo ^{125}I de vida longa. Subseqüentemente, um conjugado de deferroxamina-folato para a imagiologia de tumor foi desenvolvido (quelatos de deferroxamina ^{67}Ga , um radionuclídeo que emite radiação gama que tem uma semivida de 78 horas). A depuração hepatobiliar foi notada com este conjugado e, assim, o desenvolvimento pré-clínico foi interrompido devido a problemas antecipados em se obter uma imagiologia precisa de localizações regio-abdominais. Este obstáculo foi superado, no entanto, por meio da substituição do quelante de deferroxamina com ácido dietilenotriamina penta acético (DTPA), um quelante eficaz de ^{111}In (semivida de 68 horas). A via primária de eliminação de ^{111}In -DTPA-folato foi confirmada como sendo através dos rins.

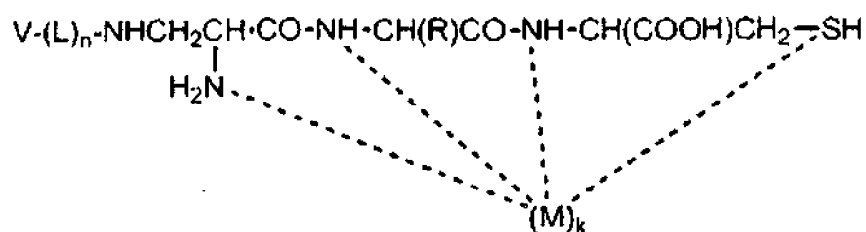
Mais recentemente, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foi adotado como o radionuclídeo preferido para a imagiologia de diagnóstico, porque i) o radionuclídeo é facilmente obtido a partir de geradores de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ comercialmente disponíveis, ii) o

custo de produção de quantidades grandes de ^{99m}Tc é insignificante, em comparação com o custo de produção de ^{111}In e iii) ^{99m}Tc tem uma semivida muito mais curta (6 horas), que permite serem administradas doses de radionuclídeo maiores, produzindo imagens de resolução mais alta sem o risco de exposição perigosa de órgãos vitais a radiação.

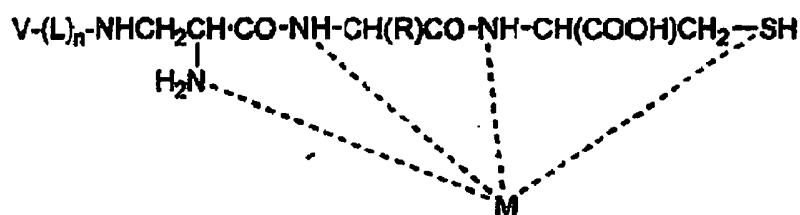
Diversos conjugados de ^{99m}Tc à base de folato foram desenvolvidos. Por exemplo, conjugados de folato de ^{99m}Tc -6-hidrazinonicotinamido-hidrazido (HYNIC; Guo, *et al.*, J. Nucl. Med., 40 (9): 1563-1569 (1999)), ^{99m}Tc -12-amino-3,3,9,9-tetrametil-5-oxa-4,8 diaza-2,10-dodecanodiona dioxima (OXA) (Linder, *et al.*, Soc. Nucl. Med., Proc. 47th Annual Meeting, 2000, 41 (5): 119P), ^{99m}Tc -etilenodicisteína (Ilgan, *et al.*, Cancer Biother. & Radiopharm., 13 (6): 427-435 (1998)), e ^{99m}Tc -DTPA-folato (Mathias, *et al.*, Bioconjug. Chem., 11 (2): 253-257 (2000)) têm mostrado qualidades prometedoras de absorção de tumor *in vivo*. No entanto, existe uma necessidade de conjugados de ^{99m}Tc à base de vitamina alternativos, ou conjugados à base de vitamina que utilizam outros radionuclídeos, que exibem razões ótimas de tecido não alvo para tumor (T/NT) e são eliminados através dos rins. Tais conjugados à base de vitamina deveriam ser adequados para o desenvolvimento clínico como agentes de imagiologia de tumor e para o diagnóstico de outros estados da doença.

A invenção refere-se a um método de imagiologia de uma população de células tumorais num animal, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um composto da fórmula

Numa divulgação é proporcionado um composto da fórmula



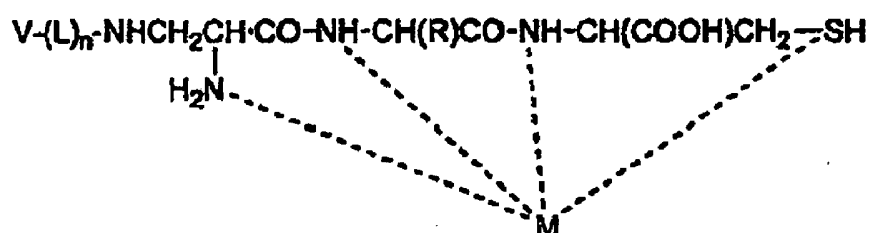
Noutra divulgação é fornecida uma composição para imagiologia de diagnóstico, que compreende um composto da fórmula



em que V é uma vitamina, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo, L é um ligante divalente, R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $\text{H}_2\text{NCHRCOOH}$, M é um catião de um radionuclídeo, n é 1 ou 0 e um transportador farmacologicamente aceitável para

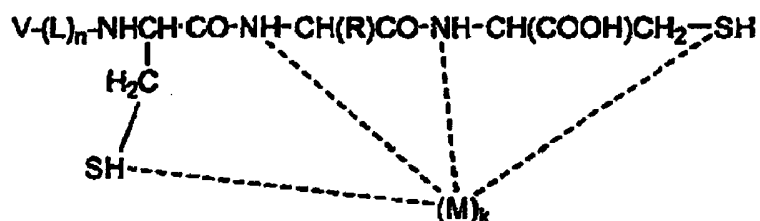
o mesmo. A vitamina é um substrato para o transporte transmembranar mediado por recetores *in vivo*.

Ainda noutra divulgação, é proporcionado um método de imagiologia de uma população de células num animal, em que as células são caracterizadas por um recetor de vitamina na superfície das células. O método compreende as etapas de administração, ao animal, de uma quantidade eficaz de uma composição que compreende um composto da fórmula



em que V é uma vitamina, ou um derivado de ligação a recetor ou um análogo do mesmo, específico para o recetor de vitamina da superfície da célula, L é um ligante divalente, R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $\text{H}_2\text{NCHRCOOH}$, M é um catião de um radionuclídeo, n é 1 ou 0 e um transportador farmacêuticamente aceitável para o mesmo e de monitorização da biodistribuição do composto no animal.

Noutra divulgação é proporcionado um composto da fórmula



em que V é uma vitamina que é um substrato para o transporte transmembranar mediado por recetores *in vivo*, ou derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo, L é um ligante divalente, R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $\text{H}_2\text{NCHRCOOH}$, M é um catião de um radionuclídeo, n é 1 ou 0 e k é 1 ou 0.

Em qualquer destas divulgações, V no composto pode

ser, por exemplo, uma vitamina selecionada a partir do grupo que consiste em folato, riboflavina, tiamina, vitamina B₁₂ e biotina ou um derivado ou análogo do mesmo. Em qualquer um destes aspetos ou divulgações, o radionuclídeo no composto pode ser selecionado, por exemplo, a partir do grupo que consiste em radioisótopos de gálio, índio, cobre, tecnécio e rénio.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Fig. 1. Estrutura de EC20, um composto exemplar usado como um agente de imagiologia, de acordo com a invenção.

Fig. 2. Radiocromatograma de HPLC de ^{99m}Tc-EC20. As amostras de ^{99m}Tc-EC20 foram eluídas de forma isocrática numa coluna Waters Nova-Pak C18 (3,9 x 150 mm) usando uma fase móvel aquosa contendo 20 % de metanol e 0,2 % de ácido trifluoroacético numa taxa de fluxo de 1 ml/min. A análise de HPLC foi monitorizada tanto com o detetor de UV (280 nm) como com um radiodetetor Bioscan FC-3200. Pico A, ^{99m}Tc livre; Pico B, um quelato contendo folato de estrutura desconhecida; Picos C e D, diastereómeros que possuem uma configuração *syn* ou *anti* da ligação de oxigénio-tecnécio no anel de quelação Dap-Asp-Cys de EC20.

Fig. 3. Estruturas de isómeros de Re-EC20 e ^{99m}Tc-EC20 (posição *syn* ou *anti* de ligação de metal-oxo).

Fig. 4. Bloqueio de ligação de ³H-ácido fólico a células KB com vários competidores contendo folato. As células KB foram incubadas durante 15 min em gelo com 100 nM de ³H-ácido fólico na presença e ausência de concentrações crescentes de competidor. (•) Ácido fólico; (■) EC20; (▲) EC20:isómero Re A; (▼) EC20:isómero Re B; (◻) DTPA-Folato. Barras de erro representam 1 desvio padrão (n = 3).

Fig. 5. Associação dependente do tempo de ^{99m}Tc-EC20. As células KB foram incubadas com 10 nM de ^{99m}Tc-EC20 por períodos crescentes de tempo a 37 °C. Em seguida às

lavagens múltiplas, as células foram colhidas e contadas para radioatividade associada. Barras de erro representam 1 desvio padrão ($n = 3$).

Fig. 6. Associação dependente da concentração de ^{99m}Tc -EC20. As células KB foram incubadas durante 2 h a 37 °C na presença de concentrações crescentes de ^{99m}Tc -EC20. Em seguida às lavagens múltiplas, as células foram colhidas e contadas para radioatividade associada. Barras de erro representam 1 desvio padrão ($n = 3$).

Fig. 7. Associação dependente da concentração de ^{99m}Tc -EC20 "pico B". As células KB foram incubadas durante 2 h a 37 °C na presença de concentrações crescentes de "Pico B" que foi cromatograficamente isolado a partir da formulação de ^{99m}Tc -EC20. Em seguida às lavagens múltiplas, as células foram colhidas e contadas para radioatividade associada. Barras de erro representam 1 desvio padrão ($n = 3$). (•), Pico B; (°), Pico B mais 1 mM de ácido fólico.

Fig. 8. Depuração sanguínea de ^{99m}Tc -EC20 em ratinhos Balb/c. Cada animal recebeu uma dose intravenosa de 50 µg/kg de EC20 (67 nmol/kg) em aproximadamente 0,1 ml durante breve anestesia com dietil éter. Nos tempos designados após a injeção, cada animal foi submetido a eutanásia por asfixia com CO₂, o sangue foi colhido e contado para radioatividade associada. Barras de erro representam 1 desvio padrão ($n = 3$ animais).

Fig. 9. Imagens de radiação gama de corpo inteiro (vista ventral). As imagens foram obtidas 4 h depois da administração intravenosa de ^{99m}Tc -EC20 a um ratinho Balb/c que possui um recetor subcutâneo de tumor M109 folato-positivo. Somente os rins (K) e tumor (T) exibem acumulação significativa deste radiorastreador.

Fig. 10. Estruturas de EC11, EC13, EC14, EC15, EC19, EC20, EC31 e EC53.

Fig. 11. Distribuição de tecido de ^{99m}Tc -EC20 em ratinhos

Balb/c que possuem tumores M109 FR-positivos e tumores 4T1 FR-negativos.

Fig. 12. Análise de HPLC de EC11.

Fig. 13. Análise de espectroscopia de massa de EC11.

Fig. 14. Análise de RMN de EC 11.

Fig. 15. Análise de HPLC de EC 13.

Fig. 16. Análise de RMN de EC14.

Fig. 17. Análise de espectroscopia de massa de EC 15.

Fig. 18. Análise de HPLC de EC19.

Fig. 19. Análise de espectroscopia de massa de EC 19.

Fig. 20. Análise de HPLC de EC31.

Fig. 21. Análise de HPLC de EC53.

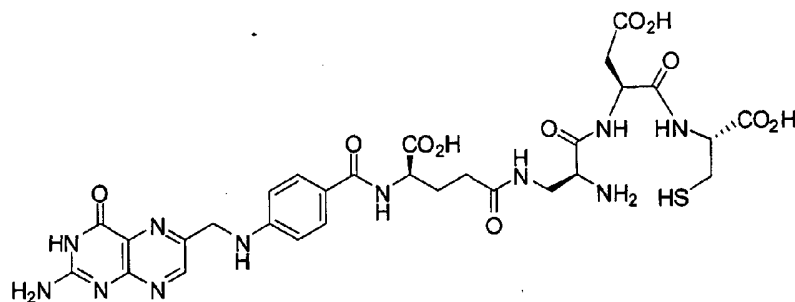
Fig. 22. Análise de espectroscopia de massa de EC53.

Fig. 23. Análise de espectroscopia de massa de EC53.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

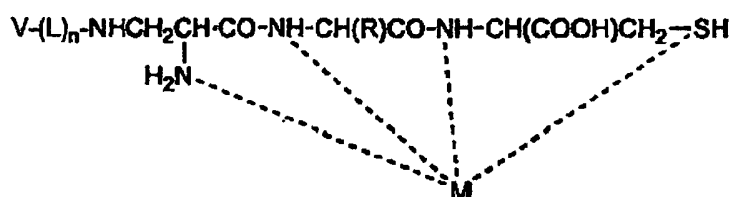
De acordo com a divulgação, são proporcionados métodos para direcionar agentes de imagiologia à base de radionuclídeo a populações de células que expressam unicamente, sobre-expressam ou, preferivelmente, expressam recetores de vitamina. Consequentemente, uma vitamina, ou derivado de ligação a recetor ou um análogo da mesma, é usada como o ligando de direcionamento para o agente de imagiologia. O conjugado de agente de imagiologia-vitamina pode ser usado para direcionar os radionuclídeos alvo a células e para concentrar os radionuclídeos numa população de células, tal como uma população de células tumorais, para utilização em imagiologia de diagnóstico.

A invenção refere-se a um método de imagiologia de diagnóstico de uma população de células tumorais num animal, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um composto da fórmula

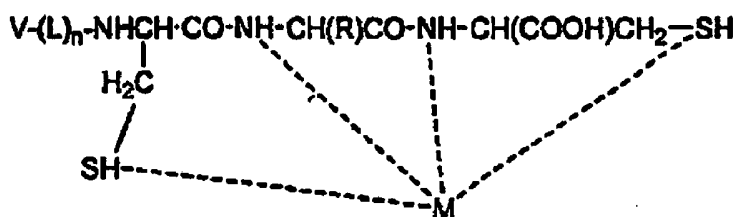


quelado a um catião de um radionuclídeo.

O pedido divulga uma composição para a imagiologia de diagnóstico que compreende um composto da fórmula

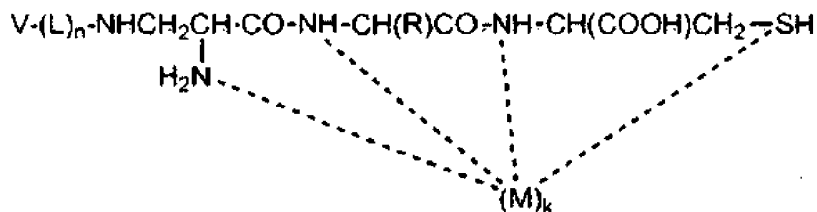


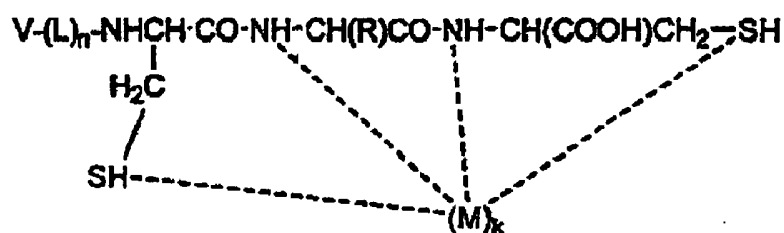
e



para utilização em tais métodos. No composto, V é uma vitamina, ou derivado de ligação a recetor de vitamina ou um análogo do mesmo, L é um ligante divalente, R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $H_2NCH(R)COOH$, M é um catião de um radionuclídeo e n é 1 ou 0. A vitamina, ou o derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo é um substrato para o transporte transmembranar mediado por recetores *in vivo*.

O pedido também divulga compostos das fórmulas





em que V é uma vitamina, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou um análogo do mesmo, L é um ligante divalente, R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $H_2NCHRCOOH$, M é um catião de um radionuclídeo, n é 1 ou 0 e k é 1 ou 0. A vitamina é um substrato para o transpor transmembrantar mediado por recetores *in vivo*.

Um exemplo destes compostos é um composto denominado como EC20 representado na Fig. 1. Exemplos de outros compostos para utilização de acordo com esta divulgação são compostos denominados como EC11, EC13, EC14, EC15, EC19, EC31 e EC53 (veja-se Fig. 10). A fração de vitamina (por exemplo, a fração de ácido fólico em EC20) proporciona ligação de alta afinidade a FRs celulares. Os compostos também contêm um quelante à base de péptido bifuncional, que proporciona o local para a quelação do radionuclídeo, por exemplo, ^{99m}Tc (veja-se Fig. 1), e os compostos podem, opcionalmente, conter um ligante através do qual a fração de vitamina é covalentemente ligada à fração quelante.

De acordo com a invenção, a fração de vitamina do composto é uma vitamina que é um substrato para transporte transmembranar mediado por recetores *in vivo*, ou derivado de ligação a recetor de vitamina ou um análogo do mesmo. A vitamina nas divulgações acima é ligada, opcionalmente, através de um ligante (L) à porção de quelante dos compostos. Na invenção, e como mostrado na Fig. 1, EC20 compreende um análogo do ácido fólico ligado a uma fração do quelante, porque EC20 tem o ácido glatâmico na configuração D. A porção de quelante compreende uma fração

de ácido α,β -diaminopropiônico ligada a um grupo cisteína através de um terceiro resíduo de aminoácido. A porção de quelante do composto é adaptada para se ligar a um catião de radionuclídeo (M) (onde $k = 1$).

De acordo com a invenção, o composto com radionuclídeo ligado é denominado como "conjugado de agente de imagiologia-vitamina."

A estrutura do ligante, se estiver presente, não é crítica para as divulgações acima. Assim, por exemplo, pode ser qualquer ligante divalente biocompatível. Tipicamente, o ligante compreende cerca de 1 a cerca de 30 átomos de carbono, mais tipicamente cerca de 2 a cerca de 20 átomos de carbono. Ligantes de peso molecular mais baixo (isto é, aqueles que têm um peso molecular aproximado de cerca de 30 a cerca de 300) são tipicamente utilizados. Além disso, a fração de vitamina pode ser uma vitamina, ou um derivado ou análogo do mesmo. Por exemplo, o folato contém um ácido glutâmico na configuração L ligado a ácido pteróico. EC11 e EC 14 contêm dois resíduos de ácido glutâmico e, assim, estes compostos podem também, por exemplo, ser considerados derivados de ácido fólico (Fig. 10).

Entre as vitaminas que se acredita desencadearem a endocitose mediada por recetor e com aplicação de acordo com o método presentemente divulgado estão a niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina, tiamina, biotina, vitamina B₁₂ e as vitaminas solúveis em lípidos A, D, E e K. Estas vitaminas e os seus análogos e derivados constituem vitaminas que podem ser acopladas com agentes de imagiologia para formar conjugados vitamina-quelante para utilização de acordo com a invenção. As frações de vitamina preferidas incluem ácido fólico, biotina, riboflavina, tiamina, vitamina B₁₂ e análogos e derivados destas moléculas de vitamina e outras moléculas de ligação a recetor de vitamina relacionadas.

Ácido fólico, ácido folínico, ácido pteróico, ácido

pteropoliglutâmico e pteridinas de ligação a recetor de folato, tais como tetraidropterinas, diidrofolatos, tetraidrofolatos e os seus análogos de deaza e dideaza podem ser usados de acordo com as divulgações acima. Os termos análogos de "deaza" e "dideaza" referem-se aos análogos de folato reconhecidos na especialidade que têm um átomo de carbono substituído por um ou dois átomos de azoto na estrutura de ácido fólico de ocorrência natural. Por exemplo, os análogos de deaza incluem os análogos de 1-deaza, 3-deaza, 5-deaza, 8-deaza e 1,0-deaza. Os análogos de dideaza incluem, por exemplo, análogos de 1,5 dideaza, 5,10-dideaza, 8,10-dideaza e 5,8-dideaza. Os anteriores são análogos ou derivados de folato e podem ligar-se a recetores de folato. Outros análogos ou derivados de folato úteis, de acordo com as divulgações acima, são os análogos de ligação a recetor de folato aminopterina, ametopterina (metotrexato), N¹⁰-metilfolato, 2-deamina-hidroxifolato, análogos de deaza, tais como 1-deazametopterina ou 3-deazametopterina e ácido 3',5'-dicloro-4-amina-4-deoxi-N¹⁰-metilpteroilglutâmico (diclorometotrexato).

A vitamina, ou derivado ou análogo do mesmo, pode ser capaz de se ligar seletivamente à população de células a ser visualizada devido a expressão preferencial nas células alvo de um recetor para a vitamina, ou derivado ou análogo, em que o recetor é acessível para ligação. O local de ligação para a vitamina pode incluir recetores para qualquer molécula de vitamina capaz de se ligar especificamente a um recetor, em que o recetor ou outra proteína é unicamente expresso, sobre-expresso ou, preferivelmente, expresso pela população de células a ser visualizada. Uma proteína apresentada na superfície unicamente expressa, sobre-expressa ou, preferivelmente, expressa pelas células a serem visualizadas é um recetor que não está presente ou que está presente em quantidades mais baixas noutras células que proporcionam um meio para a

visualização seletiva, rápida e sensível das células alvo para imagiologia de diagnóstico usando os conjugados de agente de imagiologia-vitamina da presente invenção.

De acordo com a invenção o conjugado de agente de imagiologia-vitamina é capaz de se ligar com alta afinidade a recetores em células de cancro ou outras células a serem visualizadas. A ligação de alta afinidade pode ser inerente à fração de vitamina ou a afinidade de ligação pode ser aumentada pela utilização de uma vitamina quimicamente modificada (isto é, um análogo ou um derivado) ou pela ligação química particular entre vitamina e a fração de quelante que está presente no conjugado.

De acordo com a divulgação, o quelante pode ser conjugado com múltiplas diferentes vitaminas, ou derivados de ligação a recetor de vitamina ou análogos, para aumentar a oportunidade de ligação aos respetivos recetores de membrana celular. Alternativamente, as porções independentes da dose de um conjugado de agente de imagiologia-vitamina podem constituir diferentes conjugados de agente de imagiologia-vitamina para aumentar a oportunidade de ligação aos respetivos recetores de membrana celular.

Geralmente, qualquer maneira de formar um complexo entre o quelante e a vitamina, ou derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo, pode ser utilizada de acordo com as presentes divulgações. O quelante pode formar um complexo com a vitamina, ou derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo, por conjugação direta do quelante e da vitamina, usando um ligante divalente. Alternativamente, a vitamina e o quelante podem ser conjugados sem que se utilize um ligante. Se um ligante for usado, o ligante pode diretamente conjugar a vitamina, ou derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo, e o quelante, através de uma ligação de hidrogénio, iónica ou covalente. Também, de acordo com as divulgações acima, o

ligante divalente pode compreender um meio indireto para associar o quelante com a vitamina, ou derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo, tal como por meio da ligação através de ligantes intermediários, braços espaçadores ou moléculas ponte. Tanto o meio direto como o indireto para a associação precisa, não previnem a ligação da vitamina, ou derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo, ao recetor de vitamina na membrana celular para operação do método da presente invenção.

A ligação covalente da vitamina, ou análogo ou derivado de ligação a recetor de vitamina, e o quelante pode ocorrer, se for utilizado, ou não, um ligante, através da formação de ligações de amida, éster ou imino entre grupos de ácido, aldeído, hidroxil, amino ou hidrazo. Por exemplo, um ácido carboxílico na fração de vitamina ou no quelante pode ser ativado usando carbonildiidimidazol ou reagentes de acoplamento de carbodiimida padrão, tais como 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida (EDC) e depois disso feito reagir com o outro componente do conjugado, ou com um ligante, que tem pelo menos um grupo nucleofílico, nomeadamente hidroxil, amino, hidrazo ou tiol, para formar o conjugado de vitamina-quelante acoplado, com ou sem um ligante, através de ligações de éster, amida ou tioéster.

Os radionuclídeos adequados para a imagiologia de diagnóstico incluem radioisótopos de gálio, índio, cobre, tecnécio e rénio, incluindo isótopos ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga ou ^{68}Ga . Estes radionuclídeos são catiónicos e formam complexos com o quelante através do grupo quelante do conjugado para formar o conjugado de agente de imagiologia-vitamina.

O conjugado de agente de imagiologia-vitamina, de acordo com a invenção, é utilizado para visualizar seletivamente, usando técnicas de imagiologia cintilográficas, uma população de células num animal, em

que a população de células unicamente expressa, sobre-expressa ou, preferivelmente, expressa recetores para vitamina, ou derivado de ligação a recetor de vitamina ou um análogo do mesmo. O conjugado de agente de imagiologia-vitamina pode ser usado para visualizar populações de células patogénicas, contanto que as células unicamente ou preferivelmente expressem ou sobre-expressem recetores de vitamina ou recetores que se ligam a derivados de vitamina ou análogos.

A invenção é aplicável a populações de células patogénicas que causam uma variedade de patologias incluindo cancro e doenças mediadas por qualquer outro tipo de células patogénicas que sobre-expressem recetores de vitamina ou recetores capazes de se ligarem a derivados de vitamina ou análogos. Assim, a população de células patogénicas é tumorigénica, incluindo tumores benignos e tumores malignos. A população de células é uma população de células de cancro e as células de cancro pode surgir espontaneamente ou por tais processos como mutações presentes na linha germinal do animal hospedeiro ou mutações somáticas, ou o cancro pode ser induzido quimicamente, viralmente ou por radiação. A invenção pode ser utilizada para a imagiologia de diagnóstico de tais cancros como carcinomas, sarcomas, linfomas, doença de Hodgkin, melanomas, mesoteliomas, linfoma de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos e mielomas. A população de células de cancro pode incluir, mas não está limitada a, cancro oral, nasofaríngeo, tiroide, endócrino, de pele, gástrico, esofágico, laríngeo, de garganta, pancreático, de cólon, de bexiga, ósseo, do ovário, do colo do útero, uterino, de mama, testicular, de próstata, retal, de rim, fígado, pulmão e cérebro. Em formas de realização onde a população de células é uma população de células de cancro, as células tumorais, incluindo células do tumor primário ou células que estão em metástase ou estão no processo dissociação do

tumor primário, podem ser visualizadas usando o conjugado de agente de imagiologia-vitamina.

Os conjugados de agente de imagiologia-vitamina da presente divulgação podem ser usados para diagnosticar um estado da doença ou para monitorizar a progressão da doença. Por exemplo, o método de imagiologia de diagnóstico de acordo com a divulgação pode ser usado para monitorizar a progressão de cancro em combinação com tratamentos profiláticos para prevenir o retorno de um tumor após a sua remoção por qualquer abordagem terapêutica incluindo remoção cirúrgica do tumor, radioterapia, quimioterapia ou terapia biológica.

O método da presente invenção pode ser usado tanto para aplicações em medicina clínica humana como veterinária. Assim, o animal que alberga a população de células que são visualizadas pode ser humano ou, no caso de aplicações veterinárias, pode ser um animal de laboratório, pecuário, doméstico ou selvagem. A presente invenção pode ser aplicada a animais incluindo, mas não limitados a, seres humanos, animais de laboratório, tais como roedores (por exemplo, ratinhos, ratos, hamsters, etc.), coelhos, macacos, chimpanzés, a animais domésticos, tais como cães, gatos e coelhos, a animais pecuários, tais como vacas, cavalos, porcos, ovelha, cabras e a animais selvagens em cativeiro, tais como ursos, pandas, leões, tigres, leopardos, elefantes, zebras, girafas, gorilas, golfinhos e baleias.

As composições para imagiologia de diagnóstico compreendem uma quantidade do conjugado de agente de imagiologia-vitamina eficaz para visualizar as células alvo para imagiologia de diagnóstico num animal quando administrado numa ou mais doses. A composição de imagiologia de diagnóstico contendo o conjugado de agente de imagiologia-vitamina é preferencialmente administrada ao animal por via parentérica, por exemplo, por via

intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou intratecal. Alternativamente, a composição contendo o conjugado de agente de imagiologia-vitamina pode ser administrado ao animal por outros processos medicamente úteis e qualquer dose eficaz e forma farmacêutica adequada podem ser usadas, incluindo formas farmacêuticas orais e de inalação.

Exemplos de formas farmacêuticas parentéricas incluem soluções aquosas do conjugado de agente de imagiologia-vitamina em solução salina isotônica, glicose a 5 % ou outros transportadores líquidos farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos, tais como álcoois, glicóis, ésteres e amidas líquidas. A forma farmacêutica parentérica, de acordo com esta invenção, pode estar na forma de um liofilizado reconstituível que compreende a dose do conjugado de agente de imagiologia-vitamina.

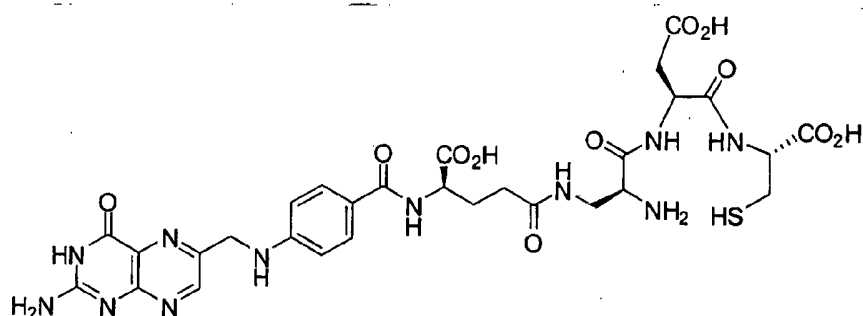
A dosagem do conjugado de agente de imagiologia-vitamina na composição de imagiologia de diagnóstico pode variar significativamente, dependendo do tamanho do animal, da população de células alvo para imagiologia de diagnóstico, do conjugado de agente de imagiologia-vitamina específico a ser usado e da via de administração do conjugado. A quantidade eficaz a ser administrada ao animal baseia-se na área de superfície corporal, peso e avaliação da condição do animal pelo médico. Uma dose eficaz pode variar de cerca de 1 ng/kg a cerca de 1 mg/kg, mais preferencialmente de cerca de 100 ng/kg a cerca de 500 µg/kg, e mais preferencialmente de cerca de 100 ng/kg a cerca de 25 µg/kg.

Qualquer regime eficaz para administrar a composição de imagiologia de diagnóstico contendo a conjugado de agente de imagiologia-vitamina pode ser usado. Por exemplo, a composição de imagiologia de diagnóstico pode ser administrada como uma dose única ou pode ser administrada em doses múltiplas, se for necessário, para alcançar a

visualização da população de células alvo. Injeções adicionais da composição de imagiologia de diagnóstico contendo o conjugado de agente de imagiologia-vitamina podem ser administradas ao animal num intervalo de dias ou meses após a(s) injeção(ões) inicial(is), e as injeções adicionais podem ser úteis para monitorizar o progresso do estado da doença. A composição de imagiologia de diagnóstico contendo o conjugado de agente de imagiologia-vitamina pode também ser administrada em combinação com vitamina não marcada. "Em combinação com" significa que a vitamina não marcada pode ser ou coadministrada com o agente de imagiologia ou a vitamina não marcada pode ser pré-injetada antes da administração do agente de imagiologia para melhorar a qualidade da imagem. Por exemplo, o agente de imagiologia pode ser administrado em combinação com cerca de 0,5 ng/kg a cerca de 100 mg/kg, ou cerca de 1 µg/kg a cerca de 100 mg/kg, ou cerca de 100 µg/kg a cerca de 100 mg/kg da vitamina não marcada.

A composição de imagiologia de diagnóstico é tipicamente formulada para administração parentérica e é administrada ao animal numa quantidade eficaz para possibilitar a imagiologia da população de células alvo. Tipicamente, a composição de imagiologia de diagnóstico que contém o agente de imagiologia direcionado a vitamina é administrado ao animal e, após um período de tempo para permitir a administração e concentração do conjugado de agente de imagiologia-vitamina na população de células alvo, o animal é submetido ao procedimento de imagiologia e a imagiologia é possibilitada pelo conjugado de agente de imagiologia-vitamina. Quando usado para monitorizar a progressão de doença ou diagnóstico, os procedimentos de imagiologia são tipicamente levados a cabo cerca de 1 a cerca de 6 horas após a administração da composição de imagiologia de diagnóstico que contém o conjugado de agente de imagiologia-vitamina.

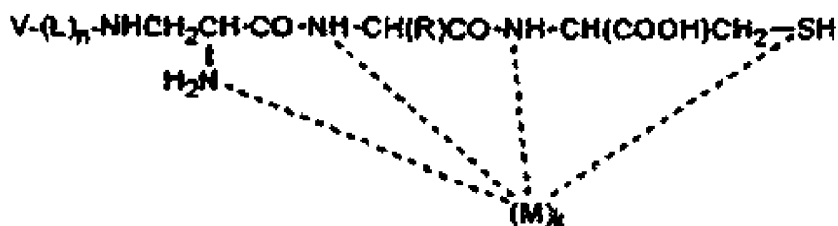
Como mencionado acima, a invenção proporciona um método de imagiologia de uma população de células tumorais num animal, em que as células são caracterizadas por um recetor de vitamina na superfície das células. O método compreende as etapas de administração ao animal de uma quantidade eficaz de uma composição que compreende um composto da fórmula



O método pode ser usado para formar a imagem de uma população de células *in vitro*, por exemplo, em cultura de células, ou *in vivo*, onde as células formam parte de, ou, de outro modo, existem no tecido animal. Assim, as células alvo podem incluir, por exemplo, as células que foram o trato digestivo, tal como a mucosa oral e faríngea, as células que formam as vilosidades do intestino delgado, ou as células que foram o intestino grosso. Tais células do trato digestivo podem ser um alvo, de acordo com esta invenção, por meio da administração oral de uma composição de imagiologia de diagnóstico que compreende o conjugado de agente de imagiologia-vitamina. De maneira similar, as células que foram o sistema respiratório (passagens nasais/pulmões) de um animal podem ser um alvo pela inalação dos presentes complexos, e células de órgãos internos, incluindo células dos ovários e o cérebro pode ser um alvo, particularmente, por administração parentérica da composição de imagiologia de diagnóstico.

O pedido também divulga:

1. Um composto da fórmula



em que V é uma vitamina que é um substrato para o transporte transmembranar mediado por recetores *in vivo*, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo;

L é um ligante divalente;

R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $\text{H}_2\text{NCHRCOOH}$;

M é um catião de um radionuclídeo;

n ou 1 ou 0; e

k é 1 ou 0.

2. O composto de 1, em que V é uma vitamina selecionada a partir do grupo que consiste em folato, riboflavina, tiamina, vitamina B₁₂ e biotina, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo.

3. O composto de 1, em que o radionuclídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em isótopos de gálio, índio, cobre, tecnécio e rénio.

4. O composto de 3, em que o radionuclídeo é um isótopo de tecnécio.

5. O composto de 1, em que V é folato, ou um análogo de ligação a recetor de folato de derivado do mesmo.

6. Uma composição para imagiologia de diagnóstico que compreende um composto da fórmula



em que V é uma vitamina que é um substrato para o transporte transmembranar mediado por recetores *in vivo*, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo;

L é um ligante divalente;

R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $H_2NCHRCOOH$;

M é um catião de um radionuclídeo;

n ou 1 ou 0; e

um transportador farmacêuticamente aceitável para o mesmo;

7. A composição de 6, em que V, no composto, é uma vitamina selecionada a partir do grupo que consiste em folato, riboflavina, tiamina, vitamina B₁₂ e biotina, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo.

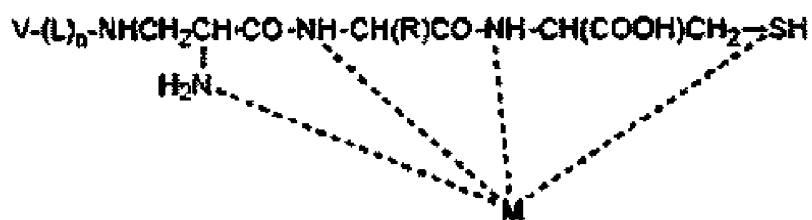
8. A composição de 6, em que o radionuclídeo, no composto, é selecionado a partir do grupo que consiste em isótopos de gálio, índio, cobre, tecnécio e rénio.

9. A composição de 8, em que o radionuclídeo no composto é um isótopo de tecnécio.

10. A composição de 6 adaptada para administração parentérica.

11. O composto de 6, em que V é folato ou um análogo de ligação a recetor de folato ou derivado do mesmo.

12. Um método de imagiologia de uma população de células num animal, em que as ditas células são caracterizadas por um recetor de vitamina na superfície das ditas células, compreendendo o método as etapas de administrar ao animal uma quantidade eficaz de uma composição que compreende um composto da fórmula



em que V é a vitamina, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo, específico para o dito recetor de vitamina de superfície celular;

L é um ligante divalente;

R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $\text{H}_2\text{NCBRCOOH}$;

M é um catião de um radionuclídeo;

n ou 1 ou 0; e

um transportador farmacologicamente aceitável para o mesmo; e de monitorizar a biodistribuição do dito composto no animal;

13. O método de 12, em que V, no composto, é uma vitamina selecionada a partir do grupo que consiste em folato, riboflavina, tiamina, vitamina B_{12} e biotina, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo.

14. O método de 12, em que o radionuclídeo no composto é selecionado a partir do grupo que consiste em isótopos de gálio, índio, cobre, tecnécio e rénio.

15. O método de 14, em que o radionuclídeo no composto é um isótopo de tecnécio.

16. O método de 12, em que a composição é administrada por via parentérica ao paciente.

17. O composto de 12, em que V é folato, ou um análogo de ligação a recetor de folato ou derivado do mesmo.

18. Um composto da fórmula



em que V é uma vitamina que é um substrato para o transporte transmembranar mediado por recetores *in vivo*, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo;

L é um ligante divalente;

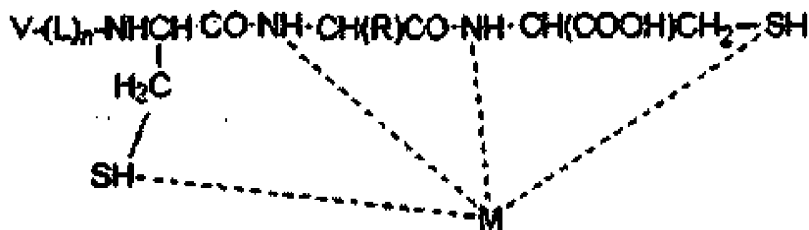
R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $\text{H}_2\text{NCHRCOOH}$;

M é um catião de um radionuclídeo;

n ou 1 ou 0; e

k é 1 ou 0.

19. Uma composição para imagiologia de diagnóstico que compreende um composto da fórmula



em que V é uma vitamina que é um substrato para o transporte transmembranar mediado por recetores *in vivo*, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo;

L é um ligante divalente;

R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $\text{H}_2\text{NCH(R)COOH}$;

M é um catião de um radionuclídeo;

n ou 1 ou 0; e

um transportador farmacêuticamente aceitável para o mesmo.

20. Um método de imagiologia de uma população de células

num animal, em que as ditas células são caracterizadas por um recetor de vitamina na superfície das ditas células, compreendendo o método as etapas de administrar ao animal uma quantidade eficaz de uma composição que compreende um composto da fórmula



em que V é a vitamina, ou um derivado de ligação a recetor de vitamina ou análogo do mesmo, específico para o dito recetor de vitamina de superfície celular,

L é um ligante divalente;

R é uma cadeia lateral de um aminoácido da fórmula $H_2NCHRCOOH$;

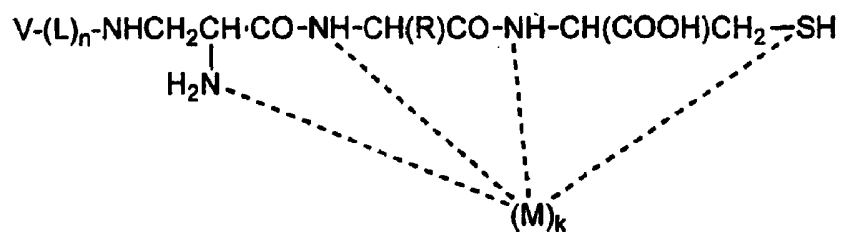
M é um catião de um radionuclídeo;

n ou 1 ou 0; e

um portador farmacêuticamente aceitável para o mesmo; e monitorizar a biodistribuição do dito composto no animal.

São ainda divulgados:

1A. Uma utilização de um composto da fórmula



em que V é um folato, em que o folato é um substrato para o transporte transmembranar mediado por recetores *in vivo*, ou um derivado de ligação a recetor de folato ou análogo do mesmo;

L é um ligante divalente;

R é uma cadeia lateral de um aminoácido;

M é um catião de um radionuclídeo;

n é 1 ou 0; e

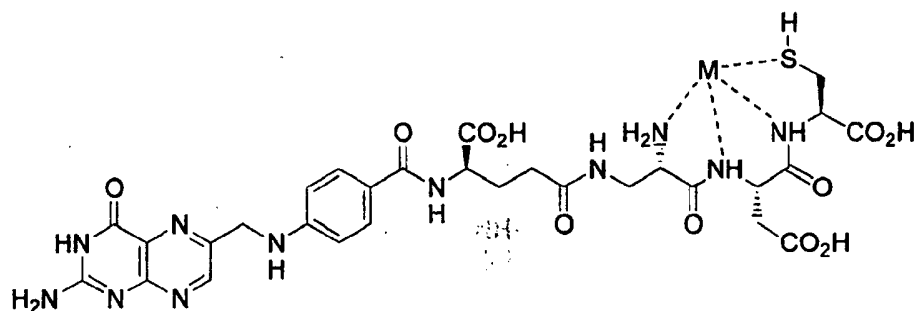
k é 1 ou 0;

para a imagiologia de diagnóstico de uma população de células num animal pré-injetado com folato não marcado.

2A. A utilização de 1A, em que o radionuclídeo, no composto, é selecionado a partir do grupo que consiste em isótopos de gálio, índio, cobre, tecnécio e rénio.

3A. A utilização de 1A ou 2A, em que o radionuclídeo no composto é um isótopo de tecnécio.

4A. A utilização de qualquer um de 1A a 3A, em que o composto tem a fórmula



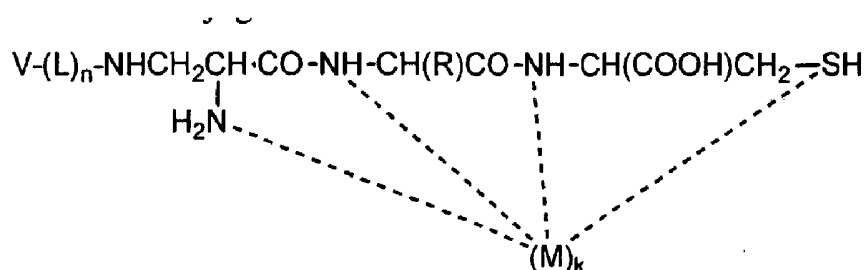
5A. A utilização de qualquer um de 1A a 4A, em que a população de células no animal é uma população de células tumorais.

6A. A utilização de 5A, em que as células tumorais são células tumorais de ovário.

7A. A utilização de qualquer um de 1A a 6A, em que o composto está numa forma farmacêutica parentérica selecionada a partir do grupo que consiste numa forma farmacêutica intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e intratecal.

8A. A utilização de 7A, em que a forma farmacêutica é uma forma farmacêutica intravenosa.

9A. Um conjugado da fórmula



e um transportador farmacêuticamente aceitável do mesmo;
 em que V é um folato, em que o folato é um substrato para o transporte transmembranar mediado por recetores *in vivo*, ou um derivado de ligação a recetor de folato ou análogo do mesmo;

L é um ligante divalente;

R é uma cadeia lateral de um aminoácido;

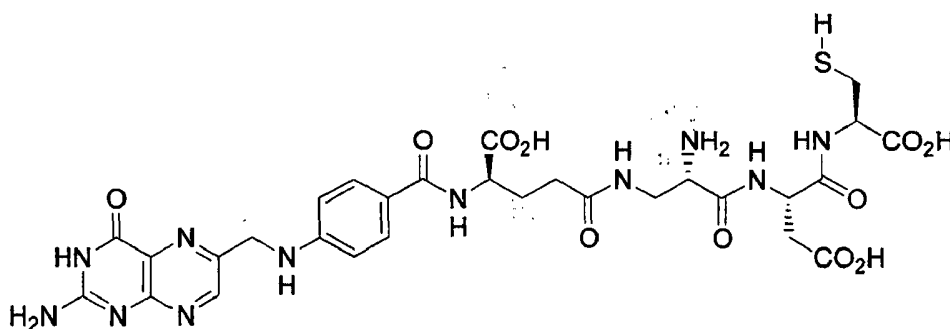
M é um catião de um radionuclídeo;

n é 1 ou 0; e

k é 1 ou 0;

em combinação com um folato não marcado.

10A. A combinação de 9A, em que o conjugado tem a fórmula



11A. A combinação de 9A ou 10A, em que um catião de um radionuclídeo é ligado ao conjugado, onde o radionuclídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em isótopos de gálio, índio, cobre, tecnécio e rénio.

12A. A combinação de qualquer um de 9A a 11A, em que o radionuclídeo é um isótopo de tecnécio.

13A. A combinação de qualquer um de 9A a 12A, em que o conjugado está numa forma farmacêutica adaptada para administração parentérica.

14A. A combinação de 13A, em que a forma farmacêutica é selecionada a partir do grupo que consiste numa forma farmacêutica intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e intratecal.

15A. A combinação de qualquer um de 9A a 14A, em que o transportador farmacêuticamente aceitável é um líquido.

16A. A combinação de 15A, em que o transportador líquido é selecionado a partir do grupo que consiste em soro fisiológico, glucose a 5%, álcoois, glicóis, ésteres, amidas e uma combinação dos mesmos.

EXEMPLO 1

Materiais

O ácido N¹⁰-trifluoroacetilpteróico foi comprado a Eprova AG, Schaffhausen, Suíça. Os reagentes de síntese de péptidos foram adquiridos de NovaBiochem e Bachem. O pertecnetato de sódio ^{99m}Tc foi fornecido por Syncor. O [ReO₂ (en) 2] Cl foi preparado de acordo com Rouschias (Rouschias, G., Chem. Rev., 74: 531 (1974)). As placas de celulose e as placas de troca iônica de DEAE foram adquiridas a J. T. Baker.

EXEMPLO 2

Síntese, purificação e caracterização analítica do EC20

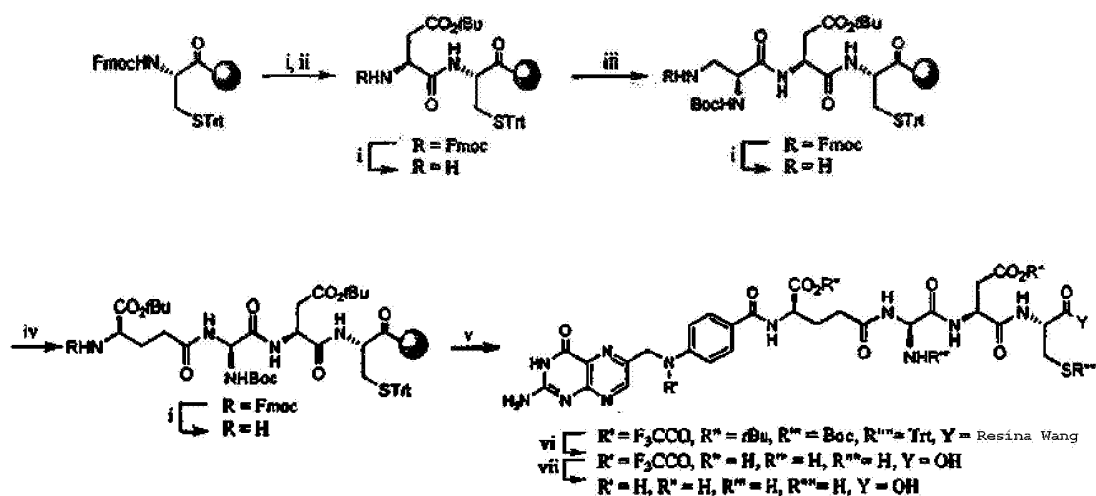
O EC20 foi preparado por um método sequencial de suporte polimérico utilizando a estratégia de Fmoc (veja-se o Esquema 1 em seguida, Fmoc = 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, Boc = terc butiloxicarbonilo, Dap = ácido diaminopropiônico, DMF = dimetilformamida, DIPEA = diisopropiletilamina). O EC20 foi sintetizado numa resina Wang sensível a ácido carregada com Fmoc-L-Cys (Trt)-OH. Foi aplicado benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfoniohexafluorofosfato (PyBOP) como reagente de ativação, para assegurar o acoplamento eficiente utilizando equivalentes baixos de aminoácidos. Os grupos protetores Fmoc foram removidos depois de cada etapa de acoplamento, sob condições padrão (20 % de piperidina em

DMF). Depois da última etapa de montagem, o péptido foi clivado do suporte polimérico por tratamento com ácido trifluoroacético a 92,5 % contendo 2,5 % de etanoditiol, 2,5 % de triisopropilsilano e 2,5 % de água desionizada. Esta reação também resultou na remoção simultânea dos grupos protetores t-Bu, Boc e tritilo. Finalmente, a porção de trifluoroacetilo foi removida em hidróxido de amónio aquoso para dar o EC20.

O produto de EC20 em bruto foi purificado por HPLC utilizando uma coluna Xterra RP 18, 30 x 300 mm, 7 µm (Waters), fase móvel 32 mM de HCl (A), MeOH (B), condições de gradiente começando com 99 % de A e 1 % de B e atingindo 89 % de A e 11 % de B em 37 min a uma taxa de fluxo de 20 ml/min. Sob estas condições, o monómero de EC20 eluiu tipicamente aos 14,38 min, enquanto o dímero dissulfureto de EC20 (contaminante menor) eluiu aos 16,83 min. Todos os outros compostos apresentados na Fig. 10 podem ser preparados utilizando um esquema de síntese semelhante, exceto o EC15 que é sintetizado tal como mostrado no Esquema 2 em seguida.

Foram dissolvidos dois miligramas de EC20 purificado por HPLC em 0,62 ml de D₂O₂ e foi recolhido um espectro de 500 MHz ¹H-RMN. O Quadro 1 (ver em seguida) lista os desvios químicos, as formas de sinal e os valores de J para todos os prótons não permutáveis na molécula de EC20.

O EC20 foi também analisado por espectroscopia de massa com eletropulverização. Principais picos de iões positivos (**m/z**, intensidade relativa): **746,1**, 100, **747,1**, 44, **556,8**, 32, **570,8**, 16.

Esquema 1^a

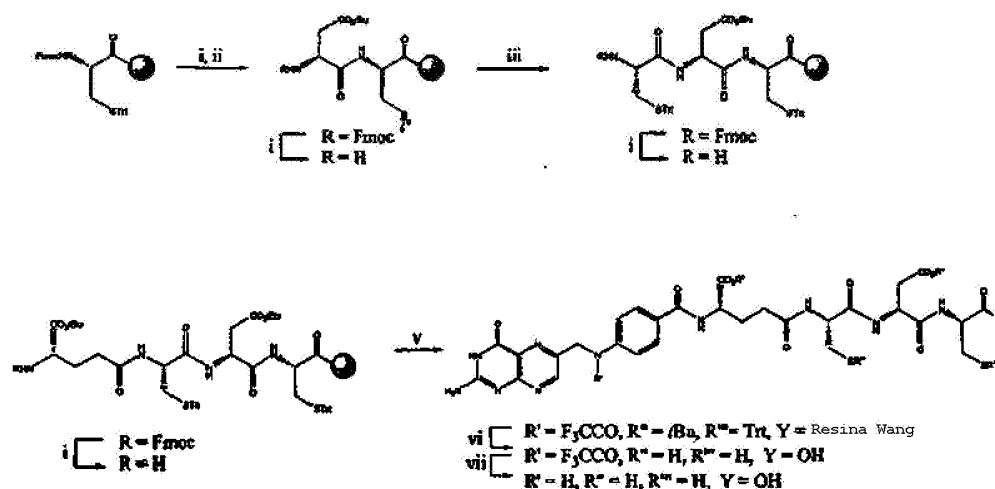
^a Reagentes e condições: i) 20 % Piperidina, DMF, ii) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF, iii) Boc-Dap(Fmoc)-OH, PyBop, DIPEA, DMF, iv) Fmoc-D-Glu-OtBu, PyBop, DIPEA, DMF, v) N^{10} -TFA-Pte-OH, DIPEA, DMSO, vi) $\text{F}_3\text{CCO}_2\text{H}$, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, iPr_3SiH , vii) H_4NOH , pH = 10,3.

QUADRO 1. Dados de ^1H -RMN para EC20. EC20 foi dissolvido em D_2O e foi recolhido um espectro de 500 MHz. Os desvios químicos (δ) são em ppm. O sinal para HOD a $\delta = 4,80$ ppm foi usado como referência. pD = 4,78, s = singlete, d = duplete, m = multiplete.

Resíduo	Protões observados	Desvio químico (δ)	Sinais	Valores de J
Ple	H-7	8,76	s	$^3J_{12,13} = ^3J_{15,16} = 8,8$ Hz
	2 x H-9	4,64	s	
	H-12 a. H-16	7,68	d	
	H-13 a. H-15	6,8	d	
D-Glu	H-2	4,41	dd	$^3J_{2,3} = ^3J_{9,1} = 5$ Hz; $^3J_{2,3b} = 4,5$ Hz $^2J_{3a,3b} = 14,2$ Hz $^3J_{3a,4} = ^3J_{4b,4} = 5,6$ Hz
	H-3a	2,08	m	
	H-3b	2,27	m	
	2 x H-4	2,44	dd	

Resíduo	Protões observados	Desvio químico (δ)	Sinais	Valores de J
Dpr	H-2 H-3A H-3B	4,1 3,52 3,72	dd; X do sistema ABX dd; A do sistema ABX dd; B do sistema ABX	$^3J_{2,3A} = 6,6$ Hz, $^3J_{2,3B} = 4,7$ Hz $^2J_{A,B} = 14,7$ Hz
Asp	H-2 2,81 H-3B	4,71 2,62 2,81	dd; X do sistema ABX dd; A do sistema ABX dd; B do sistema ABX	$^3J_{2,3A} = 9,5$ Hz, $^3J_{2,3B} = 4,3$ Hz $^2J_{A,B} = 16,1$ Hz
Cys	H-2 H-3A H-3B	4,3 2,85 2,89	dd; X do sistema ABX dd; A do sistema ABX dd; B do sistema ABX	$^3J_{2,3A} = 55$ Hz; $^3J_{2,3B} = 4,4$ Hz $^2J_{A,B} = 14,1$ Hz

Esquema 2^a



^a Reagentes e condições: i) 20 % Piperidina, DMF, ii) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF, iii) Fmoc-Cys(Tri)-OH, PyBop, DIPEA, DMF, iv) Fmoc-D-Glu-OtBu, PyBop, DIPEA, DMF, v) N^{10} -TFA-Pte-OH, DIPEA, DMSO, vi) TFAA, HSCH₂CH₂SH, iPr₃SiH, vii) H₄NOH, pH = 10,3.

EXEMPLE 3

Preparação do frasco do reagente não radioativo e de ^{99m}Tc -EC20

Foram utilizados kits de EC20 para a preparação da substância de fármaco radioativo ^{99m}Tc -EC20. Cada kit continha uma mistura estéril, não pirogênica liofilizada de 0,1 mg de EC20, 80 mg de α -D-glucoheptonato de sódio, 80 mg de cloreto diidrato de estanho (II) e hidróxido de sódio ou ácido clorídrico suficiente para ajustar o pH a $6,8 \pm 0,2$ antes da liofilização. O pó liofilizado foi selado num frasco de 5 ml sob uma atmosfera de árgon. Os kits foram, então, armazenados congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua utilização ou expiração (vida de prateleira corrente é > 2 anos). Mais importante, o componente de cloreto de estanho (II) é necessário para reduzir o ^{99m}Tc -pertecnetato adicionado, enquanto o componente de α -D-glucoheptonato de sódio é necessário para estabilizar o ^{99m}Tc recém reduzido, antes da sua quelação final para o composto EC20.

O ^{99m}Tc -EC20 foi preparado como se segue (isto é, quelação de ^{99m}Tc a EC20). Em primeiro lugar, foi preparado um banho de água em ebulição contendo um protetor de frasco de chumbo parcialmente submerso. A parte superior de um frasco de EC20 foi esfregado com etanol a 70 % para desinfetar a superfície e o frasco foi colocado num contentor de proteção adequado. Utilizando uma seringa protegida com uma agulha de calibre 27, foi injetado no frasco protegido 1 ml de solução estéril de pertecnetato de sódio de ^{99m}Tc de injeção (15 a 20 mCi) em cloreto de sódio a 0,9 %. Antes da remoção da seringa do frasco, foi retirado um volume de gás do frasco igual ao volume de pertecnetato adicionado, a fim de normalizar a pressão no interior do frasco. O frasco foi agitado suavemente durante 30 segundos para assegurar a dissolução completa do pó liofilizado. O frasco foi então colocado no protetor de chumbo que estava no banho de água em ebulição. A solução foi aquecida durante ~18 minutos e, em seguida, arrefecida até à temperatura ambiente durante um mínimo de 15 min. Esta solução pode ser armazenada à temperatura ambiente (15-25 °C) protegida da luz, mas deve ser usada no prazo de 6 horas após a preparação.

A estabilidade radioquímica da substância de fármaco radioativo foi determinada por HPLC depois de armazenamento à temperatura ambiente, protegida da luz durante 24 horas. As amostras da solução de ^{99m}Tc -EC20 (20 μl) foram analisadas utilizando um sistema de HPLC que consiste de um sistema de entrega de multissolvente Waters 600E e um detetor de 490 UV, um radiodetetor Bioscan EC-3200, software de radiocromatograma Laura v1.5 e uma coluna Waters Nova-Pak C18 (3,9 x 150 mm). As amostras injetadas foram eluídas de forma isocrática utilizando uma fase móvel aquosa contendo 20 % de metanol e 0,1 % de ácido trifluoroacético a uma taxa de fluxo de 1 ml/min. A análise de HPLC foi monitorizada tanto com o detetor de UV (280 nm)

como com o radiodetector gama. Notavelmente, a pureza radioquímica de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ permaneceu superior a 90 % durante, pelo menos, 24 horas em todos os casos.

EXEMPLO 4

Determinação da pureza radioquímica de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ por TLC

As principais impurezas radioquímicas na preparação de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ serão 1) ^{99m}Tc pertecnetato, 2) ^{99m}Tc -glucoheptonato (precursor do ligando de permuta), 3) ligação não específica de ^{99m}Tc (^{99m}Tc ligado a um local diferente da esperada porção quelante Dap-Asp-Cys da molécula de EC20) e 4) ^{99m}Tc hidrolisado. Uma vez que o $^{99m}\text{Tc-EC20}$ estava a ser testado para um possível uso clínico, foi desenvolvido um método baseado em três TLC para determinar as quantidades de cada impureza e para estimar a pureza radioquímica geral de $^{99m}\text{Tc-EC20}$.

No primeiro sistema foi desenvolvida uma placa de celulose com água desionizada. O $^{99m}\text{Tc-EC20}$, o ^{99m}Tc -glucoheptonato, a ligação não específica de ^{99m}Tc e o ^{99m}Tc pertecnetato movem-se para a frente do solvente ($R_f = 1,0$), enquanto o ^{99m}Tc hidrolisado permanece na origem ($R_f = 0,0$). A placa de celulose foi cortada em dois pedaços a $R_f = 0,3$ (1,5 cm da origem) e cada pedaço foi contado usando um calibrador de doses. A percentagem de ^{99m}Tc hidrolisado foi calculada da seguinte forma: $A = \% \text{ hidrolisado, } ^{99m}\text{Tc} = (\mu\text{Ci no pedaço inferior} / \mu\text{Ci em ambos os pedaços}) \times 100$.

No segundo sistema, a placa de celulose foi desenvolvida com acetona e 0,9 % de NaCl (7:3, v/v). O ^{99m}Tc -pertecnetato move-se com $R_f = 0,9$, enquanto o $^{99m}\text{Tc-EC20}$, o ^{99m}Tc -glucoheptonato, a ligação não específica de ^{99m}Tc e o ^{99m}Tc hidrolisado permanecem na origem ($R_f = 0,0$). A placa de celulose/acetona-salina foi cortada em dois pedaços a $R_f = 0,6$ (3,0 cm da origem), e cada pedaço foi contado com um calibrador de doses. A percentagem de ^{99m}Tc -pertecnetato foi calculada como se segue: $B = \% ^{99m}\text{Tc}$ -pertecnetato = $(\mu\text{Ci no pedaço superior} / \mu\text{Ci em ambos os$

pedaços) x 100.

Finalmente, no terceiro sistema foi desenvolvida uma placa de permuta iônica em DEAE com 0,3 M de Na₂SO₄. O ^{99m}Tc-glucoheptonato move-se para a frente do solvente ($R_f = 1,0$), a ligação não específica de ^{99m}Tc move-se com $R_f = 0,6$, e o ^{99m}Tc-EC20, o ^{99m}Tc hidrolisado e o ^{99m}Tc-pertecnetato permanecem próximo da origem (^{99m}Tc-EC20: $R_f = 0,1$, ^{99m}Tc hidrolisado: $R_f = 0,0$, ^{99m}Tc pertecnetato: $R_f = 0,3$). A placa de celulose/Na₂SO₄ foi cortada em dois pedaços a 2,5 cm a partir da origem e cada pedaço foi contado usando um calibrador de doses. A percentagem de ^{99m}Tc-glucoheptonato e da ligação não específica de ^{99m}Tc foi calculada como se segue: $C = \% \text{ (}^{99m}\text{Tc-glucoheptonato} + \text{ligação não específica de }^{99m}\text{Tc}) = (\mu\text{Ci no pedaço superior} / \mu\text{Ci em ambos os pedaços}) \times 100$. A pureza radioquímica global de ^{99m}Tc-EC20 foi em seguida calculada da seguinte forma: pureza radioquímica = $100 - (A+B+C)$.

Tal como se mostra na Fig. 2, a análise por HPLC da formulação de ^{99m}Tc-EC20 mostra quatro componentes radioquímicos, designados como picos A até D. O pico A foi confirmado ser ^{99m}Tc livre e este subproduto está presente de forma reprodutível a < 2 %. O pico B, que era diferente do de ^{99m}Tc-glucoheptonato (dados não apresentados), eluiu com um tempo de retenção de 2,8 min. Este componente representou cerca de 3 % da mistura e foi pensado resultar da quelação de ^{99m}Tc em algum outro local da molécula de EC20 para além da esperada porção Dap-Asp-Cys. Os picos C e D (tempos de retenção de 4,8 minutos e 13,2 minutos, respetivamente) representam a maior parte da atividade radioquímica formulada.

EXEMPLO 5

Síntese de Re-EC20

Foram dissolvidas cinquenta e duas mg (0,010 mmol) de EC20 e [ReO₂(en)₂]Cl (52 mg, 0,14 mmol) em 6 ml e 1 ml de tampão de fosfato purgado com árgon (0,05 M, pH 5,8),

respetivamente. As duas soluções foram combinadas e aquecidas sob uma atmosfera de árgon num banho de água em ebulição durante 2 horas. A mistura de reação foi congelada e liofilizada durante a noite. O produto em bruto foi purificado por HPLC (coluna Xterra RPI8, 19 x 150 mm, 10 mM de NH_4OAc / CH_3CN , taxa de fluxo de 10 ml/min, gradiente de 1 % a 8 %). As frações foram recolhidas, liofilizadas e armazenadas a -20°C até à sua utilização.

Uma vez que não estavam disponíveis instalações de espectrometria de massa para a análise de materiais radioativos, foi analisado o análogo de rénio não radioativo, Re-EC20. Tanto o rénio como o tecnécio são metais do grupo VIIA que têm uma semelhança significativa nas propriedades físicas e químicas. Eles também formam complexos semelhantes com ligandos orgânicos. Este comportamento químico análogo tem sido usado frequentemente na elucidação estrutural de novas classes de radiofármacos de tecnécio com base em análogos de rénio não radioativos. Curiosamente, a análise por HPLC de Re-EC20 também mostrou dois picos principais que eluem a 5 e 14,2 minutos, respetivamente, semelhante aos picos C e D para o $^{99\text{m}}\text{Tc-EC20}$ (cromatograma não apresentado). A análise do espectro de massa confirmou que estes dois componentes eram isómeros correspondendo ao complexo Re-EC20 ($m/z = 945$). Na verdade, estas espécies foram possivelmente diastereómeros que possuíam quer uma configuração *syn* como *anti* da ligação de tecnécio-oxigénio no anel quelante Dap-Asp-Cys, tal como representado na Fig. 3. Uma vez que i) os dois picos no cromatograma de Re-EC20 representam complexos isoméricos e ii) existem relatórios de isomerismo semelhante em complexos de tecnécio, é provável que os componentes C e D no radiocromatograma de $^{99\text{m}}\text{Tc-EC20}$ sejam também isómeros.

EXEMPLO 6

Cultura de Células

As células foram cultivadas continuamente como uma

monocamada, utilizando meio RPMI isento de folato (FFRPMI) contendo 10 % de soro fetal de vitelo inativado pelo calor (HIFCS), a 37 °C numa atmosfera de 5 % de CO₂/95 % de ar humidificado, sem antibióticos. O HIFCS continha o seu complemento normal de folatos endógenos, o que permitiu às células sustentar o crescimento neste meio mais fisiologicamente relevante. Todas as experiências usando células foram realizadas usando FFRPMI contendo 10 % de HIFCS (FFRPMI/HIFCS) como meio de crescimento, exceto onde indicado.

EXEMPLO 7

Ensaio de afinidade relativa

A afinidade relativa de vários derivados de folato foi determinada de acordo com o método descrito por Westerhoff et al. (Mol. Pharm., 48: 459-471 (1995)), com ligeira modificação. Resumidamente, as células KB FR-positivas foram gentilmente tripsinizadas em 0,25 % de tripsina/PBS, à temperatura ambiente durante 3 minutos e, em seguida, diluídas em FFRPMI/HIFCS. Após uma agitação de 5 minutos a 800 x g e de uma lavagem com PBS, o precipitado final de células foi suspenso em FFRPMI 1640 (sem soro). As células foram incubadas durante 15 min em gelo com 100 nM de ácido fólico-³H, na ausência e presença de concentrações crescentes de artigos em teste contendo folato. As amostras foram centrifugadas a 10000 x g durante 5 min, os precipitados de células foram suspensos em tampão, foram transferidos para frascos individuais contendo 5 ml de mistura de cintilação, e foram, em seguida, contados para radioatividade. Os tubos de controlo negativos continham apenas o ácido fólico-³H em FFRPMI (sem concorrente). Os tubos de controlo positivo continham uma concentração final de 1 mM de ácido fólico e os CPMs medidos nestas amostras (representando a ligação não específica do rótulo) foram subtraídos de todas as amostras. Notavelmente, as afinidades relativas foram definidas como o inverso da

razão molar de composto necessário para deslocar 50 % do ácido fólico-³H ligado a KB FR e a afinidade relativa do ácido fólico para FR foi definida como 1.

A capacidade de EC20 para competir diretamente com o ácido fólico para a ligação com FRs da superfície celular foi medida usando este ensaio. De forma importante, um valor de afinidade relativa de 1,0 indica que o ligando do artigo em teste tem uma afinidade para o FR igual ao ácido fólico. Da mesma forma, valores menores do que a unidade refletem uma afinidade mais fraca e valores superiores à unidade refletem uma afinidade mais forte.

As células KB cultivadas foram incubadas com 100 nM de ácido fólico-³H na presença de concentrações crescentes de ácido fólico não radioativo, EC20, rénio-EC20 (isómero A, pico C), rénio-EC20 (isómero B, pico 0) ou um radiofármaco relacionado com base em folato, DTPA-folato. Após uma incubação de 15 minutos a 4 °C, as células foram lavadas livres do material não ligado e contadas para radioatividade residual associada à célula. A quantidade de radioatividade ligada foi representada graficamente contra a concentração de ligando não marcado e foram estimados os valores de IC₅₀ (concentração de ligando necessária para bloquear 50 % da ligação de ácido fólico-³H). Tal como mostrado na Fig. 4 e no Quadro 2 (em seguida), o EC20 foi determinado ter uma afinidade de 0,92 em relação à do ácido fólico para FRs humanos. Ambos os isómeros do rénio-EC20 exibiram valores de afinidade relativa que eram muito semelhantes à, se não melhores do que, molécula original de EC20 (1,42 e 1,37 para o isómero A e isómero B de Re-EC20, respetivamente). O DTPA-folato, um agente radiofármaco de folato quelante-¹¹¹In, exibiu uma afinidade relativa de 0,87 para o recetor de folato. Assim, a modificação química do folato com vários motivos de metais quelantes não perturbou a afinidade intrínseca da vitamina para o FR.

Quadro 2. Estimativas de afinidade relativa. As afinidades relativas (RA) foram definidas como o inverso da razão molar do composto necessária para deslocar 50 % de ácido fólico-³H ligado a células KB FR-positivas. A afinidade relativa do ácido fólico foi definida para 1. Cada partícula em teste foi avaliada em triplicado.

Artigo em teste	IC ₅₀ (nM)	S.D.	RA	S.D.
Ácido fólico	118	± 19	1,00	
EC20	128	± 25	0,92	± 0,23
EC20:Re isómero 1	83	± 16	1,42	± 0,36
EC20:Re isómero 2	86	± 3	1,37	± 0,23
DTPA-Folato	136	± 12	0,87	± 0,16

EXEMPLO 8

Absorção celular dependente do tempo

As células KB foram cultivadas em placas Falcon de 12 poços e deixadas a formar monocamadas sub-confluentes durante a noite. Após uma lavagem com 1 ml de FFRPMI/HIFCS fresco, cada poço recebeu 1 ml de FFRPMI/HIFCS contendo 10 nM de ^{99m}Tc-EC20. As células foram incubadas durante períodos pré-determinados a 37 °C e, em seguida, lavadas quatro vezes com 1 ml de PBS gelado, pH 7,4. As monocamadas de células foram dissolvidas em 0,5 ml de PBS, pH 7,4, contendo 1 % de dodecil sulfato de sódio durante 15 min à temperatura ambiente e, em seguida, contadas para radioatividade utilizando um contador gama Packard. A proteína em cada amostra foi quantificada utilizando um kit de ensaio de proteína da BioRad DC e os valores de proteína celular foram convertidos em número de células, utilizando o fator de conversão de 2,23 x 10⁻⁷ mg de proteína por célula. Os valores tabelados finais foram expressos em termos de moléculas de EC20 por célula.

A cinética de absorção de ^{99m}Tc-EC20 em células KB FR-

positivas foi medida quantitativamente usando este protocolo. Tal como mostrado na Fig. 5, a absorção em estado estacionário foi alcançada no espaço de duas horas a 37 °C, em que cerca de 3,2 milhões de moléculas de EC20 foram associados a células, ao passo que a semi-máxima de associação celular ocorreu 9 minutos após a mistura de 10 nM deste radiofármaco com as células. Curiosamente, o ponto de saturação de semi-máxima foi alcançado em apenas 37 segundos quando as células foram incubadas com uma concentração 10 vezes mais elevada de ^{99m}Tc -EC20 (100 nM, dados não apresentados).

EXEMPLO 9

Absorção celular dependente da concentração

As células KB foram cultivadas em placas Falcon de 12 poços e deixadas a formar monocamadas sub-confluentes durante a noite. Após uma lavagem com 1 ml de FERPMI/HIFCS fresco, cada poço recebeu 1 ml de FFRPMI/HIFCS contendo concentrações crescentes de ^{99m}Tc -EC20. As células foram incubadas durante 2 horas a 37 °C e, em seguida, lavadas quatro vezes com 1 ml de PBS gelado, pH 7,4. As monocamadas foram dissolvidas em 0,5 ml de PBS, pH 7,4, contendo 1 % de dodecil sulfato de sódio durante 15 min à temperatura ambiente e, em seguida, contadas para radioatividade utilizando um contador gama Packard. O conteúdo de proteína foi determinado tal como descrito anteriormente, e os valores tabelados finais foram expressos em termos de moléculas de EC20 por célula.

Tal como se mostra na Fig. 6, a absorção celular de ^{99m}Tc -EC20 foi encontrada ser dependente da concentração extracelular. As células KB específicas utilizadas foram determinadas ligarem-se a um máximo de quatro milhões de moléculas do radiofármaco de folato por célula. A análise de Scatchard dos dados estimou ser de 3,2 nM o K_D de ligação, um valor comparável com o K_D observado para a ligação de vitamina folato a estas mesmas células.

Embora não tenha sido estabelecida a identidade completa do componente do pico B, a análise de absorção de UV indicou que continha uma porção de folato (ou seja, o espectro de absorção continha o pico de absorção secundário característico do folato a 363 nm). Este material radiomarcado purificado por HPLC (material do pico B) foi recolhido e, em seguida, adicionado às células KB em cultura. Tal como mostrado na Fig. 7, a absorção celular do componente do pico B marcado com ^{99m}Tc foi também encontrada ser dependente da concentração extracelular. A análise de Scatchard dos dados estimou ser de 1,1 nM o K_D de ligação. Curiosamente, a associação de células do pico B foi completamente bloqueada na presença de excesso de ácido fólico, indicando que esta menor formulação de subproduto também é capaz de se direcionar para células FR-positivas para fins de radiodiagnóstico.

EXEMPLO 10

Depuração do sangue

Os animais utilizados para este estudo foram mantidos numa dieta isenta de folato (Harlan #TD-90261) durante cerca de três semanas antes da administração da dose. A aclimação a esta dieta especial é essencial porque as dietas normais de roedores contêm grandes quantidades de ácido fólico (6 mg/kg de ração) e promovem elevados níveis de folato sérico em ratinhos. Para além disso, estudos anteriores demonstraram que os ratinhos submetidos a uma dieta isenta de folato durante 3 semanas mantiveram um nível seguro de folato sérico de 25 ± 7 nM, o que é ligeiramente maior do que a concentração de 9-14 nM mensurável no soro humano.

A solução de ^{99m}Tc -EC20 foi preparada no dia do uso e continha inicialmente 100 μg de EC20 por mililitro. A solução foi, ainda, mais diluída com solução salina estéril para preparar as soluções de trabalho. A pureza radioquímica do produto foi estimada por TLC ser de ~94 %.

Cada animal recebeu uma dose de 50 µg/kg de EC20 (67 nmol/kg) em aproximadamente 0,1 ml de volume i.v. através da veia da cauda durante uma breve anestesia com éter dietílico. Nos tempos designados (veja-se a Fig. 8) pós-injeção, cada animal foi sacrificado por asfixia com CO₂ e o sangue foi imediatamente recolhido por punção cardíaca.

Tal como se mostra na Fig. 8, o ^{99m}Tc-EC20 foi rapidamente removido da circulação no ratinho Balb/c. A meia-vida no plasma deste radiofármaco foi estimada como sendo de ~4 minutos e menos do que 0,2 % da dose de ^{99m}Tc-EC20 injetado permaneceu em circulação após quatro horas (assumindo que o sangue representa 5,5 % da massa corporal total). Estes dados indicam que os conjugados de folato são rapidamente removidos da circulação após a administração intravenosa, e que podem ser obtidos dados valiosos de biodistribuição no tecido depois de apenas algumas horas após a injeção, sem a preocupação com a absorção não específica pelos tecidos devido à radioatividade por via sanguínea.

EXEMPLO 11

Estudos de distribuição de tecidos

A capacidade de ^{99m}Tc-EC20 para visar tumores *in vivo* foi avaliada utilizando um modelo M109 FR-positivo. Estas células de tumor são singeneicas para o ratinho Balb/c, e formam de forma reprodutível tumores sólidos subcutâneos dentro de duas semanas após a inoculação. Também foram avaliados neste bioensaio o ^{99m}Tc-EC14, que é estruturalmente semelhante ao ^{99m}Tc-EC20 exceto que contém um resíduo adicional de _D-Glu (isto é, Pte-_D-Glu-_D-Glu-βDpr-Asp-Cys), o ^{99m}Tc-EC28 (um controlo que não contém pterato que consiste de benzoil-_D-Glu-_n-Glu-βDpr-Asp-Cys), e o radiofármaco de folato-¹¹¹In-DTPA relatado previamente. De forma importante, o agente de controlo de ^{99m}Tc-EC28 não se irá ligar a FRs da superfície celular, porque lhe falta uma porção essencial de anel de pteridina.

Ratinhos de quatro a cinco semanas de idade (estirpe Balb/c) foram adquiridos a Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN) e foram mantidos numa dieta isenta de folato por um total de três semanas antes da experiência. As células de tumor M109 FR-positivas, singeneicas, (1×10^6 por animal) foram inoculadas no tecido subcutâneo da axila direita duas semanas antes da experiência. Todos os ratinhos eram do sexo feminino e os pesos dos tumores eram $54,2 \pm 29,8$ mg no dia da experiência. Uma solução stock de ^{99m}Tc -EC20 contendo 100 μg de agente por mililitro foi preparada no dia da utilização e a sua pureza radioquímica foi $> 96 \%$. Os dois ^{99m}Tc -agentes quelantes adicionais, ^{99m}Tc -EC14 e ^{99m}Tc -EC28, bem como o folato ^{111}In -DTPA, também foram preparados para $> 90 \%$ de pureza radioquímica. Todas as soluções foram diluídas ou com solução salina por si só ou com uma solução salina contendo 100 equivalentes de ácido fólico (para competição), de tal modo que a concentração final de radiofármaco foi de 10 $\mu\text{mol/ml}$.

Os animais receberam uma dose de cerca de 40 $\mu\text{mol/kg}$ i.v. de artigo em teste num volume de 100 μl , através de uma veia lateral da cauda, durante uma breve anestesia com éter etílico. Quatro horas após a injeção, os animais foram sacrificados por asfixia com CO_2 e dissecados. Foram removidos os tecidos selecionados, pesados e contados para determinar a distribuição de ^{99m}Tc . Os valores de CPM foram corrigidos por decadência e os resultados foram tabulados como % de dose injetada por grama de peso de tecido molhado.

Tal como se mostra no Quadro 3 (em seguida), os três radiofármacos contendo "folato", ^{99m}Tc -EC14, ^{99m}Tc -EC20 e folato ^{111}In -DTPA, acumularam-se predominantemente no tumor FR-positivo e nos rins, no entanto, os rins concentraram uma dose injetada percentualmente superior por grama de tecido (% ID/g) do que o tumor. Curiosamente, a acumulação global tumoral de folato ^{111}In -DTPA e de ^{99m}Tc -EC20 foi quase

a mesma (19 e 17 % ID/g, respetivamente), ao passo que a absorção tumoral de ^{99m}Tc -EC14 foi ligeiramente inferior a 10 % ID/g. De qualquer forma, todos os três agentes exibiram elevadas razões de tumor para sangue (> 30 para 1).

* Os valores apresentados representam a média $\pm$ s.d. de dados de 3 animais.

O direcionamento específico de folato foi ainda demonstrado através de dois métodos distintos. Em primeiro lugar, a acumulação de $^{99m}\text{Tc-EC14}$, $^{99m}\text{Tc-EC20}$ e de folato $^{111}\text{In-DTPA}$ no tumor e nos rins FR-positivos foi eficazmente bloqueada ($> 94\%$), quando estes agentes foram coadministrados com um excesso de 100 vezes de ácido fólico. Em segundo lugar, o agente de controlo de $^{99m}\text{Tc-EC28}$ falhou a sua acumulação apreciável nos rins e no tumor. Ambas as observações demonstram que é necessária uma porção intacta "semelhante a folato" (ou pteroato) para proporcionar a absorção e retenção direcionadas destes agentes radiofármacos em tecidos FR-positivos.

EXEMPLO 12

Cintilografia gama

As células de tumor M109 (1×10^6 por animal) foram inoculadas no tecido subcutâneo da axila direita dos ratinhos Balb/c duas semanas antes da experiência. Os animais receberam uma dose de cerca de $50 \mu\text{mol/kg}$ i.v. de artigo em teste num volume de $100 \mu\text{l}$ através de uma veia lateral da cauda durante uma breve anestesia com éter dietílico. Quatro horas após a injeção, os animais foram sacrificados por asfixia com CO_2 e, em seguida, colocados em cima de uma superfície de aquisição de imagem. A aquisição de imagem de corpo inteiro foi realizada durante 1 minuto a uma taxa de contagem de 50-75000 contagens por minuto, usando uma câmara de radioisótopo gama Technicare Omega 500 Sigma 410. Todos os dados foram analisados por meio de um computador baseado no MS-DOS Medasys equipado com o software Pinnacle Medasys.

A absorção de $^{99m}\text{Tc-EC20}$ pelos tumores M1 09 FR-positivos e rins foi demonstrada usando este protocolo de cintilografia gama. Tal como mostrado na Fig. 9, uma imagem ventral de um ratinho injetado com $^{99m}\text{Tc-EC20}$, tal como descrito anteriormente, localiza a radiação gama para os dois rins (K) e a massa de tumor M109 (T, região do ombro).

Não foi observado radiomarcador apreciável noutros tecidos do corpo. Foi relatado um perfil de imagem semelhante para o radiofármaco de folato ^{111}In -DTPA.

EXEMPLO 13

Excreção urinária e metabolismo

O perfil de HPLC da especiação urinária de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 foi obtido utilizando ratinhos Balb/c. Os ratinhos (~20 g cada) foram injetados com 1 mCi (6,7 nmol) de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 através de uma veia lateral da cauda. Após um período de tempo de 1, 4 ou 6 horas, grupos de dois ratinhos foram sacrificados por asfixia com CO_2 , e foi recolhida a urina. Após filtração através de um filtro GV13 Millex, a especiação radioquímica foi avaliada utilizando um sistema de HPLC equipado com uma coluna Nova-Pak C18 de 3,9 x 150 mm e um detetor radioquímico. O sistema foi eluído de forma isocrática com 20 % de metanol contendo 0,1 % de TFA a uma taxa de fluxo de 1 ml/minuto.

Foi determinado anteriormente que a via principal para a eliminação de folato ^{111}In -DTPA era através da urina. Semelhante ao perfil de HPLC mostrado na Fig. 2, tanto o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 padrão como as amostras de urina exibiram quatro picos radioativos. Tal como mostrado no Quadro 4 (em seguida), a pureza radioquímica do padrão (soma dos picos C e D, presumivelmente correspondentes ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 *syn* e *anti*) manteve-se constante a ~93 % ao longo das 6 horas de duração desta experiência. A quantidade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ livre no padrão (pico A) foi de ~2 %. De forma importante, o pico B dentro deste perfil radioquímico acredita-se ser quelado por EC20 com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ numa posição não convencional, menos estável, no entanto, a radioatividade medida nesta fração não foi incluída na estimativa da pureza radioquímica global para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20. Estes dados indicam coletivamente que a formulação permaneceu estável em solução salina ao longo deste estudo de 6 horas.

Depois de 1 e 4 horas após a injeção em ratinhos

Balb/C, o perfil de especiação radioquímica de ^{99m}Tc -EC20 na urina do ratinho não se alterou. No entanto, a radioatividade presente na urina às 6 horas após a injeção era muito baixa para analisar com precisão por HPLC. A proporção do fármaco original entre as espécies radioativas recuperadas na urina permaneceu relativamente constante a cerca de 90 % ao longo das quatro horas, durante as quais pode ser quantificada. Este valor é muito semelhante ao da pureza de 93 % do padrão, indicando que o ^{99m}Tc -EC20 é excretado predominantemente na urina numa forma não modificada.

Quadro 4. Excreção e metabolismo de ^{99m}Tc -EC20 do ratinho Balb/c. Os ratinhos foram injetados com 1 mCi (6,7 nmol) de ^{99m}Tc -EC20 através de uma veia lateral da cauda. Nos tempos indicados, foram sacrificados grupos de dois ratinhos e foi recolhida a urina. A especiação radioquímica foi então determinada por HPLC. A soma da área percentual dos picos C e D (isómeros *syn* e *anti*) é usada para calcular a pureza global do ^{99m}Tc -EC20 intacto.

Pico	RT (min)	Área percentual						
		^{99m}Tc -EC20 Padrão			Amostras de urina (dois ratinhos/ponto no tempo)			
		0 h	1 h	6 h	1 h		4 h	
A (pertechnetato)	1,4	2	2,1	1,8	8,3	6,3	9,4	10,2
B (desconhecido)	3,4	4,5	4,5	4,8	2,5	2,6	5,4	0
C (isómero 1)	5,5	15,5	15,7	15,9	20,4	18,1	7,3	11,1
D (isómero 2)	18,5	78	77,7	77,5	68,8	73	77,9	78,7
Soma de C e D		93,5	93,4	93,4	89,2	91,1	85,2	89,8

EXEMPLO 14

Ligação de proteína no soro

Foram utilizados soro de rato fresco e soro humano do sexo masculino comercial (dadores tipo AB, Sigma Chemical Co.), para avaliar a ligação *in vivo* de ^{99m}Tc -EC20 às proteínas séricas. Um minuto depois o ^{99m}Tc -EC20 foi

misturado com 1 ml de soro, à temperatura ambiente, 0,3 ml da solução de soro foram transferidos para um dispositivo de ultrafiltração limpo Amicon Centrifree® (30000 NMWL) em triplicado. No espaço de um minuto após carregar a centrífuga com a solução de soro, o dispositivo foi centrifugado a 1000 x g durante 20 minutos a 20 °C. Foram transferidas para um tubo limpo amostras de 50 µl da solução inicial e do filtrado de cada dispositivo, e contadas num contador gama automático. Uma solução de controlo de ^{99m}Tc -EC2D misturada com 1 ml de solução salina normal foi ultrafiltrada de um modo idêntico. A percentagem de ^{99m}Tc livre foi calculada para cada uma das três amostras.

Enquanto que o ^{99m}Tc -EC20 exibiu apenas um menor nível de ligação não específica ao dispositivo de ultrafiltração (~50), cerca de 70 % deste foi encontrado associar-se predominantemente com a fração de proteína sérica de > 30 kDa, em soluções de soro de rato ou humano (69 % e 72 %, respetivamente). De forma importante, uma vez que o ^{99m}Tc -EC20 acumula-se efetivamente e preferencialmente nos tecidos FR-positivos (veja-se o Quadro 2 e a Fig. 8), a sua afinidade aparente para as proteínas do soro não parece afetar a capacidade deste radiofármaco para direcionar FRs *in vivo*.

EXEMPLO 15

Estudos de distribuição de tecidos

Os protocolos utilizados neste exemplo são semelhantes aos descritos no Exemplo 11. A capacidade de ^{99m}Tc -EC20 para visar tumores *in vivo* foi avaliada mais aprofundadamente usando modelos de tumor M109 FR-positivo e 4T1 FR-negativo. As fêmeas de ratinhos Balb/c (n = 3/grupo de dose) de seis semanas de idade foram adquiridas a Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN) e foram mantidas numa dieta isenta de folato (Harlan TEKLAD) durante um total de sete dias antes da inoculação das células de tumor.

As células de tumor M109 singeneicas, FR-positivas (2×10^6 P₀ por animal) ou as células 4T1 FR-negativas (5×10^5 P₀ por animal) foram inoculadas subcutaneamente em 100 µl de RPMI-1640 isento de folato, contendo 1 % de soro de ratinho singeneico. Foi preparada no dia da utilização uma solução stock de ^{99m}Tc -EC20 contendo 100 µg de agente por mililitro, tal como descrito anteriormente.

Dezasseis dias após a inoculação das células de tumor, os animais foram injetados por via intravenosa com 500 ou 1800 nmol/kg de EC20 para animais transportadores de tumores M109 e 500 nmol/kg de EC20 para animais transportadores de tumores 4T1 (3 ratinhos por grupo de dose). Todas as injeções foram em volumes de 100 µl. Quatro horas após a injeção, os animais foram sacrificados por asfixia com CO₂ e o sangue foi recolhido por punção cardíaca, e os animais foram dissecados. Os tecidos selecionados (coração, pulmões, fígado, baço, rim, intestinos, estômago, músculo e tumor) foram removidos, pesados e contados num contador gama automático para determinar a distribuição de ^{99m}Tc . A absorção do radiofármaco, em termos de percentagem de dose injetada de peso de tecido molhado (% ID/g), foi calculada por referência a padrões preparados a partir de diluições da preparação injetada.

Tal como se mostra na Fig. 11, foi demonstrado o direcionamento específico do recetor de folato, porque o ^{99m}Tc -EC20 acumulou-se predominantemente nos tumores M109 FR-positivos e rins, e não nos tumores 4T1 FR-negativos. A absorção nos tumores 4T1 FR-negativos foi de 7,6 vezes menos do que nos tumores M109 FR-positivos. A absorção de ^{99m}Tc -EC20 em tecidos normais, exceto no rim tal como esperado, foi baixa. Estes resultados mostram que o direcionamento de ^{99m}Tc -EC20 é específico de FR.

EXEMPLO 16

Estudos de distribuição de tecidos

Os protocolos utilizados neste exemplo são semelhantes aos descritos no Exemplo 11. A capacidade de $^{99m}\text{Tc-EC11}$ (péptido- A_1), $^{99m}\text{Tc-EC13}$ (péptido- A_3), e de $^{99m}\text{Tc-EC14}$ (péptido- A_2) para visar tumores *in vivo* foi avaliada utilizando o modelo de tumor KB FR-positivo. Ratinhos nus machos ($n = 4/\text{grupo}$) foram mantidos numa dieta isenta de folato durante um total de dez dias antes da inoculação das células de tumor.

As células de tumor KB FR-positivas ($0,25 \times 10^6$ por animal) foram inoculadas subcutaneamente na região intracapsular. Catorze dias após a inoculação das células de tumor, os animais ($n = 4/\text{grupo}$) foram injetados por via intravenosa com $^{99m}\text{Tc-EC11}$, $^{99m}\text{Tc-EC13}$ ou $^{99m}\text{Tc-EC14}$ nas doses (cerca de $12 \mu\text{g/kg}$) dos conjugados mostrados no Quadro 5 que se segue. As soluções stock de $^{99m}\text{Tc-EC11}$, $^{99m}\text{Tc-EC13}$ e de $^{99m}\text{Tc-EC14}$ foram preparadas no dia de uso, tal como descrito anteriormente. Foi coadministrado um excesso de cerca de 20 vezes de folato livre (cerca de $200 \mu\text{g/kg}$) aos animais controlo ($n = 4/\text{grupo}$). Quatro horas após a injeção, os animais foram sacrificados por asfixia com CO_2 , e o sangue foi recolhido por punção cardíaca, e os animais foram dissecados. Os tecidos selecionados foram removidos, pesados e contados num contador gama automático para determinar a distribuição de ^{99m}Tc . A absorção do radiofármaco, em termos de percentagem de dose injetada de peso de tecido molhado (% ID/g), foi calculada por referência a padrões preparados a partir de diluições da preparação injetada.

Tal como se mostra no Quadro 5, foi demonstrado o direcionamento específico do recetor de folato, porque o $^{99m}\text{Tc-EC11}$, o $^{99m}\text{Tc-EC13}$ e o $^{99m}\text{Tc-EC14}$ acumularam-se predominantemente nos tumores KB FR-positivos e rins. A acumulação foi bloqueada pela coadministração de folato livre. Estes resultados mostram que o $^{99m}\text{Tc-EC11}$, $^{99m}\text{Tc-EC13}$ e o $^{99m}\text{Tc-EC14}$ podem visar tumores *in vivo* numa forma

específica de FR.

Foram obtidos resultados semelhantes (veja-se o Quadro 6 em seguida) com o ^{99m}Tc -EC53 (o D-enantiómero total de EC20) através de protocolos semelhantes, exceto que a dose de ^{99m}Tc -EC53 foi de cerca de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e foi usado um excesso de cerca de 100 vezes de folato livre ou EC53 frio. Tal como mostrado no Quadro 6, foi demonstrado o direcionamento específico do recetor de folato, porque o ^{99m}Tc -EC53 acumulou-se predominantemente nos tumores KB FR-positivos e rins. A acumulação foi bloqueada pela coadministração de folato livre. Estes resultados mostram que o ^{99m}Tc -EC53 pode visar tumores *in vivo* numa forma específica de FR.

QUADRO 5

	Percentagem de dose de ^{99m}Tc injetada por grama (Massa de tecido molhado)							
	Péptido A ₁ - folato (EC 11)		Péptido A ₂ - folato (EC14)		Péptido A ₃ - folato (EC13)		HYNIC-folato	
Massa do tumor (g):	0,112 ± 0,027	0,125 ± 0,032	0,160 ± 0,037	0,171 ± 0,044	0,213 ± 0,067	0,0773 ± 0,041	0,179 ± 0,060	0,150 ± 0,068
Massa do animal (g):	28,9 ± 1,3	27,1 ± 1,6	27,6 ± 0,6	27,3 ± 2,7	30,0 ± 1,3	27,5 ± 1,4	27,5 ± 1,4	29,0 ± 2,0
Quantidade de animais e sexo:	4M	4M	4M	4M	4M	4M	4M	4M
Dose de folato conjugado ($\mu\text{g}/\text{kg}$):	11,9 ± 0,5	13,04 ± 1,12	12,6 ± 0,4	12,87 ± 1,53	11,7 ± 0,9	13,03 ± 1,05	1,58 ± 0,03	1,46 ± 0,08
Dose de ácido fólico diidratof ($\mu\text{g}/\text{kg}$):	0	195,1 ± 17,9	0	192,6 ± 22,9	0	191,7 ± 15,5	0	169,6 ± 9,4
($\mu\text{mol}/\text{kg}$):	0	0,41 ± 0,04	0	0,40 ± 0,05	0	0,40 ± 0,03	0	0,36 ± 0,02

	Porcentagem de dose de ^{99m}Tc injetada por grama (Massa de tecido molhado)							
	Péptido A ₁ - folato (EC 11)		Péptido A ₂ - folato (EC14)		Péptido A ₃ - folato (EC13)		HYNIC-folato	
Sangue:	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,31 ± 0,06	0,25 ± 0,01
Coração:	2,5 ± 0,3	0,36 ± 0,03	3,0 ± 0,5	0,24 ± 0,01	1,6 ± 0,1	0,20 ± 0,03	3,4 ± 0,3	0,28 ± 0,02
Pulmões:	1,2 ± 0,2	0,35 ± 0,03	1,6 ± 0,3	0,24 ± 0,02	1,1 ± 0,1	0,23 ± 0,02	1,2 ± 0,2	0,29 ± 0,03
Fígado e vesícula biliar:	5,4 ± 1,4	1,6 ± 0,1	4,5 ± 1,0	0,66 ± 0,07	3,5 ± 0,7	0,65 ± 0,04	3,9 ± 0,9	0,62 ± 0,02
Baço:	0,38 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,41 ± 0,06	0,15 ± 0,01	0,39 ± 0,06	0,15 ± 0,02	0,39 ± 0,12	0,17 ± 0,02
Rim (um):	67,8 ± 6,9	55,5 ± 2,3	44,2 ± 6,4	20,6 ± 2,4	54,5 ± 2,4	29,1 ± 2,2	41,2 ± 8,4	38,4 ± 2,6
Estômago, intestinos e conteúdo:	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,1	0,50 ± 0,10	2,5 ± 0,2	3,7 ± 0,7	1,5 ± 0,2	1,2 ± 1,0
Músculo:	1,8 ± 0,1	0,38 ± 0,06	2,4 ± 0,4	0,26 ± 0,02	1,7 ± 0,2	0,21 ± 0,03	2,2 ± 0,3	0,36 ± 0,06
Tumor:	2,95 ± 0,57	1,47 ± 0,24	5,57 ± 0,76	2,0 ± 0,5	5,46 ± 0,45	1,67 ± 0,24	4,64 ± 0,67	2,31 ± 0,27
<i>Tumor/sangue:</i>	13,7 ± 2,1	5,9 ± 0,9	29,3 ± 5,2	17,0 ± 4,5	22,5 ± 1,4	10,2 ± 1,5	15,1 ± 2,1	9,1 ± 1,0
<i>Tumor/fígado:</i>	0,57 ± 0,14	0,94 ± 0,09	1,3 ± 0,3	3,0 ± 0,6	1,6 ± 0,2	2,6 ± 0,3	1,3 ± 0,3	3,7 ± 0,5
<i>Tumor/rim:</i>	0,043 ± 0,005	0,027 ± 0,005	0,13 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,058 ± 0,010	0,11 ± 0,01	0,069 ± 0,003
<i>Tumor/Músculo:</i>	1,6 ± 0,3	3,9 ± 0,08	2,4 ± 0,6	7,7 ± 1,7	3,3 ± 0,3	8,2 ± 2,0	2,1 ± 0,4	6,5 ± 1,3

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. O sangue foi assumido por contabilizar 5,5 % da massa corporal total.

Razões de tumor/tecido de fundo com base nos dados da % de dose injetada por grama correspondente

† Dose de ácido fólico coinjetada com a dose de ^{99m}Tc -folato-conjugado.

$n = 3$

QUADRO 6

	^{99m} Tc-EC53		^{99m} Tc-EC53 mais Ácido Fólico		^{99m} Tc-EC53 mais EC53	
	Média	STD	Média	STD	Média	STD
Dose de artigo em teste (µg/kg)	50,0		50,0		50,0	
(nmol/kg)	67,0		67,0		67,0	
Concorrente codoseado (nmol/kg)			6700,0		6700,0	
Massa do tumor (g)	0,2	0,17	0,20	0,14	0,19	0,15
Animais	3F		3F		3F	
sangue	0,38	0,03	0,244	0,028	0,24	0,06
coração	1,09	0,28	0,15	0,03	0,19	0,03
pulmão	0,89	0,30	0,23	0,04	0,26	0,07
fígado	3,86	0,96	4,49	1,15	3,77	0,48
intestino	3,53	0,86	4,33	3,67	3,96	1,86
rim	77,99	6,19	10,12	6,91	7,97	1,52
músculo	0,76	0,31	0,11	0,04	0,12	0,06
baço	0,67	0,22	0,27	0,06	0,41	0,11
estômago	1,04	0,36	0,30	0,15	0,18	0,01
Tumor	11,77	4,26	0,53	0,11	1,88	1,56
Tumor/sangue	31,4	13,7	2,2	0,6	4,5	4,8
Tumor/fígado	3,4	2,2	0,1	0,0	0,3	0,4
Tumor/músculo	17,1	7,0	5,2	1,4	8,5	8,0
Tumor/rim	0,2	0,07	0,07	0,05	0,14	0,16

DISCUSSÃO

A invenção proporciona um método que envolve um conjugado de um folato e um quelante de radionuclídeo para o desenvolvimento clínico como um agente de imagiologia. O exemplo de um dito agente de imagiologia é o quelante de radionuclídeo à base de folato, ^{99m}Tc-EC20, de concepção nova, sintetizado e caracterizado radioquimicamente.

O ^{99m}Tc-EC20, um péptido de baixo peso molecular derivado de folato que contém uma ligação peptídica D-γ-Glu

(veja-se a Fig. 1), foi sintetizado utilizando um procedimento de síntese de fase sólida eficiente. Na sua forma natural, o folato (ou pteroil-glutamato) tem um único resíduo de glutamilo presente numa configuração L. No entanto, foi incorporado na molécula de EC20 um resíduo de enantiómero D-Glu. De forma importante, semelhante a EC20, a substituição do resíduo L-Glu no ácido fólico com um resíduo D-Glu não altera a capacidade do ácido fólico para se ligar a FR de elevada afinidade.

Foi descoberto que o EC20 quelava eficientemente o ^{99m}Tc , quando na presença de α -D-glucoheptonato e cloreto de estanho (II). Quando analisada por HPLC radioquímica, mais do que 95 % da formulação de ^{99m}Tc -EC20 resultante consistia de uma mistura de estereoisómeros *syn* e *anti*, cada um capaz de se ligar igualmente a FR com elevada afinidade (veja-se a Fig. 3). Cerca de 3 % do ^{99m}Tc na formulação foi quelado a EC20 em algum outro local da molécula de EC20 do que a esperada porção Dap-Asp-Cys. Embora este componente não tenha sido isolado em quantidade suficiente para a caracterização ótima, foi demonstrado que se liga a FR com elevada afinidade (veja-se a Ffig. 6). Finalmente, os restantes 2 % da radioatividade na formulação de ^{99m}Tc -EC20 foi atribuída ao ^{99m}Tc livre.

O ^{99m}Tc -EC20 demonstrou tanto uma associação dependente do tempo como da concentração com células FR-positivas. O ^{99m}Tc -EC20 foi rapidamente removido do sangue ($t_{1/2} \sim 4$ min), o que é importante para os agentes de imagiologia de diagnóstico, e o ^{99m}Tc -EC20 foi acumulado preferencialmente em grandes quantidades dentro de tumores FR-positivos.

O desempenho de ^{99m}Tc -EC20 foi comparado diretamente com o de um agente alvo de FR semelhante, folato ^{111}In -DTPA, utilizando dois métodos diferentes. Em primeiro lugar, ambos os radiofármacos à base de folato foram encontrados a competir igualmente com o ácido fólico para a ligação a KB FRs (veja-se a Fig. 3 e o Quadro 1). Em segundo lugar, a

biodistribuição de cada agente em ratinhos transportadores de tumores foi quase idêntica (veja-se o Quadro 2). Foram medidas a elevada absorção de tumor e as razões tumor para sangue para o ^{99m}Tc -EC20. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que, tal como com o folato ^{111}In -DTPA, o ^{99m}Tc -EC20 irá localizar efetivamente em tumores FR-positivos quando administrado clinicamente a pacientes.

Foram descritos anteriormente vários conjugados de ^{99m}Tc à base de folato. Estão disponíveis dados limitados de biodistribuição num conjugado de folato de ^{99m}Tc -12-amino-3,3,9,9-tetrametil-5-oxa-4,8 diaza-2,10-dioxima dodecanodinoá (OXA), no entanto foram relatados níveis moderados (~7 % ID/g) de absorção do marcador num tumor KB. Foram também relatados estudos que envolvem a biodistribuição de um conjugado de folato de ^{99m}Tc -etilenodicisteína em ratos transportadores de tumores mamários. Os ratos nesse estudo foram alimentados com uma dieta rica em folato. Assim, foram obtidas uma baixa absorção de tumor e baixas razões de tumor para sangue. Por último, um derivado de folato de ^{99m}Tc -6-hidrazinonicotinamido-hidrazido (HYNIC), (HYNIC-folato), mostrou acumular-se em grandes quantidades dentro de tumores 24JK-FBP. Curiosamente, o ^{99m}Tc -EC20 acumulou-se dentro de tumores M109 em níveis quase idênticos aos do HYNIC-folato em tumores 241K-FBP (~17 % ID/g) (Quadro 2). Estes dois agentes também exibiram razões de tumor para sangue de cerca de 50:1 às 4 horas após a injeção intravenosa.

Em resumo, foi criado um novo péptido derivado de folato para quelar eficientemente o ^{99m}Tc . Este novo composto, ^{99m}Tc -EC2D, liga-se avidamente às células de tumor FR-positivas *in vitro* e *in vivo*. O EC20 foi encontrado ligar-se a células em cultura de tumor (FR)-positivas de recetor de folato tanto de um modo dependente do tempo, como da concentração, com uma afinidade muito elevada ($K_D \sim$

3 nM). Utilizando um ensaio de afinidade relativa *in vitro*, o EC20 foi também encontrado competir eficazmente com o ácido fólico- ^3H para a ligação celular, quando apresentado quer por si só ou como um quelato de metal formulado. Após a injeção intravenosa em ratinhos Balb/c, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 foi rapidamente removido da circulação (plasma $t_{1/2} \sim 4$ min), e excretado na urina numa forma não metabolizada. Os dados de cintilografia gama e de estudos de biodistribuição quantitativa realizados em ratinhos Balb/c transportadores de tumor M109, confirmaram que o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 acumula-se predominantemente em tecidos de tumor e rim FR-positivos. Estes resultados mostram que o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 é um agente eficaz de imagiologia de radiodiagnóstico não invasivo, para a detecção de tumores FR-positivos. Foram também mostrados serem eficazes outros agentes de imagiologia relacionados com o EC20, incluindo o EC11, o EC 13, o EC14 e o EC53.

Todos os anos são diagnosticadas com cancro de ovário ~26000 mulheres nos Estados Unidos e menos de 50 % dessas mulheres sobrevivem mais de cinco anos. Uma das razões para a baixa taxa de sobrevivência é a dificuldade em diagnosticar este tipo de cancro. Por causa do medo da rutura de uma massa abdominal não identificada e do potencial de disseminação do cancro por toda a cavidade abdominal, não é muitas vezes realizada a biópsia por agulha fina. Em vez disso, o diagnóstico e identificação do estadio de massas de ovário suspeitas é feito geralmente por meio de laparotomia cirúrgica, que é um procedimento invasivo e caro. Uma vez que o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 se liga firmemente ao FR presente em grandes quantidades em cancros de ovário (entre outros), este radiofármaco proporciona um método barato, não invasivo, mas de confiança, para o diagnóstico precoce de cancro de ovário maligno. De forma importante, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 pode também ajudar a orientar o processo de decisão clínica, tornando possível um diagnóstico mais definitivo e precoce de doença recorrente ou residual.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor da presente solicitação de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

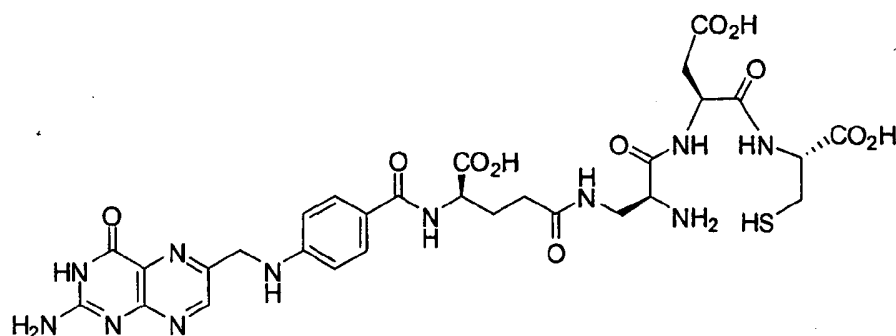
- US 86810614 B [0004]
- EP 86307849 A [0004]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **GASPARRO.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 15 December 1986, vol. 141 (2), 502-509 [0004]
- **WU, G. Y.** *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262 (10), 4429-4432 [0004]
- **MURRAY, G. J.; NEVILLE, D. M., JR.** *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255 (24), 1194-11948 [0004]
- **ROTH; MADDOX.** *J. Cell. Phys.*, 1983, vol. 115, 151 [0004]
- **OELTMANN; HEATH.** *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, 1028 [0004]
- **GUO et al.** *J. Nucl. Med.*, 1999, vol. 40 (9), 1563-1569 [0011]
- **LINDER et al.** *Soc. Nucl. Med., Proc. 47th Annual Meeting*, 2000, vol. 41 (5), 119 [0011]
- **ILGAN et al.** *Cancer Biother. & Radiopharm.*, 1998, vol. 13 (6), 427-435 [0011]
- **MATHIAS et al.** *Bioconjug. Chem.*, 2000, vol. 11 (2), 253-257 [0011]
- **ROUSCHIAS, G.** *Chem. Rev.*, 1974, vol. 74, 531 [0043]
- **WESTERHOFF et al.** *Mol. Pharm.*, 1995, vol. 48, 459-471 [0059]

REIVINDICAÇÕES

1. Um método de imagiologia de uma população de células tumorais num animal que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um composto da fórmula



quelado a um catião de um radionuclídeo.

2. O método de acordo com a reivindicação 1, em que as células tumorais são células tumorais positivas para recetores de folato.

3. O método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que as células tumorais são seleccionadas a partir do grupo que consiste em células de carcinoma, células de carcinoma nasofaríngeo, células de sarcoma, células de linfoma, células de linfoma de Burkitt, células de doença de Hodgkin, células de melanoma, células de mesotelioma e células de mieloma.

4. O método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que as células tumorais são seleccionadas a partir do grupo que consiste em células de cancro oral, células de cancro nasofaríngeo, células de cancro da tiroide, células de cancro endócrino, células de cancro da pele, células de cancro gástrico, células de cancro esofágico, células de cancro laríngeo, células de cancro da garganta, células de cancro pancreático, células de cancro de cólon, células de

cancro da bexiga, células de cancro ósseo, células de cancro do ovário, células de cancro do colo do útero, células de cancro uterino, células de cancro da mama, células de cancro testicular, células de cancro da próstata, células de cancro do reto, células de cancro do rim, células de cancro do fígado, células de cancro do pulmão e células de cancro do cérebro.

5. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o radionuclídeo é um radioisótopo de gálio, índio, cobre, tecnécio ou rénio.

6. O método de acordo com a reivindicação 5, em que o radionuclídeo é selecionado a partir de ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga e ^{68}Ga .

7. O método de acordo com a reivindicação 6, em que o radionuclídeo é ^{99m}Tc .

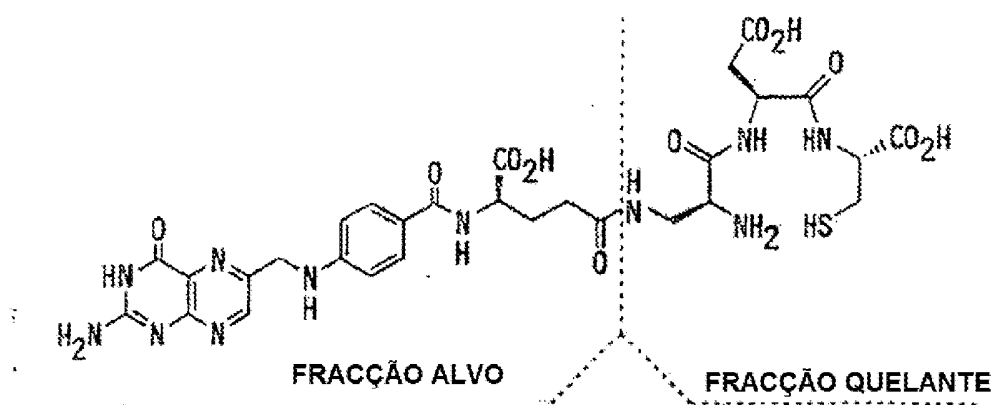


FIG. 1

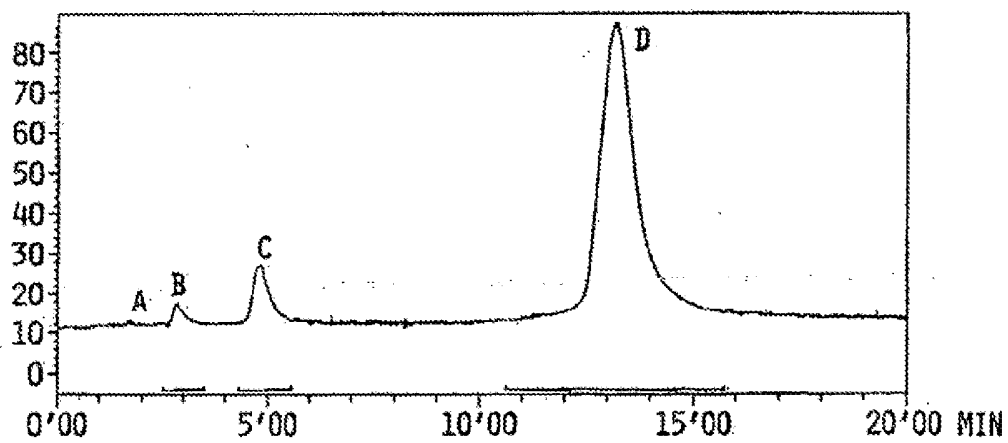


FIG. 2

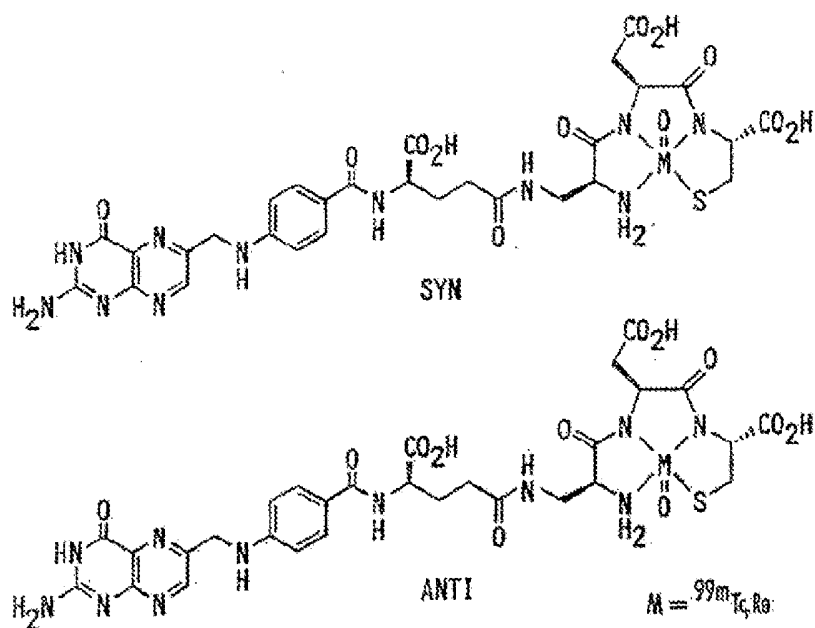


FIG. 3

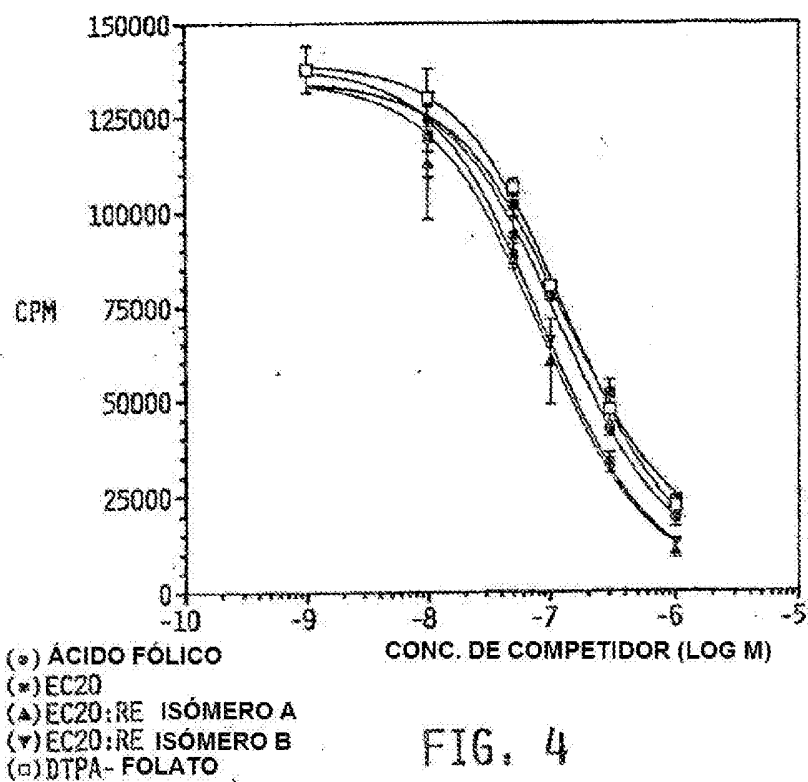


FIG. 4

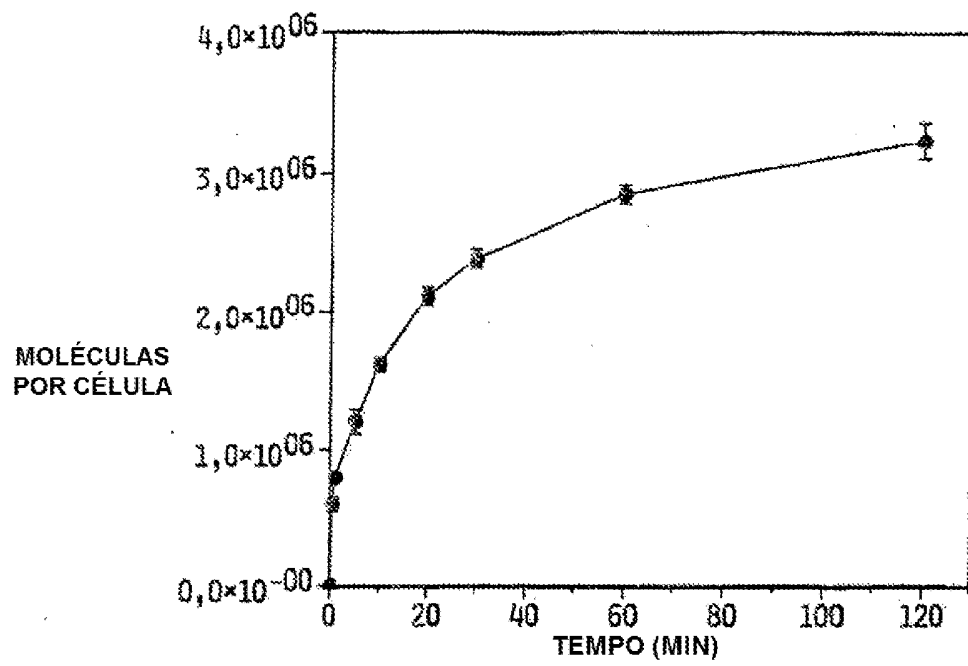


FIG. 5

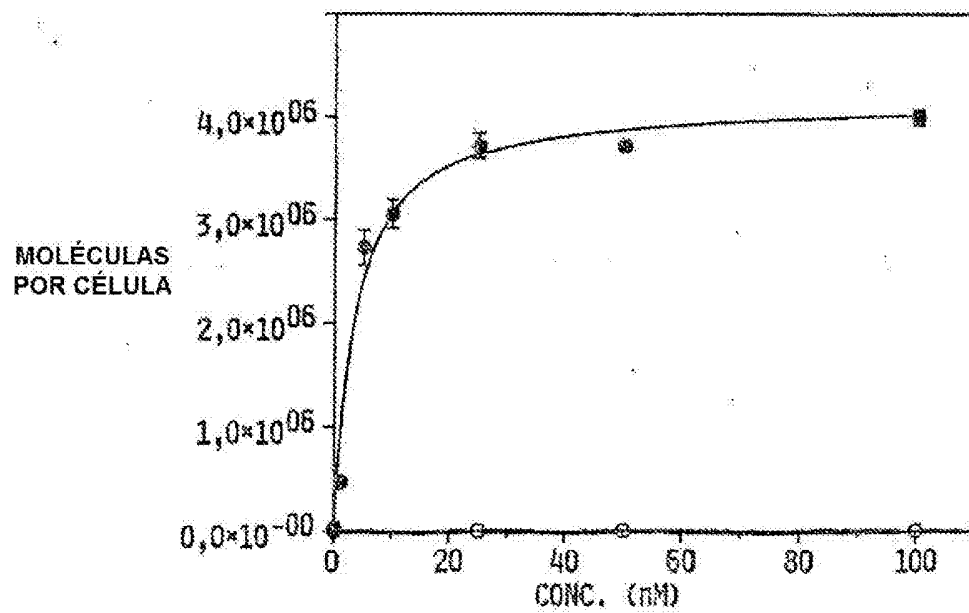


FIG. 6

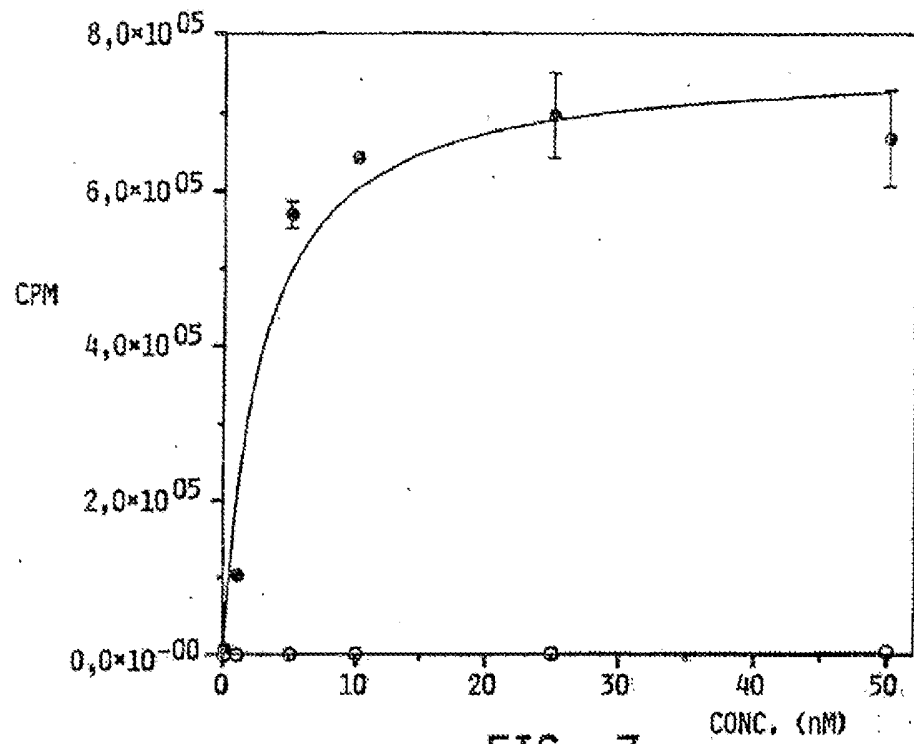


FIG. 7

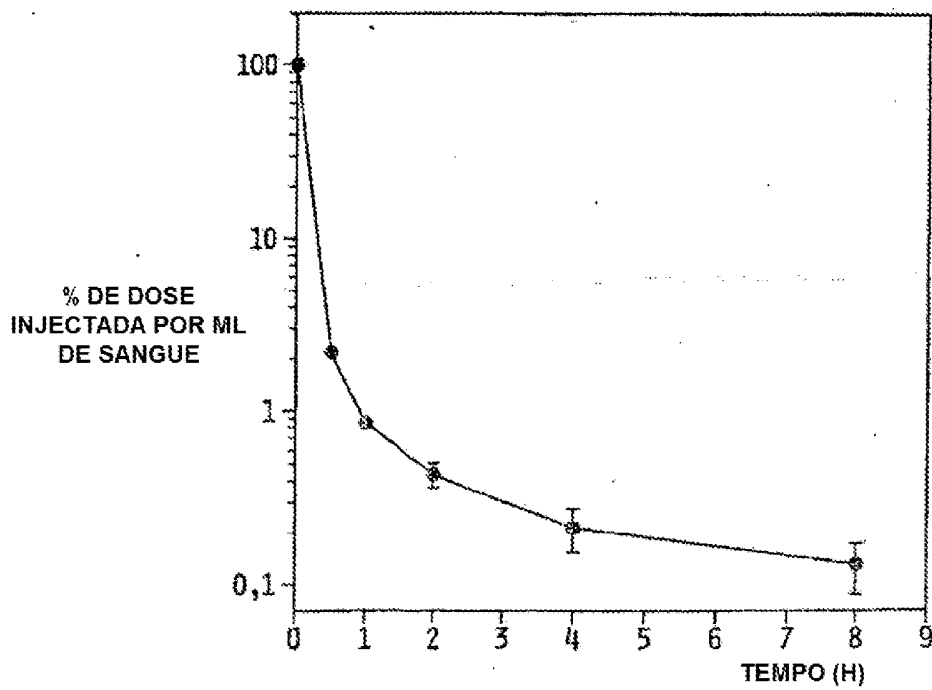


FIG. 8

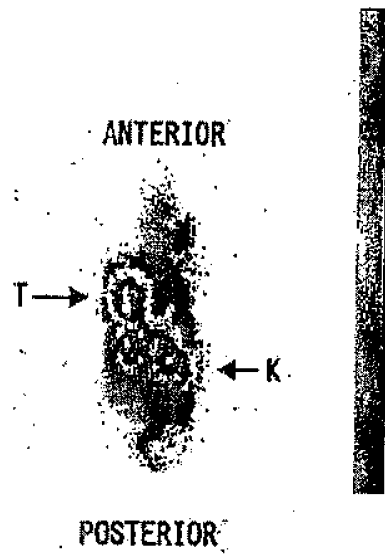


FIG. 9

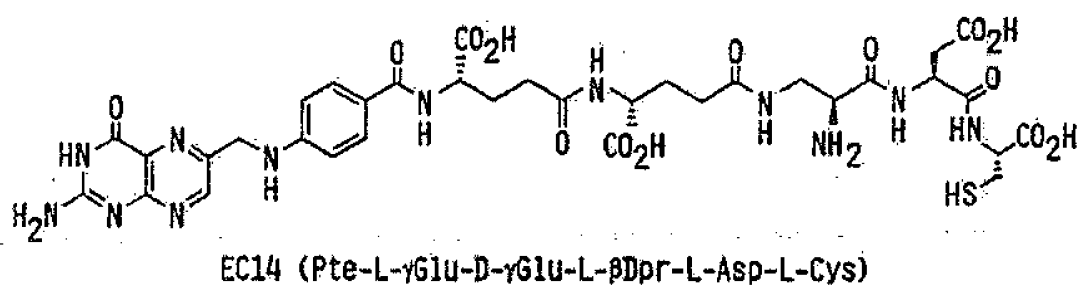
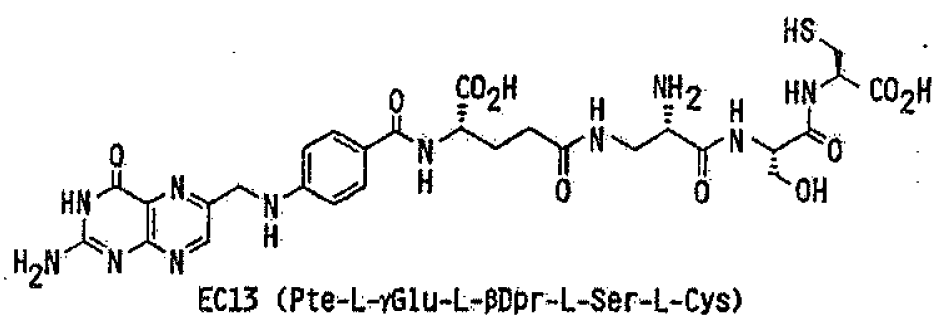
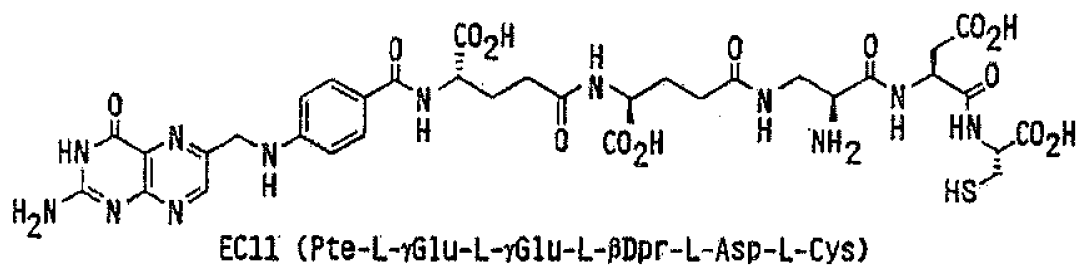


FIG. 10A

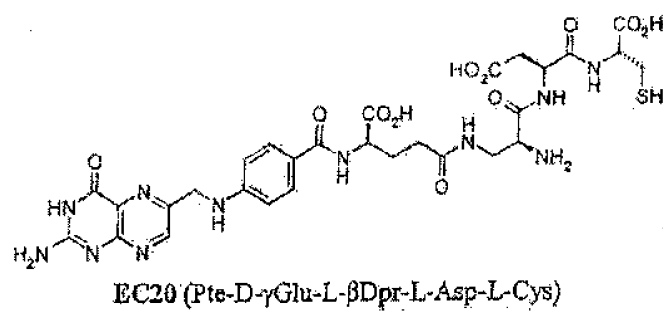
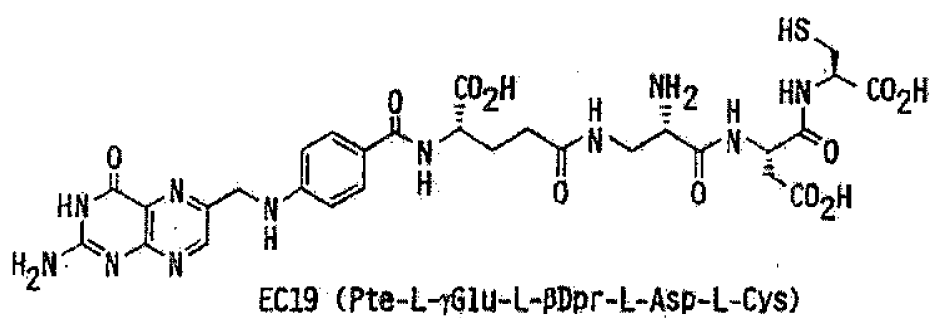
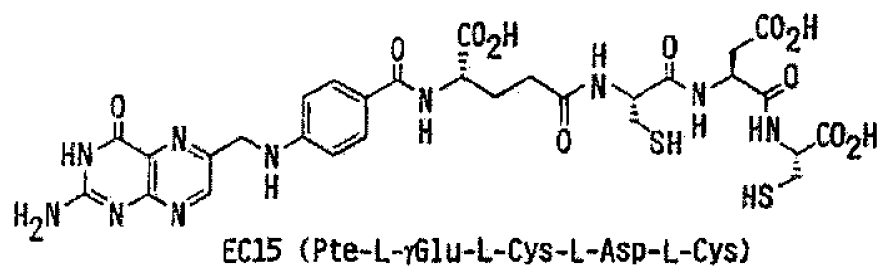
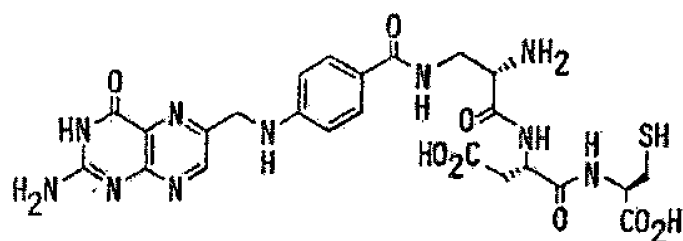
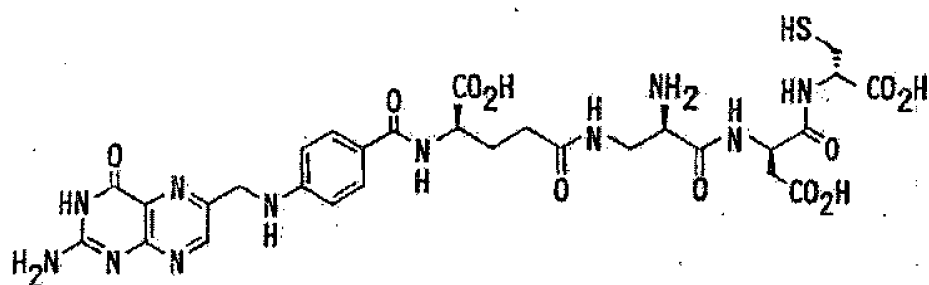


FIG. 10B



EC31 (Pte-L-βDpr-L-Asp-L-Cys)



EC53 (Pte-D-γGlu-D-βDpr-D-Asp-D-Cys)

FIG. 10C

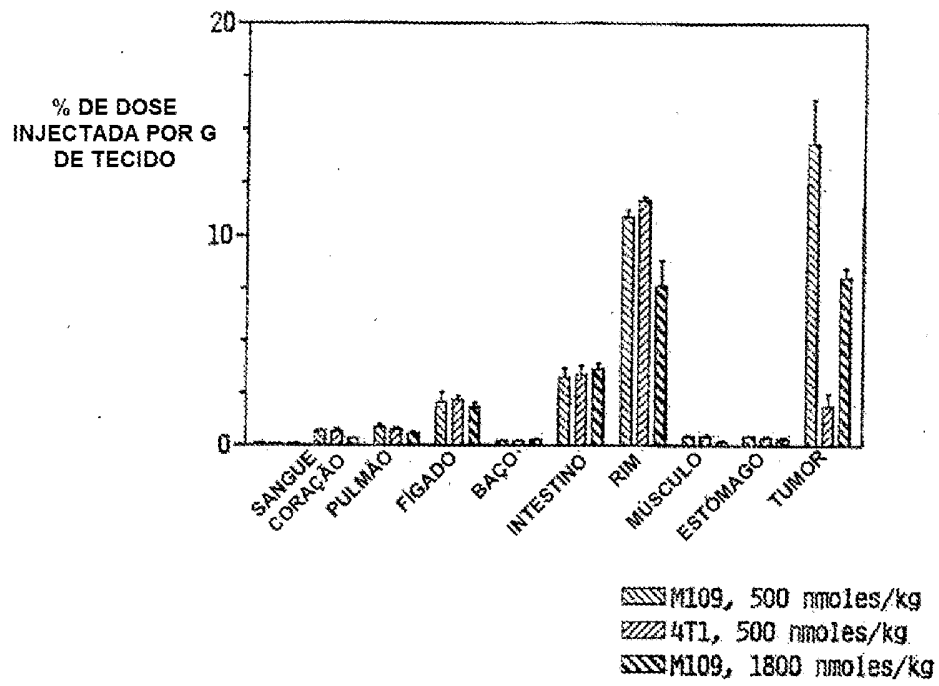


FIG. 11

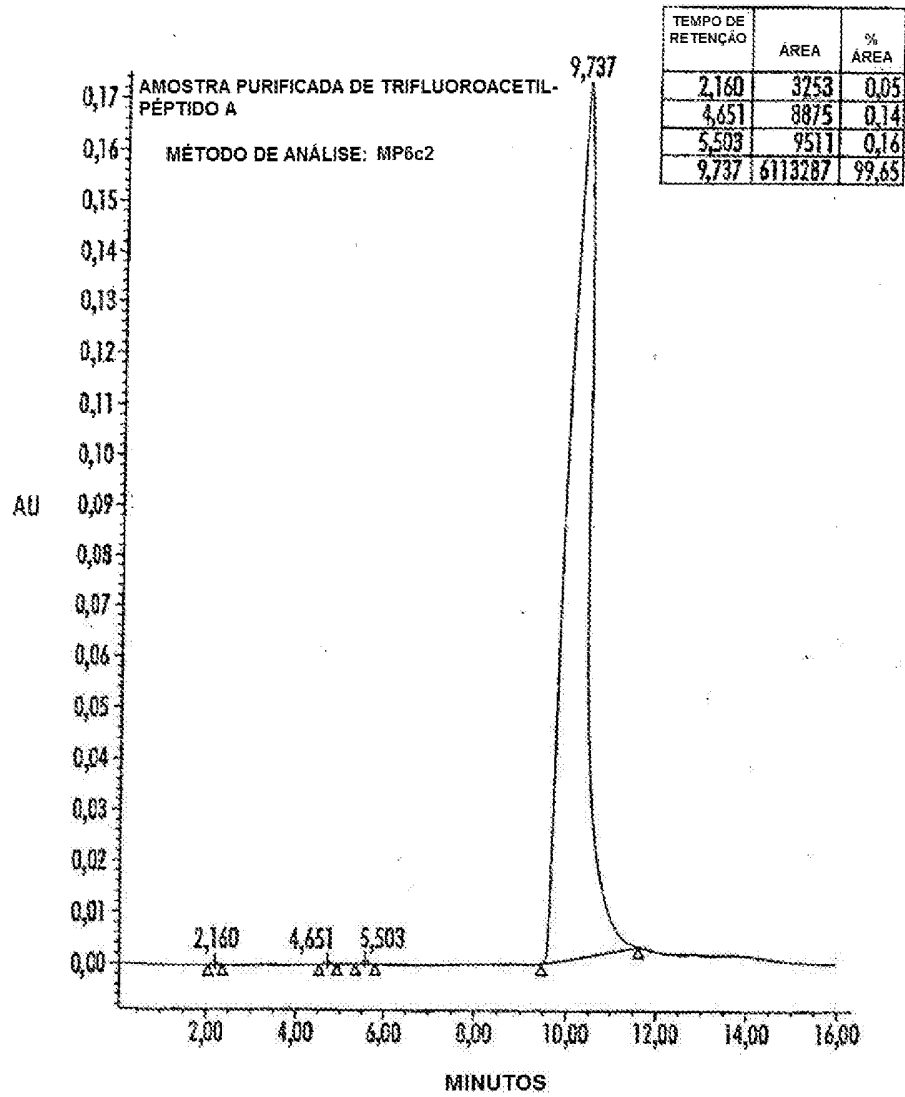


FIG. 12

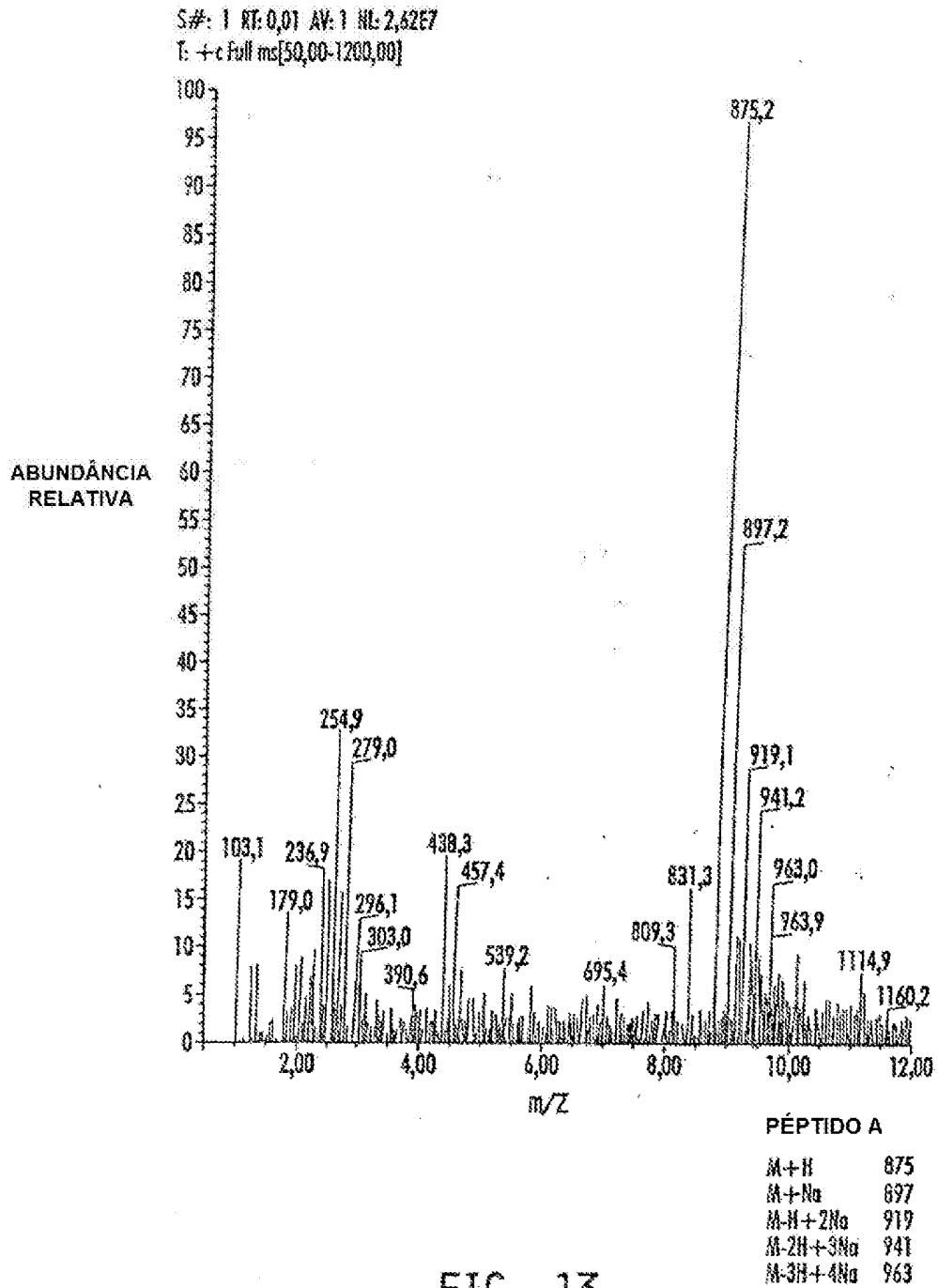


FIG. 13

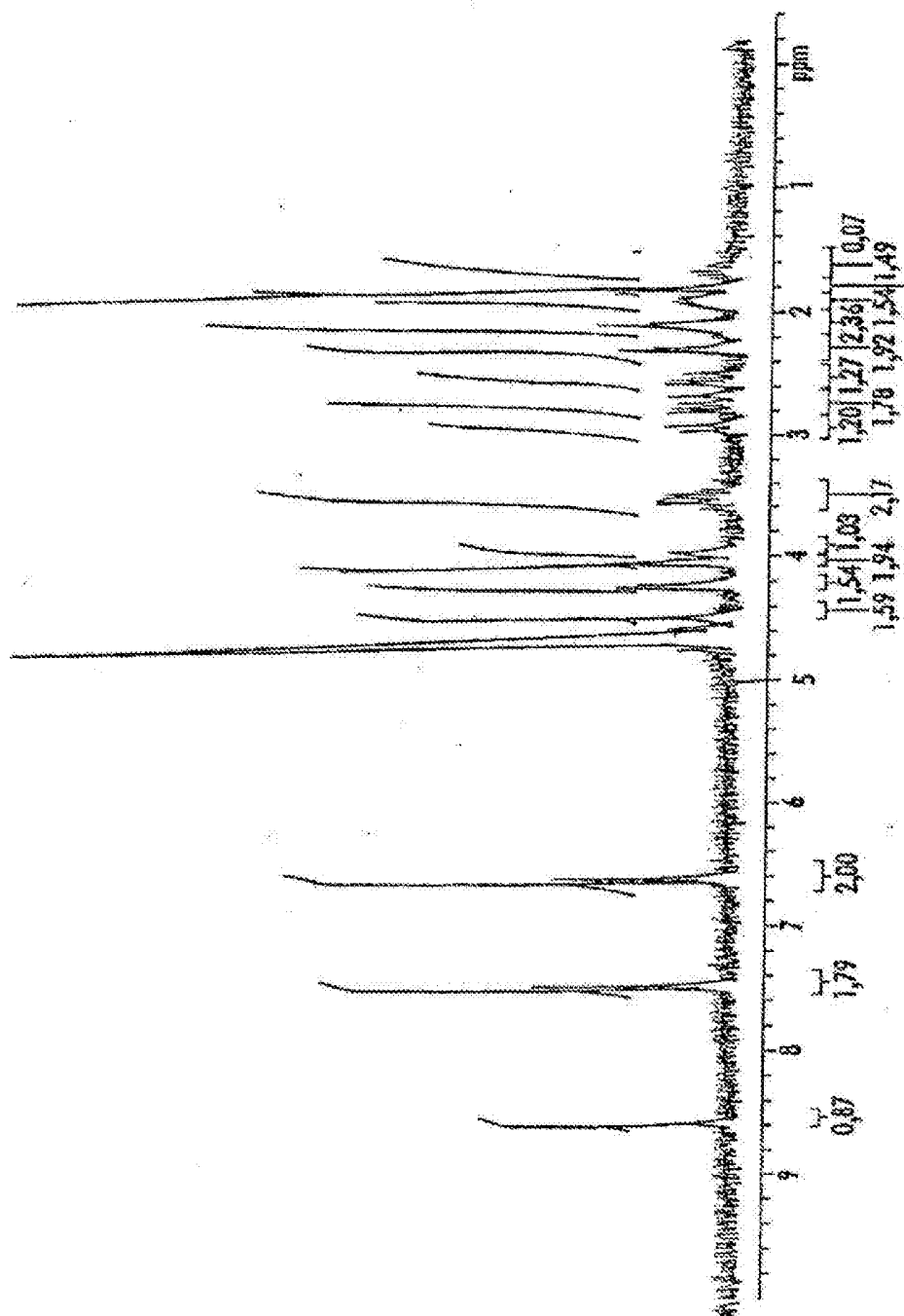


FIG. 14

PÉPTIDO A, SAL DE AMÔNIO EM D₂O

2,23

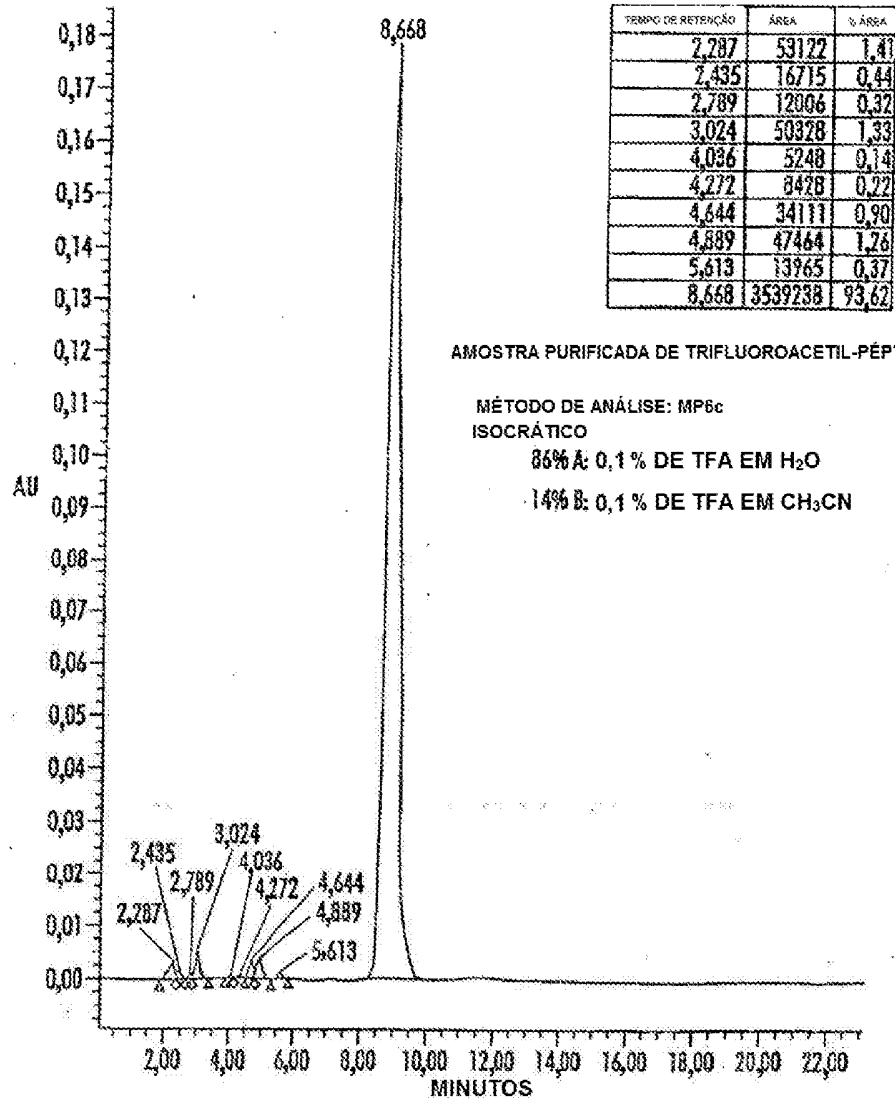


FIG. 15

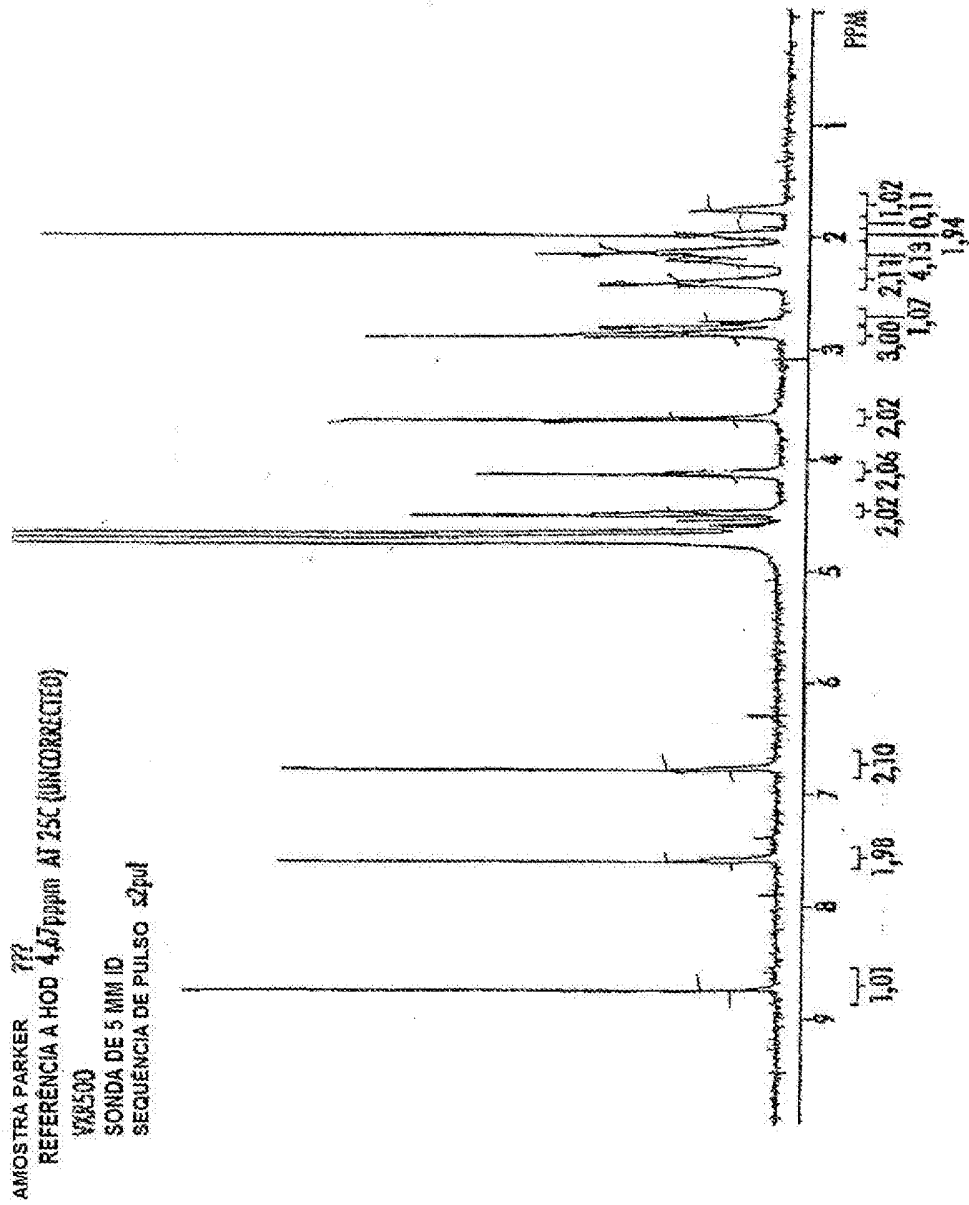


FIG. 16

INFO. DE AMOSTRA:
NOME DA AMOSTRA:
OBSERVAÇÃO:

OPERADOR: ADAM
AMOSTRA

POLARIDADE: POSITIVA

PARÂMETRO DE AQUISIÇÃO

FONTE: ESI

MODE: STD/NORMAL

SAÍDA DE CAP: 60.0 VOLT

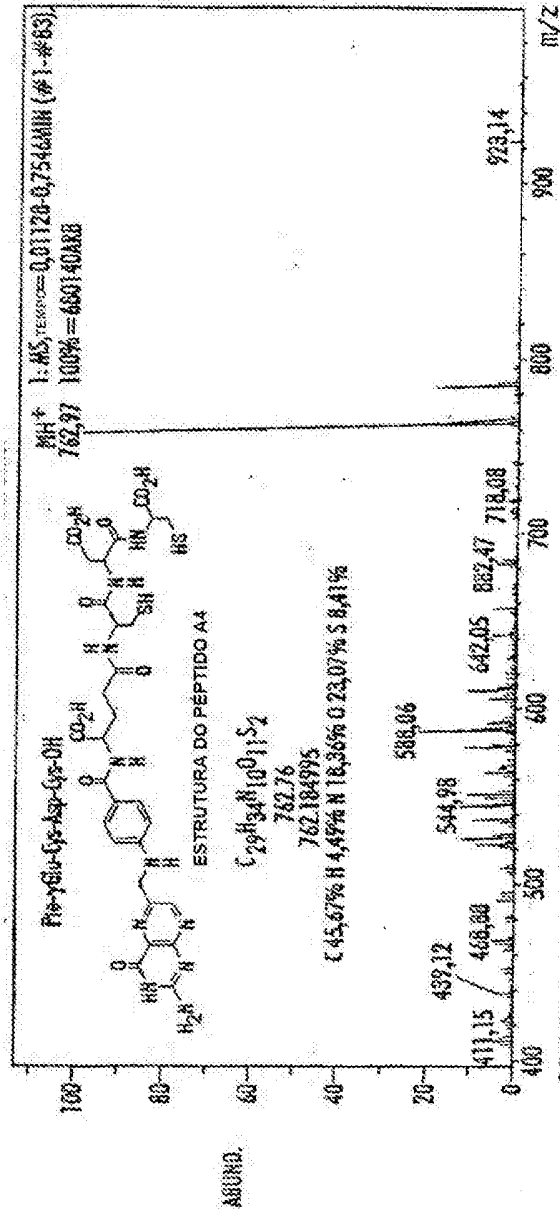
INTERVALO DE RASTREIA: 400,00 - 1000,00 m/z

TEMPO DE ACUM: 1152 HS

Raschke 1. 2804017

Conte	74 m/yr	74 m/yr
Conte	74 m/yr	74 m/yr

Soma: \$ ESPECTROS



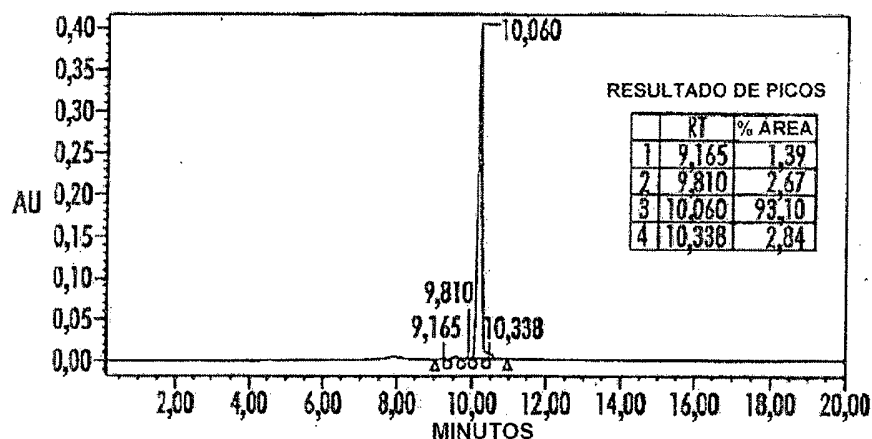
BRUKER DATAANALYSIS ESQUIRE-LC 1.49, BRUKER-FRANZEN ANALYTIK GMBH

76

FASE MÓVEL: A = 0,1 % DE TFA EM H₂O
 B = 0,1 % DE TFA EM CH₃CN
 COLUNA: SYMMETRY08 (4,6X150 mm). INJEÇÃO: 20 µl
 GRADIENTE: 0% DE B - 100% DE B 30MIN. TAXA DE FLUXO: 1 ml/min
 CROMATOGRAMA AT 280 nm
 BY LE-CUN, XU, Ph.d. ENDOCYTE, INC.

NOME DA AMOSTRA	A5 (OLD SIMPLE)	TIPO DE AMOSTRA:	DESCONHECIDO
FRASCO	1	DADOS ADQUIRIDOS:	
INJEÇÃO	1	CONJUNTO DO MÉTODO DE AQ.	60% DE B 100%B30MIN1MIMIN
VOLUME DE INJEÇÃO	20,00 µl	MÉTODO DE PROCESSAMENTO	PROCESSAMENTO PRÉ-
CANAL	996		DETERMINADO
TEMPO DE EXECUÇÃO	20,0 MINUTOS	DATA PROCESSADA	

CROMATOGRAMA EM AUTO-ESCALA



NOME DA AMOSTRA	A5 (OLD SIMPLE)	TIPO DE AMOSTRA:	DESCONHECIDO
FRASCO	1	DADOS ADQUIRIDOS:	
INJEÇÃO	1	CONJUNTO DO MÉTODO DE AQ.	60% DE B 100%B30MIN1MIMIN
VOLUME DE INJEÇÃO	20,00 µl	MÉTODO DE PROCESSAMENTO	PROCESSAMENTO PRÉ-
CANAL	996		DETERMINADO
TEMPO DE EXECUÇÃO	30,0 MINUTOS	DATA PROCESSADA	

CROMATOGRAMA EM AUTO-ESCALA

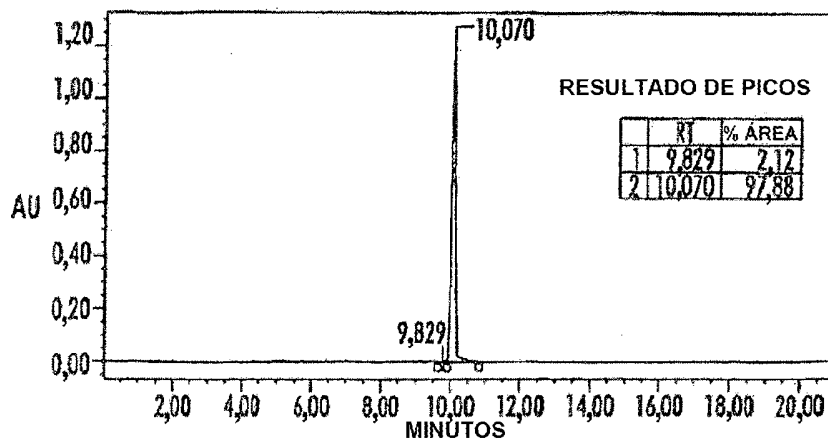
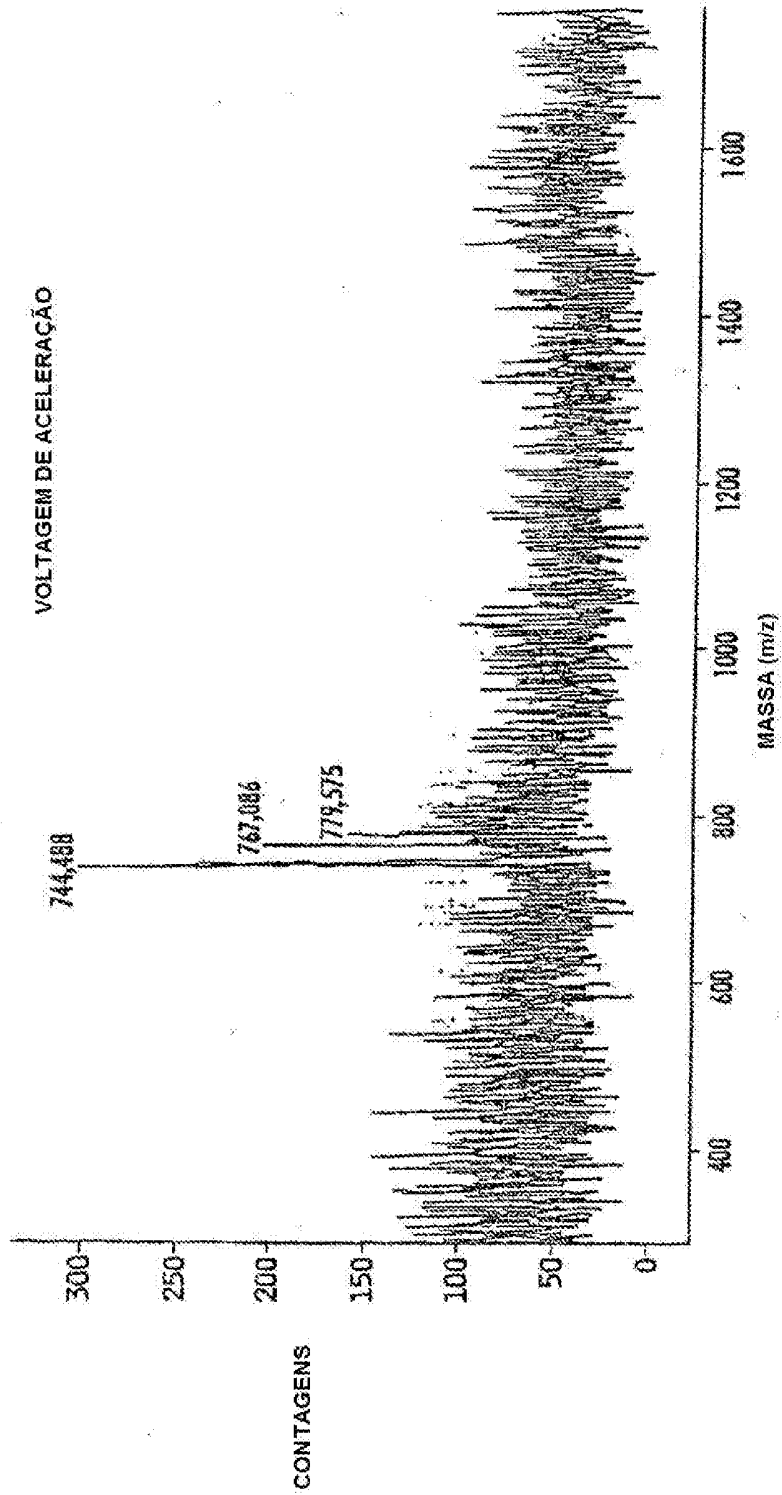


FIG. 18

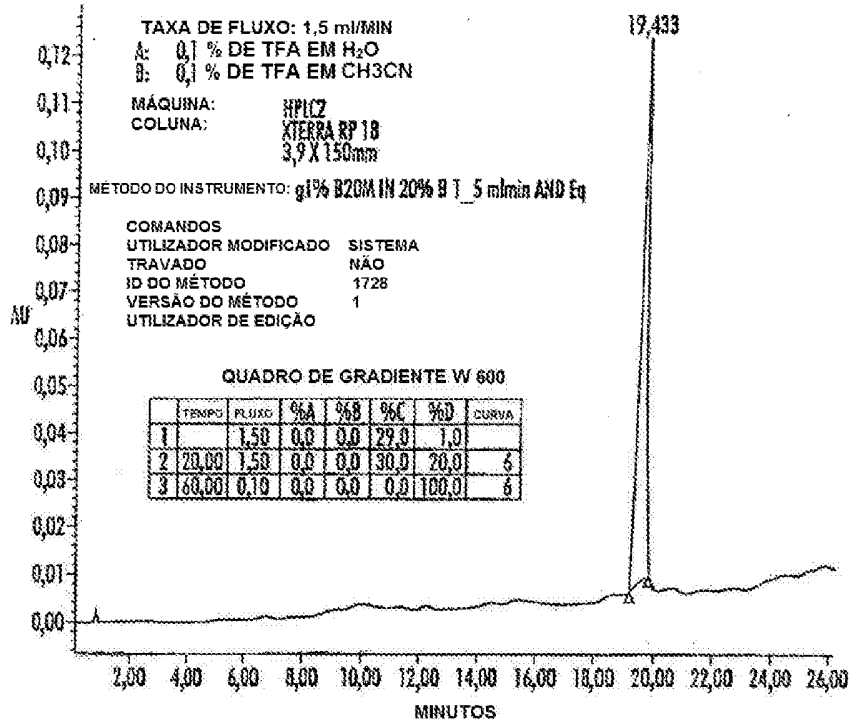


COMENTÁRIO Q5 VOLTAGEM DE ACELERAÇÃO: 28125
MÉTODO PRÉ-DETERMINADO COMPORTA DE MASSA BAIXA OFF
ÍONES NEGATIVOS: ON

LASE: 1200
MÉDIAS DOS RASTREIOS: 63
PRESSÃO: 9,21e-07

FIG. 19

NOME DO PROJECTO: EC20
 NOME DA AMOSTRA: Pta-βDap-Asp-Cys FRACTION #2
 VOLUME DE INJEÇÃO: 20.00ul
 DATA ADQUIRIDA:
 CONJUNTO DO MÉTODO DE AQ. g1% B20M IN 20% B 1_5 ml/min AND Eq
 MÉTODO DE PROCESSAMENTO: 15
 DATA ACTUAL DATA PROCESSADA:



RESULTADOS DE PICO

NOME	RT	AREA	ALTURA	%AREA
1	19.433	96094	7436	1.37

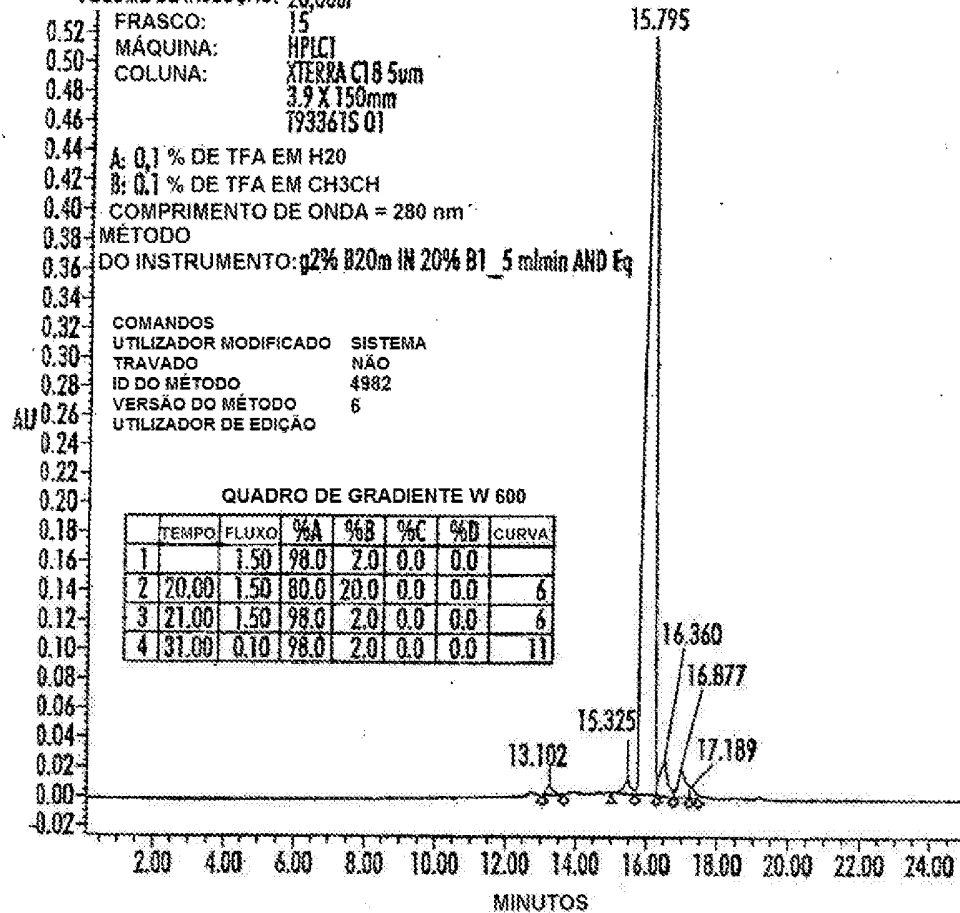
FIG. 20

NOME DO PROJECTO: EC20
 NOME DA AMOSTRA: EC53 AFTER LYOPH
 DATA ADQUIRIDA: ---
 CONJUNTO DO MÉTODO DE AQ: g2% 820m IN 20% B1_5 ml/min AND Eq

VOLUME DE INJEÇÃO: 20,00ul
 0.52 FRASCO: 15
 0.50 MÁQUINA: HPLC1
 0.48 COLUNA: XTERRA C18 5um
 0.46 3.9 X 150mm
 0.44 T93361S 01
 0.42 A: 0,1 % DE TFA EM H2O
 0.40 B: 0,1 % DE TFA EM CH3CH
 0.38 COMPRIMENTO DE ONDA = 280 nm
 0.36 MÉTODO
 0.34 DO INSTRUMENTO: g2% 820m IN 20% B1_5 ml/min AND Eq
 0.32 COMANDOS
 0.30 UTILIZADOR MODIFICADO SISTEMA
 0.28 TRAVADO NÃO
 0.26 ID DO MÉTODO 4982
 0.24 VERSÃO DO MÉTODO 6
 0.22 UTILIZADOR DE EDIÇÃO

QUADRO DE GRADIENTE W 600

TEMPO	FLUXO	%A	%B	%C	%D	CURVA
1		1.50	98.0	2.0	0.0	0.0
2	20.00	1.50	80.0	20.0	0.0	0.0
3	21.00	1.50	98.0	2.0	0.0	0.0
4	31.00	0.10	98.0	2.0	0.0	0.0



RESULTADOS DE PICO

NOME	RT	ÁREA	ALTURA	% ÁREA
1	13.102	96094	7436	1.37
2	15.325	131550	9546	1.88
3	15.795	5974085	505938	85.48
4	16.360	390992	26982	5.59
5	16.877	322515	21694	4.61
6	17.189	73995	7670	1.06

FIG. 21

20/23

#1STATUS LOG TIME: 0,01

FONTE DE API

VOLTAGEM DE FONTE

CORRENTE DE FONTE

TERMOPAR DO VAPORIZADOR

TEMPERATURA DO VAPORIZADOR

TAXA DE FLUXO DO GÁS DE BAINHA

TAXA DE FLUXO DO GÁS AUX.

RTD CAPILAR

VOLTAGEM CAPILAR

TEMP. CAPILAR

FORNECIMENTO DE 8 KV NÃO LIMITE

3.52

0.24

NÃO

-0.00

58.98

3.17

SIM

20.64

224.60

NÃO

VÁCUO

VACUO OK

PRESSÃO DE CALIBRAÇÃO DE IÃO

ESTADO DE CALIBRAÇÃO DE IÃO

CALIBRAÇÃO DE IÃO

PRESSÃO DE CONVECÇÃO

CALIBRAÇÃO DE CONVECÇÃO

BOMBA TURBO

ESTADO

VIDA (HORAS)

VELOCIDADE (RPM)

POTÊNCIA (WATTS)

TEMPERATURA (°C)

SIM

SIM

ON

1.52

SIM

0.84

RUNNING

16359.00

.60000.00

39.20

40.00

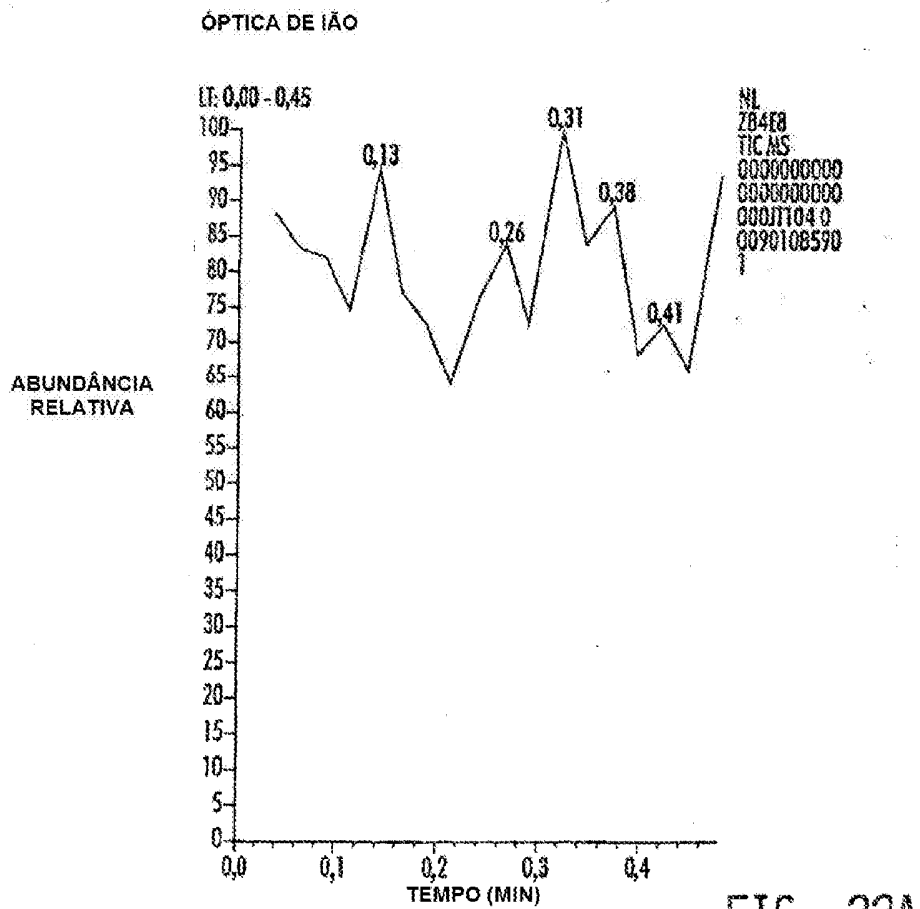


FIG. 22A

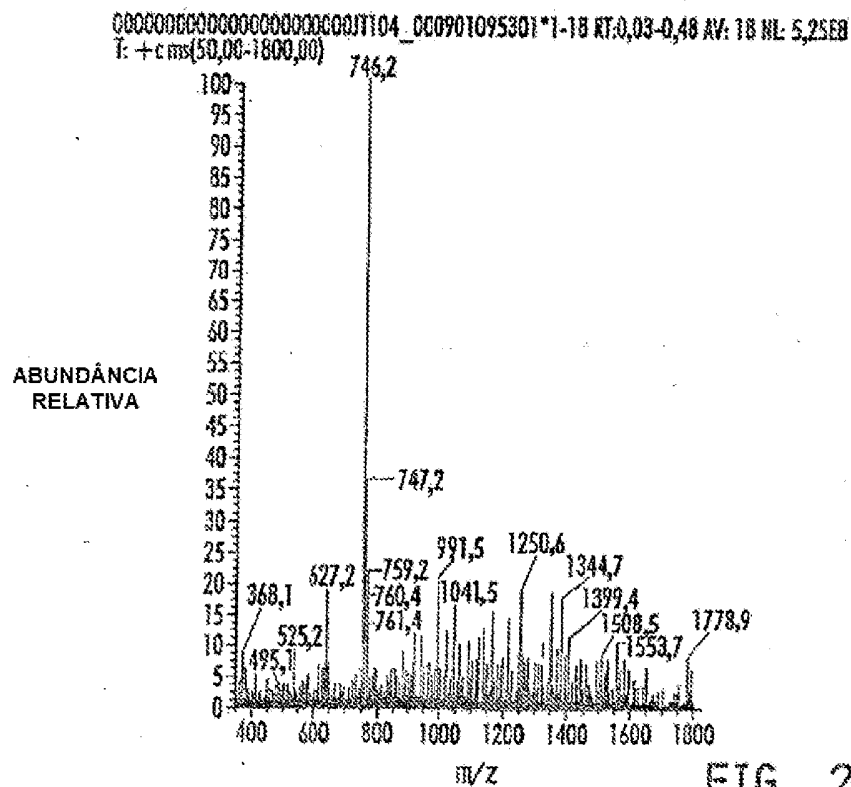
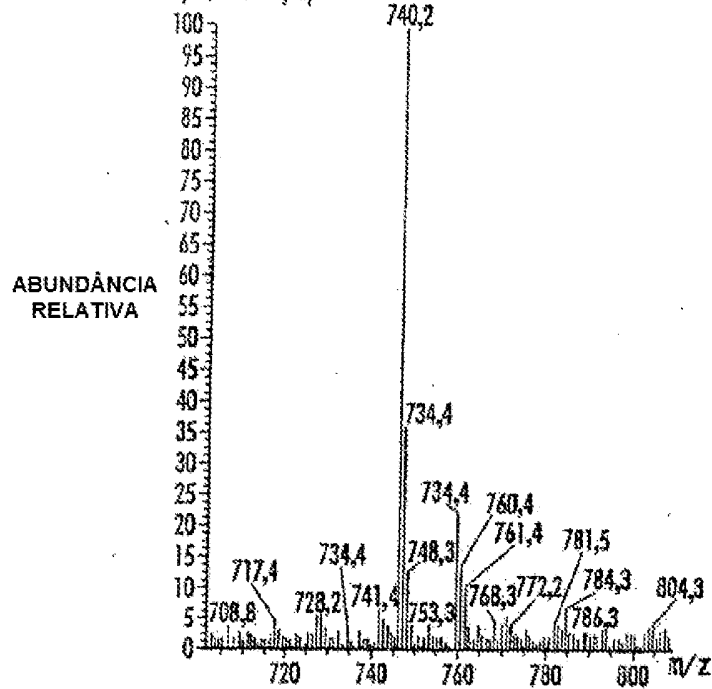


FIG. 22B

#1STATUS LOG TIME: 0,01

FONTE DE API

VOLTAGEM DE FONTE

CORRENTE DE FONTE

TERMOPAR DO VAPORIZADOR

TEMPERATURA DO VAPORIZADOR

TAXA DE FLUXO DO GÁS DE BAINHA

TAXA DE FLUXO DO GÁS AUX.

RTD CAPILAR

VOLTAGEM CAPILAR

TEMP. CAPILAR

FORNECIMENTO DE 8 KV LIMITE

4.52

19.48

HO

-0.00.

58.93

3.06

SIM

-10.10

225, 60

NÃO

VÁCUO

VACUO OK

PRESSÃO DE CALIBRAÇÃO DE IÃO

ESTADO DE CALIBRAÇÃO DE IÃO

CALIBRAÇÃO DE IÃO

PRESSÃO DE CONVECÇÃO

CALIBRAÇÃO DE CONVECÇÃO

SIM

SIM

ON

1.52

SIM

0.84

BOMBA TURBO

ESTADO

VIDA (HORAS)

VELOCIDADE (RPM)

POTÊNCIA (WATTS)

TEMPERATURA (°C)

RUNNING

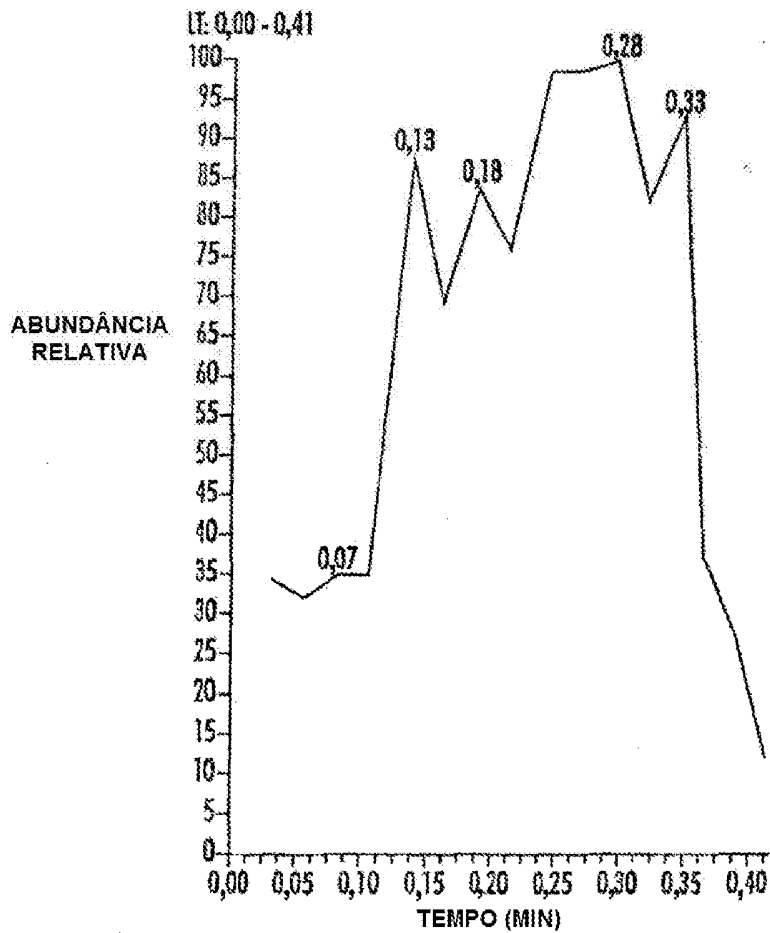
16359.00

60000.00

39.20

40.00

ÓPTICA DE IÃO



NL
29968
TIC MS
0000000000
0000000000
0000000000
0000000000
0090109633
8

FIG. 23A

00000000000000000000JT104 - 000901095338*1-18 RT:0,02-0,41 AV: 16 NL: 1,73E5
T: +c ms(50,00-1800,00)

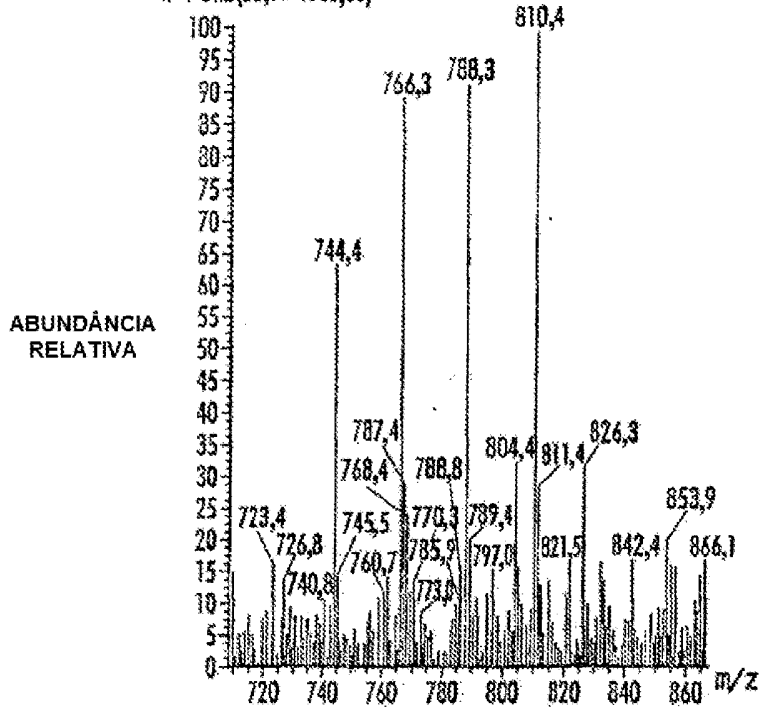
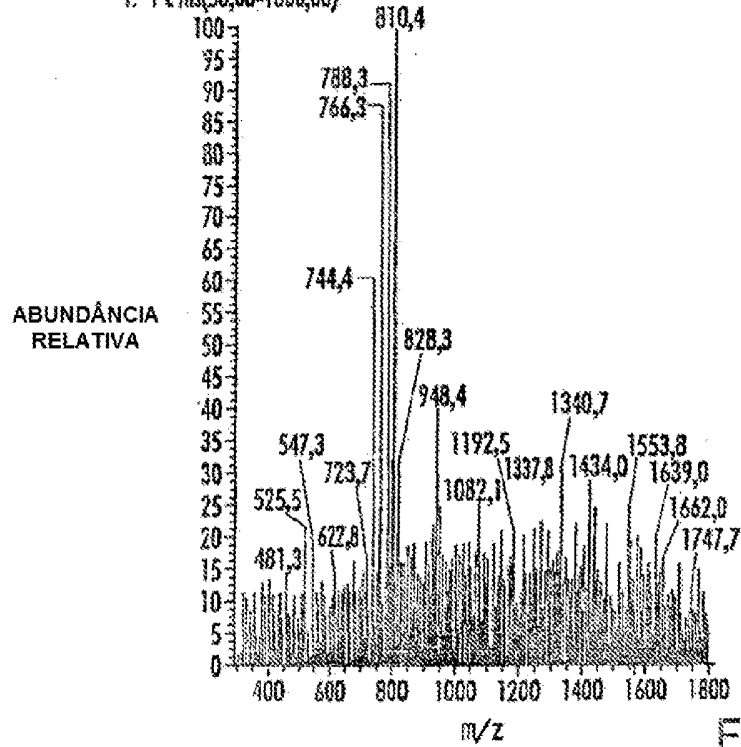
[illegible]

FIG. 23B