



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 307 325**

⑤1 Int. Cl.:
A61B 19/00 (2006.01)
A61K 51/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **98966733 .2**
⑧6 Fecha de presentación : **23.11.1998**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **0961591**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.1999**

⑤4 Título: **Método para aumentar la acumulación en tejidos de compuestos radiomarcados.**

③0 Prioridad: **24.11.1997 US 977520**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

⑦3 Titular/es: **Board of Supervisors of Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College**
c/o Louisiana State University System
P.O. Box 16070
Baton Rouge, Louisiana 70893, US

⑦2 Inventor/es: **Woltering, Eugene, A. y**
Espenan, Gregory, D.

⑦4 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para aumentar la acumulación en tejidos de compuestos radiomarcados.

El beneficio de la fecha de presentación del 24 de noviembre de 1997 de la solicitud provisional con número de serie 60/nnn,nnn (que era una conversión de la solicitud no provisional con número de serie 08/977.520) es reivindicado según 35 U.S.C. § 119(e) en los Estados Unidos. El beneficio de la fecha de presentación del 24 de noviembre de 1997 de la solicitud con número de serie 08/977.520 es reivindicado conforme a los tratados aplicables y convenciones fuera de los Estados Unidos.

Campo técnico

Esta invención se refiere a un método para aumentar la acumulación y retención en tejidos de compuestos radiomarcados (radioligandos), mejorándose así su valor terapéutico y diagnóstico.

Antecedentes de la técnica

Los compuestos radiomarcados son usados tanto para la detección de tumores como para la terapia de tumores. Muchas células tumorales tienen una mayor densidad de receptores de células para diversos compuestos circulantes que las células no tumorales; por ejemplo, los tumores endocrinos muestran una alta densidad de receptores de la superficie celular para somatostatina, y los gliomas cerebrales muestran una alta densidad de receptores para el factor de crecimiento epidérmico. Así, un compuesto radiomarcado que se una a estos receptores celulares se unirá preferencialmente a las células tumorales. Además, la angiogenesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del microsistema vascular establecido, es un procedimiento crítico para el crecimiento tumoral. Los tumores primarios y la metástasis no crecerán más allá de 2 mm de diámetro sin un mayor suministro vascular. Las células angiogénicas también tienen una densidad más alta de receptores celulares para diversos compuestos circulantes que las de los tejidos vasculares no angiogénicos; por ejemplo, los receptores tanto para somatostatina como para el factor de crecimiento endotelial vascular son más abundantes en el tejido angiogénico. Así, también puede ser detectado un tumor por la unión de compuestos radiomarcados a las células angiogénicas que están estrechamente asociadas a las células tumorales.

Un agente de visualización de tumores ideal maximizaría la radiactividad en las células diana, y reduciría al mínimo la señal de fondo, causando una imagen bien definida de los focos tumorales. Por ejemplo, ¹¹¹In-DTPA-D-Phe-1-octreotido y el péptido intestinal ¹²³I-vasoactivo, dos radioligandos basados en receptores, han sido usados para localizar tumores primarios en el sistema endocrino así como lesiones hepáticas metastáticas. Véase, A. Kurtaran, *et al.*, "Vasoactive Intestinal Peptide and Somatostatin Receptor Scintigraphy for Differential Diagnosis of Hepatic Carcinoid Metastasis", *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. **38**, pp. 880-881 (1997).

Un agente de terapia con radioligandos ideal se acumularía selectivamente en las células diana. La eficacia de la radioterapia es debida a la destrucción de células que se dividen dando como resultado un daño inducido por radiación al ADN celular. Véase W.D. Bloomer *et al.*, "Therapeutic Application of Iodine-125 Labeled Iododeoxyuridine in an Early Ascites Tumour Model", *Current Topics in Radiation Research Quarterly*, vol. **12**, vol. 12, pp. 513-25 (1977). Tanto en aplicaciones terapéuticas como imagiográficas, cualquier radioligando no unido que se difunda es rápidamente limpiado por los sistemas excretores, lo que ayuda a proteger a los órganos y tejidos normales. El radioligando también puede ser degradado por los procesos corporales que aumentarán la eliminación del radioisótopo libre. Véase G.A. Wiseman *et al.*, "Therapy of Neuroendocrine Tumors with Radiolabelled MIBG and Somatostatin Analogues", *Seminars in Nuclear Medicine*, vol. XXV, No. **3**, pp. 272-278 (1995).

Tanto en la visualización de tumores como en su terapia, un objetivo clínico es maximizar la cantidad de compuesto radiomarcado absorbido por el tumor. La cantidad de radioligando que se acumula en células diana depende de muchos factores, por ejemplo: (1) el gradiente de concentración del radioligando entre la sangre y el tejido diana; (2) el número de receptores celulares, de membrana o intracelulares, y la afinidad de estos receptores por el radioligando; (3) las concentraciones relativas de ligando marcado y no marcado que compiten por un receptor dado; (4) la velocidad de recambio para los receptores celulares; (5) la capacidad de la célula para almacenar al radioligando; y (6) la degradación del radioligando dentro de la célula. Véase R.K. Rippley *et al.*, "Effects of Cellular Pharmacology on Drug Distribution in Tissues", *Biophysical Journal*, vol. **69**, pp. 825-839 (1995).

Los compuestos radiomarcados son administrados típicamente por inyección intravenosa, en bolo. En algunos casos, se han administrado compuestos radiomarcados como infusiones de 30 a 60 minutos, por lo general para limitar los efectos secundarios del fármaco, no para aumentar su eficacia. Véase, por ejemplo, H.P. Kalofonos *et al.*, "Antibody Guided Diagnosis and Therapy of Brain Gliomas using Radiolabeled Monoclonal Antibodies Against Epidermal Growth Factor Receptor and Placental Alkaline Phosphatase", *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. **30**, pp. 1636-45 (1989); I. Virgolini *et al.*, "Vasoactive Intestinal Peptide-Receptor Imaging for the Localization of Intestinal Adenocarcinomas and Endocrine Tumors", *The New England Journal of Medicine*, vol. **331**, pp. 1116-21 (1994); G.A. Wiseman *et al.*, "Therapy of Neuroendocrine Tumors with Radiolabelled MIBG and Somatostatin Analogues", *Seminars in Nuclear Medicine*, vol. XXV, no. **3**, pp. 272-78 (1995); S.W.J. Lamberts *et al.*, "Somatostatin-Receptor Imaging in the Localization of Endocrine Tumors", *The New England Journal of Medicine*, vol. **323**, pp. 1246-49 (1990); E.P. Krenning *et al.*, "Somatostatin Receptor Scintigraphy with Indium-111-DTPA-D-Phe-1-Octreotide in Man: Metabolism, Dosimetry and Comparison with Iodine-123-Tyr-3-Octreotide", *The Journal of Nuclear Medicine*,

vol. **33**, pp. 652-58 (1992); E.P. Krenning *et al.*, "Localisation of Endocrine-Related Tumours with Radioiodinated Analogue of Somatostatin", *The Lancet*, vol. 1989, no. **1**, pp. 242-244 (1989). Hay una publicación que habla de una duración de la infusión de dos (2) horas. Véase J. A. Carrasquillo *et al.*, "Indium-111 T101 Monoclonal Antibody is Superior to Iodine-131 T101 in Imaging of Cutaneous T-Cell Lymphoma", *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. **28**, pp. 281-87 (1987).

La capacidad de una célula para absorber un compuesto radiomarcado a corto plazo está limitada por el número de receptores celulares o proteínas de transporte para el compuesto en la membrana de la célula o dentro de la célula. Cuando el radioligando se administra por inyección en bolo, la farmacocinética de unión dicta que la respuesta del radioligando esté directamente asociada con la cantidad inyectada sólo a concentraciones bajas del radioligando. A concentraciones más altas, los receptores se vuelven saturados para el radioligando. Véase H. Zhu *et al.*, "Potential and Limitations of Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy with Monoclonal Antibodies", *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. **38**, no. 5, pp. 731-41 (1997); y R.M. Kessler *et al.*, "High Affinity Dopamine D2 Receptor Radioligands. 1. Regional Rat Brain Distribution of Iodinated Benzamides", *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. **32**, pp. 1593-1600 (1991). Estos receptores saturados no son capaces de unir más radioligando hasta que el receptor libere al radioligando, o el complejo receptor-radioligando haya sido transportado a otra parte de la célula y el receptor haya sido reciclado para unir de nuevo una nueva molécula del radioligando. Como el radioligando desunido circulante se elimina rápidamente, cuando los receptores son libres de aceptar otra molécula del radioligando, el radioligando puede ya no estar presente. Así, la acumulación de radioligando depende de la disponibilidad del radioligando desunido, y del tiempo de reciclaje de los receptores celulares y de las proteínas de transporte.

El reciclaje de los receptores celulares depende del destino del complejo ligando-receptor. Muchos, si no la mayoría, de los compuestos peptídicos (incluyendo hormonas peptídicas y proteicas) que se unen a los receptores de superficie son interiorizados como un complejo ligando-receptor por endocitosis, es decir, por invaginación de la membrana plasmática. Los ejemplos de péptidos que se ha demostrado que se interiorizan como parte de un complejo ligando-receptor incluyen el factor de crecimiento del sistema nervioso, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, colecistoquinina, el factor de crecimiento endotelial vascular, el péptido intestinal vasoactivo, el péptido liberador de gastrina, el factor inhibidor de la leucemia, somatostatina, oxitocina, bombesina, calcitonina, arginina vasopresina, angiotensina II, el péptido atrial natriurético, la insulina, glucagón, prolactina, la hormona del crecimiento, la gonadotropina, la hormona liberadora de tirotropina, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento, la hormona liberadora de gonadotropina, la hormona liberadora de corticotropina, interleuquinas, interferones, transferrina, sustancia P, neuromedina, neurotensina, neuropéptido Y y varios opioides. Esta internalización dura unos minutos o incluso horas. Véase G. Morel, "Internalization and Nuclear Localization of Peptide Hormones", *Biochemical Pharmacology*, vol. **47**(1), pp. 63-76 (1994); D. Nouel *et al.*, "Differential Internalization of Somatostatin in COS-7 Cells Transfected with SST₁ and SST₂ Receptor Subtypes: A Confocal Microscopic Study Using Novel Fluorescent Somatostatin Derivatives", *Endocrinology*, vol. **138**, pp. 296-306 (1997); L.-H. Wang *et al.*, "Ligand Binding, Internalization, Degradation and Regulation by Guanine Nucleotides of Bombesin Receptor Subtypes: A Comparative Study", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. **1175**, pp. 232-242 (1993). Se ha demostrado que incluso los anticuerpos monoclonales se han interiorizado en la célula. Véase O.W. Press *et al.*, "Comparative Metabolism and Retention of Iodine-125, Yttrium-90, and Indium-111 Radioimmunoconjugates by Cancer Cells", *Cancer Research*, vol. **56**, pp. 2123-29 (1996).

Después de la internalización, muchos péptidos se trasladan al núcleo y hasta se unen al ADN. Se ha demostrado que los péptidos que se acumulan en los núcleos de las células diana incluyen a la insulina, la hormona del crecimiento, la prolactina, el factor de crecimiento del sistema nervioso, la somatostatina, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y los interferones. Se han descrito sitios de unión nucleares para la hormona liberadora de la gonadotropina, la gonadotropina, la hormona del crecimiento, la angiotensina II, la prolactina, la transferrina, la insulina, varias interleuquinas, glucagón, varios opioides y factores de crecimiento (incluyendo el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento del sistema nervioso, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento de fibroblasto). Se ha demostrado que la insulina y el factor de crecimiento epidérmico causan efectos nucleares específicos. Véase Morel, "Internalization and Nuclear Localization of Peptide Hormones", *Biochemical Pharmacology*, vol. **47**(1), pp. 63-76 (1994); y P.M. Laduron, "From Receptor Internalization to Nuclear Translocation--New Targets for Long-Term Pharmacology", *Biochemical Pharmacology*, vol. **47**, pp. 3-13 (1994).

Se sabe que las hormonas esteroideas se difunden a través de la membrana plasmática y luego se unen a los receptores intracelulares y se trasladan al núcleo, o se unen directamente a receptores en el núcleo. Véase W. V. Welshons *et al.*, "Nuclear Localization of Unoccupied Oestrogen Receptors", *Nature*, vol. **307**, pp. 747-49 (1984). Las clases de hormonas esteroideas que se saben que se unen a receptores intracelulares incluyen a progestinas (por ejemplo, la progesterona), andrógenos (por ejemplo, la testosterona), glucocorticosteroides (por ejemplo, la hidrocortisona), mineralocorticoides (por ejemplo, la aldosterona), y estrógenos (por ejemplo, el estradiol). Véase D.J. Sutherland *et al.*, "Hormones and Cancer", *The Basic Science of Oncology*, 2ª Ed. (editores I.F. Tannock y R.P. Hill), Capítulo 13, pp. 207-231 (1992). Se sabe que las células del tumor de mama y próstata poseen mayores números de receptores de hormona esteroideas.

Un método que ha sido usado para aumentar la relación de tumor-línea de fondo de radioligando para la terapia o la visualización es disminuir la respuesta de la radiactividad del tejido de fondo cambiando la rapidez de degradación o excreción. Cuando los niveles de la radiación de fondo disminuyen, aumenta la relación tumor-línea de fondo; sin

embargo, la cantidad de radioligando acumulado por la célula tumoral queda igual. Así la dosis terapéutica real (la dosis dentro de la célula) no cambia, aun cuando la imagen del tumor muestre más contraste frente a la línea de fondo.

Los métodos que han sido usados para aumentar la respuesta de la célula tumoral del radioligando, y así aumentar la dosis terapéutica o diagnóstica, incluyen los siguientes: usar un radioligando más reconocido por las células tumorales, usar un radioligando con una velocidad de difusión más alta en el tejido, cambiar la velocidad de eliminación del radioligando, usar un radioligando con una semivida biológica más larga, usar un radioisótopo con una semivida física más larga y usar una dosis más alta del radioligando. El radioligando ha sido administrado por una dosis en bolo individual o por una infusión corta de hasta 2 horas. Se han desarrollado modelos para tratar de identificar los parámetros que pueden ser optimizados para hacer la respuesta más eficiente. Estos modelos comparten la asunción básica de que el compuesto radiomarcado se da en una dosis en bolo individual. Véase Rippley *et al.* (1995); S.-E. Strand *et al.*, "Pharmacokinetic Modeling", *Medical Physics*, vol. **20**(2), Pt. 2, pp. 515-27 (1993); y H. Zhu *et al.*, "Potential and Limitations of Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy with Monoclonal Antibodies", *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. **38**, no. 5, pp. 731-41 (1997). Hay una necesidad de un método para aumentar la acumulación del radioligando en las células diana sin un aumento en la destrucción de células normales.

Los análogos radiomarcados del péptido somatostatina han sido estudiados por su eficacia en la visualización de tumores y en su terapia. Véase E.A. Woltering *et al.*, "The Role of Radiolabelled Somatostatin Analogs in the Management of Cancer Patients", *Principles & Practice of Oncology*, Vol. **9**, pp. 1-15 (1995); patente de EE.UU. N°. 5.590.656; y patente de EE.UU. N°. 5.597.894. La somatostatina endógenamente producida, un tetradecapéptido, inhibe la liberación de varios factores pituitarios e intestinales que regulan la proliferación de células, la motilidad de las células, o la secreción celular, incluyendo la hormona del crecimiento, la hormona adrenocorticotropina, la prolactina, la hormona estimuladora del tiroides, la insulina, glucagón, motilina, el péptido gástrico inhibitorio (GIP), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la secretina, la colecistoquinina, bombesina, el péptido liberador de gastrina (GRP), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona liberadora del tiroides (TRH), colecistoquinina (CCK), aldosterona, el polipéptido pancreático (PP), varias citoquinas (por ejemplo, interleuquinas, interferones), varios factores de crecimiento (por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento del sistema nervioso), y varias aminas vasoactivas (por ejemplo, la serotonina).

Como la somatostatina tiene una semivida biológica corta (de 1 a 2 minutos), han sido producidos varios análogos del péptido somatostatina por la eliminación de aminoácidos, por la sustitución de L-aminoácidos nativos con los isómeros D-aminoácidos correspondientes, por la adición de un alcohol al extremo carboxi-terminal de la molécula, o por varias combinaciones de estos enfoques. Véase la patente de EE.UU. N°. 5.597.894. Los ejemplos de análogos de somatostatina incluyen el acetato de octreotido, lanreotido, vapreotido ("RC-160"), y pentetreotido, todos con una semivida biológica más larga. Se han producido análogos multi-tirosinados de somatostatina y se ha demostrado que se unen a los receptores celulares de somatostatina. Véase la patente de EE.UU. N°. 5.597.894.

Los receptores de somatostatina se encuentran en todas las partes de la célula, incluyendo la membrana plasmática, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, las vesículas y el núcleo. La somatostatina y sus análogos son interiorizados por endocitosis del complejo ligando-receptor. Véase L.J. Hofland *et al.*, "Internalization of the Radioiodinated Somatostatin Analog [¹²⁵I-Tyr³] Octreotide by Mouse and Human Pituitary Tumor Cells: Increase by Unlabeled Octreotide", *Endocrinology*, vol. **136**, pp. 3698-3706 (1995); Wiseman *et al.*, (1995).

Se han encontrado altas densidades de receptores de somatostatina, especialmente el receptor de somatostatina sub-tipo 2 (SST-2), en células de una amplia variedad de tumores, incluyendo tumores del sistema endocrino, melanomas, carcinomas de mama, tumores de célula Merkel, linfomas, carcinomas de pulmón de células pequeñas, tumores gastrointestinales, astrocitomas, gliomas, meningiomas, tumores carcinoides, tumores de células de los islotes, carcinomas de células renales, neuroblastomas y feocromocitomas. Véase E.A. Woltering *et al.*, "The Role of Radiolabeled Somatostatin Analogs in the Management of Cancer Patients", *Principles & Practice of Oncology*, Vol. **9**, pp. 1-15 (1995); y E.A. Woltering *et al.*, "Somatostatin Analogs: Angiogenesis Inhibitors with Novel Mechanisms of Action", *Investigational New Drugs*, vol. **15**, pp. 77-86 (1997). Se ha demostrado que el análogo de somatostatina radiomarcado ¹¹¹In-pentetreotido, conocido por unirse a receptores SST-2 en membranas celulares, se une a tumores de glándula pituitaria, tumores pancreáticos del sistema endocrino, carcinoides, paragangliomas, feocromocitomas, carcinomas medulares de tiroides, cánceres de pulmón de células pequeñas, neuroblastomas, meningiomas, carcinomas de mama, carcinomas de células renales, gliomas, astrocitomas, melanomas y linfomas. El ¹¹¹In-pentetreotido también ha sido usado para tratar el glucagonoma metastásico y tumores carcinoides. Véase Wiseman *et al.*, 1995; Krenning *et al.*, "Radiotherapy with a radiolabelled somatostatin analogue, [¹¹¹In-DTPA-D-Phe1]-octreotide. A Case History", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. **733**, pp. 496-506 (1996); y M. Fjalling *et al.*, "Systemic radionuclide therapy using indium-111-DTPA-D-Phe-1-octreotide in midgut carcinoid syndrome", *Journal of Nuclear Medicine*, vol. **37**, pp. 1519-21 (1996).

La somatostatina radiomarcada o los análogos de somatostatina han sido usados para la visualización de tumores y su terapia, aunque han sido administrados previamente por inyección en bolo o por una infusión corta (hasta 2 horas). Véase S.W.J. Lamberts *et al.*, "Somatostatin-Receptor Imaging in the Localization of Endocrine Tumors", *The New England Journal of Medicine*, vol. **323**, pp. 1246-49 (1990); E.P. Krenning *et al.*, "Somatostatin Receptor Scintigraphy with Indium-111-DTPA-D-Phe-1-Octreotide in Man: Metabolism, Dosimetry and Comparison with Iodine-123-Tyr-3-Octreotide", *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. **33**, pp. 652-58 (1992); E.P. Krenning *et al.*, "Localisation of Endocrine-Related Tumours with Radioiodinated Analogue of Somatostatin", *The Lancet*, vol. **1989**, no. 1, pp. 242-

244 (1989); W.A.P. Breeman *et al.*, "Studies on Radiolabelled Somatostatin Analogues in Rats and in Patients", *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine*, vol. **40**, pp. 209-220 (1996); y E.P. Krenning *et al.*, "Somatostatin Receptor Scintigraphy with [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]- and [^{123}I -Tyr 3]-octreotide: the Rotterdam Experience with More than 1000 Patients", *European Journal of Nuclear Medicine*, vol. **20**, pp. 716-31 (1993).

5

Los análogos de somatostatina radiomarcados que han sido usados para la visualización de tumores o su terapia incluyen ^{111}In -pentetretotido (^{111}In -DTPA-D-Phe 1)-octreotido, (^{111}In -DOTA 0 -D-Phe 1 -Tyr 3)-octreotido, (^{90}Y -DOTA 0 -D-Phe 1 -Tyr 3)-octreotido, (^{86}Y -DOTA 0 -D-Phe 1 -Tyr 3)-octreotido, (^{111}In -DTPA-D-Phe 1)-RC-160, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RC-160, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -octreotido, ^{188}Re -RC-160, ^{123}I -tyr 3 -octreotido, ^{125}I -tyr 3 -octreotido, ^{125}I -lanreotido, ^{90}Y -DOTA-lanreotido y ^{131}I -WOC-3. Véase, por ejemplo, Woltering *et al.*, 1995; M.L. Thakur *et al.*, "Radiolabeled Somatostatin Analogs in Prostate Cancer", *Nuclear Medicine & Biology*, Vol. **24**, pp. 105-113 (1997); M. de Jong *et al.*, "Yttrium-90 and Indium-111 Labelling, Receptor Binding and Biodistribution of [DOTA 0 , D-Phe 1 , Tyr 3]octreotide, a Promising Somatostatin Analogue for Radionuclide Therapy", *European Journal of Nuclear Medicine*, vol. **24**, pp. 368-371 (1997); W.A.P. Breeman *et al.*, "A New Radiolabelled Somatostatin Analogue [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]RC-160: Preparation, Biological Activity, Receptor Scintigraphy in Rats and Comparison with [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]octreotide", *European Journal of Nuclear Medicine*, vol. **21**, no. 4, pp. 323-335 (1994); W.A.P. Breeman *et al.*, "Studies on Radiolabeled Somatostatin Analogues in Rats and in Patients", *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine*, vol. **40**, no. 3, pp. 209-219 (1996); M. Fjalling *et al.*, "Systemic Radionuclide Therapy Using Indium-111-DTPA-D-Phe 1 -Octreotide in Midgut Carcinoid Syndrome", *Journal of Nuclear Medicine*, vol. **37**, pp. 1519-1521 (1996); H. Kolan *et al.*, "Sandostatin $^{\text{®}}$ Labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$: *In Vitro* Stability, *In Vivo* Validity and Comparison with ^{111}In -DTPA-Octreotide", *Peptide Research*, vol. **9**, no. 3, pp. 144-150 (1996); I. Virgolini *et al.*, "MAURITIUS": Biodistribution, Safety and Tumor Dose in Patients Evaluated for Somatostatin Receptor-Mediated Radiotherapy", publicación enviada al *Journal of Nuclear Medicine* (1997); y la patente de EE.UU. N $^{\circ}$ 5.597.894.

También se ha demostrado que los análogos de somatostatina inhiben la angiogénesis en tumores. Un tumor primario inicia la neovascularización por estimulación angiogénica. Véase M.S. O'Reilly, "Angiostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and of Tumor Growth", en I. Goldberg *et al.* (eds.), *Regulation of Angiogenesis*, pp. 273-294 (1997). El crecimiento de un tumor sólido es dependiente de la neovascularización. Se ha demostrado que este tejido angiogénico es rico en receptores de somatostatina sub-tipo 2 (SST-2), y que se inhiben con análogos de somatostatina conocidos por unirse a los receptores SST-2, por ejemplo, acetato de octreotido, RC-160, y lanreotido. Véase E.A. Woltering *et al.*, "The Role of Radiolabeled Somatostatin Analogs in the Management of Cancer Patients", *Principles & Practice of Oncology*, Vol. **9**, pp. 1-15 (1995); E.A. Woltering *et al.*, "Somatostatin Analogs: Angiogenesis Inhibitors with Novel Mechanisms of Action", *Investigational New Drugs*, vol. **15**, pp. 77-86 (1997); P.C. Patel *et al.*, "Postreceptor Signal Transduction Mechanisms Involved in Octreotide-Induced Inhibition of Angiogenesis", *Surgery*, vol. **116**, pp. 1148-52 (1994); R. Barrie *et al.*, "Inhibition of Angiogenesis by Somatostatin and Somatostatin-like Compounds Is Structurally Dependent", *Journal of Surgical Research*, vol. **55**, pp. 446-450 (1993); y E.A. Woltering *et al.*, "Somatostatin Analogues Inhibit Angiogenesis in the Chick Chorioallantoic Membrane", *Journal of Surgical Research*, vol. **50**, pp. 245-251 (1991).

Los vasos sanguíneos angiogénicos tienen receptores SST-2 a una densidad más alta que los vasos de los tejidos normales. Véase J.C. Watson *et al.*, "Up-Regulation of Somatostatin Receptor Subtype 2 (SST-2) mRNA Occurs During the Transformation of Human Endothelium to the Angiogenic Phenotype", Publicación presentada en el 12 Simposio Internacional sobre Péptidos Regulatorios, Copenhague, Dinamarca, septiembre de 1996; y J.C. Watson *et al.*, "SST-2 Gene Expression Appears During Human Angiogenesis", *Regulatory Peptides*, vol. **64**, p. 206 (Resumen) (1996). La unión de análogos de somatostatina radiomarcados a receptores SST-2 en los vasos de tumores ha sido usada para radiovisualización y radioterapia. El tamaño del tumor disminuye porque el crecimiento de los vasos sanguíneos es inhibido por el compuesto radiomarcado. Véase J.C. Reubi *et al.*, "High Density of Somatostatin Receptors in Veins Surrounding Human Cancer Tissue: Role in Tumor-Host Interaction?", *International Journal of Cancer*, vol. **56**, pp. 681-88 (1994). El crecimiento patológico de los vasos sanguíneos también ha sido implicado en otras diversas condiciones de enfermedad, incluyendo retinopatía de la prematuridad, retinopatía diabética, glaucoma, crecimiento tumoral, artritis reumatoide e inflamación. Véase Barrie *et al.*, 1993. De hecho, el ^{111}In -pentetretotido ha sido usado para localizar las zonas de uniones afectadas por la artritis reumatoide. Véase P.M. Vanhagen *et al.*, "Somatostatin Receptor Imaging: The Presence of Somatostatin Receptors in Rheumatoid Arthritis", *Arthritis & Rheumatism*, vol. **37**, no. 10, pp. 1521-27 (1994).

55

También se ha demostrado que las células angiogénicas expresan el gen del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), *kdr*, mientras que las células vasculares quiescentes no expresaban este gen del receptor. Tanto las células angiogénicas como las quiescentes expresaban el gen del receptor VEGF, *flt-1*. Véase J.C. Watson *et al.*, "Initiation of *kdr* Gene Transcription is Associated with Conversion of Human Vascular Endothelium to an Angiogenic Phenotype", *Surgical Forum*, vol. **47**, pp. 462-64 (1996).

60

Se han usado análogos de somatostatina no radiomarcados para inhibir la secreción de la hormona del crecimiento por la infusión de un sistema de bombeo implantable para evitar la liberación de la hormona del crecimiento intermitente entre inyecciones, y evitar la molestia al paciente de las frecuentes inyecciones subcutáneas. Véase G. Hildebrandt *et al.*, "Results of Continuous Long Term Intravenous Application of Octreotide via an Implantable Pump System in Acromegaly Resistant to Operative and X-ray Therapy", *Acta Neurochirurgica*, vol. **117**, pp. 160-65 (1992). Así la administración de la hormona por infusión permitió que la concentración de la hormona permaneciera a un nivel constante en la circulación sanguínea. El objetivo no era aumentar la acumulación de la hormona dentro de las células.

65

La infusión también ha sido sugerida para la respuesta de un análogo de pirimidina radiomarcado para la incorporación en el ADN durante la síntesis de ADN cuando la célula está en una fase de crecimiento. La pirimidina no se une a un receptor celular, pero en cambio es usada como un componente estructural para sintetizar el nuevo ADN. Como la pirimidina radiomarcada en la circulación general era rápidamente deshalogenada, fue sugerida la infusión para obtener una mayor respuesta de los tumores sólidos (por ejemplo, de cáncer de mama), que se sabe que tienen un índice de crecimiento lento y así un menor porcentaje de células en una fase de crecimiento en un momento dado que los tumores líquidos (por ejemplo, la leucemia). La infusión fue aconsejada para mantener un nivel del compuesto radiomarcado en la circulación, de modo que las células que se dividían en ciclos diferentes tendrían acceso al radioligando para su incorporación en el ADN durante la síntesis de ADN. No se dio ningún dato experimental correspondiente. Ninguna referencia fue hecha a compuestos radiomarcados que se unen a un receptor celular. Véase Bloomer *et al.*, 1977.

La patente N°. 5.590.656 describe el uso de una inyección en bolo de somatostatina radiomarcada para detectar y diferenciar tejidos neoplásicos.

La patente N°. 5.597.894 describe el uso de análogos multi-tirosinados de somatostatina dados por inyección en bolo o infusión corta (hasta 60 minutos) para diagnosticar y tratar tumores con receptores de superficie específicos de péptido.

La solicitud internacional (PCT) N°. WO 91/01144 describe el uso de derivados de polipéptidos marcados suministrados por una inyección en bolo individual o por una infusión corta de hasta aproximadamente 60 minutos para la visualización *in vivo* de tejidos diana o para terapia.

La radiovisualización y la radioterapia son cada vez más importantes en la identificación y la eliminación de células tumorales no deseadas. La eficacia del radioligando depende de la concentración en la que se acumula en las células diana. Aunque hayan sido desarrollados métodos para aumentar la relación tumor-línea de fondo, pocos métodos en realidad han aumentado la concentración del radioligando dentro de las células tumorales o lo han asociado estrechamente a células angiogénicas. Así, hay una necesidad de un método para aumentar la acumulación y la retención de radioligando dentro de las células diana sin un aumento de la destrucción de células normales del cuerpo.

Descripción de la invención

Los inventores han descubierto que la administración de un compuesto radioisotópico por infusión durante un período del tiempo mayor que dos horas, preferiblemente mayor que doce horas, aumenta enormemente la radiactividad máxima que se acumula en la célula diana. El tiempo de residencia del compuesto radiomarcado en tejidos diana administrado por infusión durante un período mayor de 2 horas es, por lo general, de al menos 1,5 veces el tiempo de residencia del compuesto radiomarcado en las células diana, lo que daría como resultado una administración en bolo de la misma dosis total del mismo compuesto radiomarcado al paciente, y puede ser de aproximadamente cinco veces más alta que la resultante de la inyección en bolo o por métodos de infusión cortos. Este método realza la relación de radiactividad de tumor-línea de fondo aumentando la cantidad de radioligando acumulado dentro de las células tumorales. Este método puede ser usado con cualquier compuesto radiomarcado cuya velocidad de respuesta celular esté limitada por la unión a un receptor celular o a una proteína de transporte. Una vez que el compuesto radiomarcado es interiorizado, la semivida biológica ya no juega un papel menor en el tiempo de residencia. El factor primario que gobierna el tiempo de residencia después de la internalización es la semivida física del radioisótopo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la respuesta de ^{111}In -pentetreotido como una función del tiempo en un paciente individual para diferentes métodos de administración.

La figura 2 ilustra los datos de la Figura 1 trazada en una escala logarítmica.

La figura 3 ilustra la unión e internalización de ^{125}I -WOC-4a.

La figura 4 ilustra la unión e internalización de ^{131}I -WOC-4a.

La figura 5 ilustra la unión e internalización de ^{125}I -WOC-3b.

La figura 6 ilustra la unión e internalización de ^{111}In -pentetreotido.

La figura 7 ilustra la velocidad de pérdida de radiactividad de células expuestas a ^{123}I -WOC-4a.

La figura 8 ilustra el efecto de un competidor sobre ^{111}In -pentetreotido interiorizado.

La figura 9A ilustra el grado de internalización y desplazamiento de ^{125}I -WOC-4a en 1 h. La figura 9B ilustra el grado de internalización y desplazamiento de ^{125}I -WOC-4a en 4 h. La figura 9C ilustra el grado de internalización y desplazamiento de ^{125}I -WOC-4a en 24 h.

ES 2 307 325 T3

La figura 10A ilustra el grado de internalización y desplazamiento de ^{125}I -somatostatina en 1 h.

La figura 10B ilustra el grado de internalización y desplazamiento de ^{125}I -somatostatina en 4 h.

5 La figura 10C ilustra el grado de internalización y desplazamiento de ^{125}I -somatostatina en 24 h.

La figura 11A ilustra la velocidad de internalización y desplazamiento de ^{111}In -pentetreotido en 1 h.

10 La figura 11B ilustra la velocidad de internalización y desplazamiento de ^{111}In -pentetreotido en 4 h.

La figura 11C ilustra la velocidad de internalización y desplazamiento de ^{111}In -pentetreotido en 24 h.

La figura 12 ilustra la velocidad de unión de ^{111}In -pentetreotido en el ADN de células IMR-32.

15 La figura 13 ilustra el efecto de una proteasa en la unión de ^{111}In -pentetreotido en el ADN de células IMR-32 y SKNSH.

La figura 14 ilustra el efecto de varias concentraciones de ^{125}I -WOC-4a sobre la viabilidad de células IMR-32.

20 La figura 15 ilustra el efecto a largo plazo de ^{125}I -WOC-4a sobre la viabilidad de células IMR-32.

La figura 16A ilustra la velocidad de unión de ^{125}I -17- β -estradiol a la línea celular T-47-D.

25 La figura 16B ilustra la velocidad de unión de ^{125}I -17- β -estradiol a la línea celular MCF-7.

La figura 16C ilustra la velocidad de unión de ^{125}I -17- β -estradiol a la línea celular ZR-75-1.

30 La figura 17 ilustra la unión e internalización de ^{125}I -JIC-2D en células vasculares endoteliales angiogénicas humanas.

La figura 18 ilustra el efecto de un emisor Auger, ^{111}In -pentetreotido, sobre la iniciación de tejido vascular angiogénico humano.

35 La figura 19 ilustra el efecto de un emisor Auger, ^{111}In -pentetreotido, sobre el área de vasos de tejido vascular angiogénico humano.

La figura 20 ilustra el efecto de un emisor Auger, ^{111}In -pentetreotido, sobre el índice de crecimiento de tejido vascular angiogénico humano.

40 Modos para llevar a cabo la invención

Los inventores han demostrado que la infusión en un período mayor de 2 h, preferiblemente mayor de aproximadamente 12 h, más preferiblemente 24 h, aumenta enormemente la radiactividad medida dentro de las células diana. El método de infusión aumenta la radiactividad acumulada en el tumor o en las células angiogénicas para casi todos los péptidos dependientes de receptor radiomarcados y esteroides. Sin desear vincularse a esta teoría, el mecanismo subyacente, según se cree, es como sigue. La unión a un receptor celular (tanto de membrana, citoplásmico como nuclear) o a una proteína de transporte, que es necesaria para péptidos y esteroides para afectar a los procesos celulares, ocurre durante un período finito de tiempo. Si se administra un exceso de compuesto radiomarcado (más que el receptor o la proteína de transporte pueda unir en cualquier momento), la incorporación a la célula de aquel compuesto está limitada por el número de receptores disponibles o moléculas de proteína de transporte. El compuesto no unido restante está sujeto a la degradación o la excreción. Cuando el receptor está libre para unirse a otra molécula, el compuesto radiomarcado circulante ha sido eliminado parcialmente o completamente. Sin embargo, si la velocidad de unión del receptor y el transporte subsecuente del compuesto radiomarcado están vinculados a la velocidad de administración del compuesto radiomarcado, entonces el radioligando desunido circulante estará disponible para unirse a los receptores reciclados. Así, la dosis eficaz del fármaco, es decir, su acumulación intracelular, estará optimizada.

Esta teoría es compatible con la observación de que los compuestos que se interiorizan (por ejemplo, péptidos, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y esteroides) son resistentes a la competición o tienen una velocidad inferior de competición que los compuestos que se unen sólo a la superficie celular. Los experimentos que han monitorizado la velocidad de internalización o desplazamiento de radioligandos han considerado todos períodos de unión cortos (de 0 a 4 h). Los inventores han demostrado *in vitro* que, para análogos de somatostatina radiomarcados durante un tiempo de hasta al menos 120 h, hay un desplazamiento progresivo de los receptores unidos de membrana y receptores citoplásmicos al núcleo. Ya que los compuestos radiomarcados no sólo se unen a receptores nucleares, sino que también se unen específicamente al ADN, las radioterapias eficaces pueden usar compuestos radiomarcados marcados con emisores de baja energía, tales como electrones de Auger, que tienen un radio corto de radiactividad emitida. Estos electrones deben ser incorporados en el núcleo para dañar el ADN. Los emisores de Auger inhiben la división celular con un mínimo efecto sobre las células vecinas.

Para optimizar la acumulación celular de un compuesto radiomarcado, su velocidad de infusión se hace corresponder con su velocidad de respuesta celular y desplazamiento, preferencialmente en el núcleo, más preferencialmente en el ADN. La correspondencia de la velocidad de unión, internalización, y el desplazamiento causa una acumulación más eficiente dentro de la célula que es posible mediante una terapia en bolo o infusión a corto plazo. La nueva técnica de infusión a largo plazo permite que los receptores sean reciclados muchas veces, causando una mayor internalización, desplazamiento, y en última instancia, la deposición en el citoplasma, sus orgánulos, el núcleo o el ADN. Este aumento de la acumulación de la radiactividad proporciona una óptima visualización y una óptima radioterapia *in situ*.

La respuesta más eficiente del compuesto radiomarcado por la célula proporciona una utilización más eficiente del compuesto, es decir, más compuesto unido a las células diana, y menos exposición de un compuesto tóxico a las células normales.

Los inventores han demostrado que una vez que un compuesto es interiorizado en la célula, está menos disponible para la competición o la degradación. Así, la semivida biológica del compuesto se vuelve menos importante, y la semivida física del radioisótopo se vuelve la etapa limitante de la velocidad. Muchos péptidos, factores de crecimiento y hormonas tienen semividas biológicas muy cortas. Si se administran por infusión péptidos radiomarcados, factores de crecimiento u hormonas, y son trasladados a la célula donde ya no están sometidos a la competición activa con hormonas no marcadas, y son protegidos de la degradación y la excreción, la semivida física del isótopo se vuelve más importante en la determinación de la cantidad de radiactividad acumulada en la célula que la semivida biológica.

La respuesta del compuesto radiomarcado para la radiovisualización o para radioterapia puede ser monitorizada usando procedimientos de cintigrafía en medicina nuclear conocidos en el campo, por ejemplo una cámara de medicina nuclear. Las regiones de interés pueden ser visualizadas como imágenes de ordenador para evaluar la respuesta del compuesto radiomarcado. Pueden ser calculadas la radiactividad y su duración en el tumor o en las células angiogénicas. La terapia infusional proporciona las dosis eficaces más altas que permanecen durante un tiempo más largo en el tumor o en las células angiogénicas.

El nuevo método realza la relación de tumor-línea de fondo aumentando el nivel de radiactividad acumulada en las células diana, no disminuyendo simplemente la señal de fondo.

La expresión "células diana" se refiere a células tumorales o células angiogénicas que contienen una concentración más alta de receptores de membrana o internos o proteínas de transporte que se unen a un péptido dependiente del receptor o al esteroide dependiente del receptor que la concentración del mismo receptor o proteína de transporte encontrada en células no diana.

La expresión "compuesto radiomarcado" o "radioligando" incluye un péptido dependiente del receptor o un esteroide dependiente del receptor que es complejoado con un radioisótopo, y que es útil como sustancia farmacéutica, por ejemplo, una sustancia radiofarmacéutica para la visualización *in vivo* de tejidos diana o para su terapia. La expresión "compuesto radiomarcado" también incluye un compuesto con un quelante unido al péptido dependiente del receptor que se une al radioisótopo.

La expresión "dependiente del receptor" se refiere a compuestos cuyo efecto sobre una célula depende de la unión a un receptor celular, incluyendo tanto receptores unidos de membrana como intracelulares. La expresión "péptidos dependientes del receptor" incluye péptidos naturales o proteínas aisladas naturales o derivadas de la fermentación de células, por ejemplo, producidas por ingeniería genética, o sintetizadas, así como derivados o análogos. Sin limitar el alcance de esta invención, los ejemplos de péptidos dependientes del receptor que pueden ser usados incluyen anticuerpos, factores de crecimiento, hormonas peptídicas y proteínicas, interferones, citoquinas, y análogos y sus derivados. Sin limitar el alcance de esta invención, los ejemplos específicos de péptidos dependientes del receptor incluyen el factor de crecimiento del sistema nervioso, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, colecistoquinina, el factor de crecimiento endotelial vascular, el péptido intestinal vasoactivo, el péptido liberador de gastrina, el factor inhibidor de la leucemia, somatostatina, oxitocina, bombesina, calcitonina, arginina vasopresina, angiotensina II, el péptido natriurético atrial, la insulina, glucagón, prolactina, la hormona del crecimiento, la gonadotropina, la hormona liberadora de tirotrópina, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento, la hormona liberadora de la gonadotropina, hormona liberadora de la corticotropina, interleuquinas, interferones, transferrina, sustancia P, neuromedina, neurotensina, neuropéptido Y, opioides, y sus derivados y análogos.

Los términos "derivados" y "análogos" se sobrentiende que son péptidos o proteínas particulares, en los que una o varias unidades de aminoácidos han sido omitidas o sustituidas por una o varias unidades de aminoácidos diferentes, o en los que uno o varios grupos funcionales han sido sustituidos por uno o varios otros grupos funcionales, o en los que uno o varios grupos han sido sustituidos por uno o varios otros grupos isostéricos. En general, el término cubre todos los derivados de un péptido dependiente del receptor que exhiben un efecto cualitativamente similar a él del péptido no modificado. Por ejemplo, pueden ser más o menos potentes que el péptido natural, unirse a un subtipo del receptor diferente, o tener una semivida biológica más larga. La expresión también cubre agonistas y antagonistas frente al péptido natural que se unen al mismo receptor. Los péptidos radiomarcados pueden ser comprados a un proveedor comercial (por ejemplo, New England Nuclear o ICN Pharmaceuticals, Inc.), o pueden prepararse mediante técnicas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º. 5.597.894 y el documento PCT/WO 91/01144).

La expresión “esteroide dependiente del receptor” incluye esteroides naturales o esteroides aislados naturales o sintetizados, así como derivados o análogos. Sin limitar el alcance de esta invención, los ejemplos de esteroides dependientes del receptor que pueden ser usados incluyen las hormonas esteroideas, tales como el estrógeno, la progesterona, testosterona, glucocorticosteroides, mineralocorticoides y sus análogos.

Los esteroides radiomarcados pueden prepararse mediante técnicas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, C.S. Dence *et al.*, “Carbon-11-Labeled Estrogens as Potential Imaging Agents for Breast Tumors”, *Nuclear Medicine & Biology*, vol. **23**, pp. 491-496 (1996) y R.B. Hochberg, “Iodine-125-Labeled Estradiol: A Gamma-Emitting Analog of Estradiol That Binds to the Estrogen Receptor”, *Science*, vol. **205**, pp. 1138-1140, (1979)), o pueden ser comprados a un proveedor comercial.

Los radioisótopos adecuados incluyen radioisótopos que emiten radiación alfa, beta o gamma, preferiblemente radiación gamma que es más fácil de visualizar usando la tecnología actual. Los ejemplos son radioisótopos derivados de galio, indio, tecnecio, itrio, iterbio, renio, platino, talio y astato, por ejemplo, ^{67}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y , ^{86}Y , ^{169}Yb , ^{188}Re , $^{195\text{m}}\text{Pt}$, ^{201}Ti y ^{211}At . Los radioisótopos adecuados para el tratamiento terapéutico incluyen los radioisótopos que emiten electrones de Auger, por ejemplo ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{129}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{77}Br y otros halógenos radiomarcados. La opción de un radioisótopo adecuado depende de una variedad de factores incluyendo el tipo de radiación emitida, las energías de emisión, la distancia sobre la cual la energía es depositada, y la semivida física del radioisótopo. Los radioisótopos preferidos son aquellos que tienen una semivida radiactiva correspondiente a, o más larga que, la semivida biológica del compuesto dependiente del receptor. Preferiblemente el radioisótopo tiene una semivida entre aproximadamente 1 hora y 60 días, preferiblemente entre 5 horas y 60 días, más preferiblemente entre 12 horas y 60 días. ^{125}I tiene una ventaja sobre otros emisores que producen rayos gamma de gran energía (es decir, ^{111}In y ^{131}I) que requiere la hospitalización del hospitalizado y el aislamiento. ^{125}I permite el desarrollo de tratamientos con pacientes externos debido a las cantidades limitadas de radiación que escapa el cuerpo.

La expresión “somatostatina radiomarcada” incluye, por ejemplo, ^{111}In -DPTA-somatostatina, ^{90}Y -DOTA-somatostatina y ^{125}I -somatostatina.

La expresión “análogo de somatostatina radiomarcado” incluye, por ejemplo, ^{111}In -pentetreotido (^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotido), (^{111}In -DOTA⁰-D-Phe¹-Tyr³)-octreotido, (^{90}Y -DOTA⁰-D-Phe¹-Tyr³)-octreotido, (^{86}Y -DOTA⁰-D-Phe¹-Tyr³)-octreotido, ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-RC-160, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RC-160, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CPTA-RC-160, ^{123}I -RC-160, ^{125}I -RC-160, ^{131}I -RC-160, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -octreotido, ^{188}Re -RC-160, ^{123}I -tyr³-octreotido, ^{125}I -tyr³-octreotido, ^{131}I -tyr³-octreotido, ^{125}I -lanreotido, ^{123}I -lanreotido, ^{131}I -lanreotido, ^{90}Y -DOTA-lanreotido, ^{86}Y -DOTA-lanreotido, ^{111}In -DTPA-lanreotido, ^{111}In -DOTA-lanreotido, ^{111}In -DPTA-somatostatina, ^{90}Y -DOTA-somatostatina, ^{86}Y -DOTA-somatostatina, ^{125}I -somatostatina, ^{131}I -WOC-3, ^{125}I -WOC-3b, ^{131}I -WOC-4a, ^{125}I -WOC-4a, ^{125}I -JIC-2D, ^{123}I -JIC-2D y ^{131}I -JIC-2D.

La expresión “receptor celular” incluye receptores unidos de membrana, receptores intracelulares, y sitios de unión dentro de los orgánulos, incluyendo endosomas, ribosomas, lisosomas, mitocondrias, núcleos, vesículas, retículo endoplásmico, retículo sarcoplásmico y aparatos de Golgi.

La infusión puede ser realizada por cualquier ruta conveniente, incluyendo intravenosa, oral, intraperitoneal, intratumoral, subcutánea, intraarterial, intramuscular, o por una formulación de liberación lenta. El término “infusión” incluye el uso de dosis en bolo de intervalos repetidos cortos de compuestos con semividas físicas o biológicas que dan múltiples dosis en bolo de intervalo corto equivalentes fisiológicamente a la infusión continua. El compuesto radiomarcado puede ser infundido en forma libre o junto con uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables o diluyentes.

La expresión “tiempo de residencia” se refiere a la acumulación de un compuesto radiomarcado por la célula diana por dosis del compuesto radiomarcado dado en el tiempo residual. El compuesto radiomarcado acumulado es medido con el área bajo una curva cuando se representa la radioactividad medida en la célula diana como una función del tiempo.

La cantidad de compuesto radiomarcado que se administra en radiovisualización es una cantidad eficaz que permite la visualización mediante procedimientos de cintigrafía de medicina nuclear conocidos en la técnica, por ejemplo, tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT), o la tomografía de emisión de positron (PET), o puede ser detectada con un medidor de cámara de ionización, o una sonda gamma, o un detector de estado sólido. La cantidad es determinada por la semivida biológica y física del compuesto radiomarcado, el tipo y la posición del tumor, y las variables dependientes del paciente incluyendo el tamaño, el peso, y la carga tumoral.

La cantidad de compuesto radiomarcado que se administra en radioterapia es determinada por la condición específica que se trate, el compuesto radiomarcado usado, y las variables dependientes del paciente, incluyendo el tamaño, el peso, la densidad de receptores en las células diana, y la severidad de la enfermedad. La eficacia de la terapia puede ser evaluada monitorizando técnicas conocidas en la técnica, incluyendo la radiovisualización y monitorizando como se describe anteriormente.

Ejemplo 1

Un paciente de piel blanca mujer de 36 años con un carcinoma de células pequeñas metastásico recibió una dosis alta de ^{111}In -pentetreotido en diez sesiones separadas, las dos ocasiones iniciales comenzaron antes de la monitorización de la acumulación en el tejido. Durante y después de cada administración de las ocho últimas dosis, fue monitorizado un tumor en el lado izquierdo del cuello según era la respuesta del radioligando con un medidor de cámara de ionización, una cámara de ionización 450P de Victoreen, que mide las velocidades de dosis gamma externas. La administración de las siete dosis iniciales fue por inyección en bolo. Las tres últimas dosis fueron suministradas por infusión con varias actividades de radioligando.

En cada uno de los cinco meses sucesivos, fue administrada una inyección en bolo de aproximadamente 180 mCi de ^{111}In -pentetreotido (OctreoScan®, Mallinckrodt Medical, Inc., San Louis, MO). Las velocidades de las dosis gamma externas de la acumulación de radioligando en el área del tumor de cuello fueron medidas inmediatamente y 24 h después de la inyección. Después del tratamiento del quinto mes, el paciente fue monitorizado según la respuesta del radioligando durante un período ampliado a 2, 4 y 8 días después de la inyección. Se muestran estos datos más abajo en la Tabla 1 y también son presentados en la Figura 1 como la “Dosis en Bolo” marcada de la curva inferior.

TABLA 1
Inyecciones en bolo

Mes de dosis en bolo	Cantidad de radioligando inyectado (mCi)	Tiempo después de la inyección (h)	Acumulación de dosis externa (mR/h)	Relación (mR/h/mCi)
Mes 1	179,9	24	80	0,444691
Mes 2	160,6	24	28	0,174346
Mes 3	182,6	24	33,20	0,181818
Mes 4	169,5	24	27,2	0,160472
Mes 5	178,8	24	34,4	0,192394
Mes 5		72	19,85	
Mes 5		120	11,46	
Mes 5		216	3,82	

Cuatro meses después de la dosis en bolo final, fue administrada la primera dosis por infusión (“Infusión 1”). Se dio una dosis equivalente a la dosis en bolo anterior (175,9 mCi), pero el radioligando fue administrado por infusión en 72 h a una velocidad constante de 2,5 mCi/h. Se proporcionan estos datos en la Tabla 2. Los datos también son representados como una “Infusión 1” marcada de la curva en la Figura 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 307 325 T3

TABLA 2

Dosis de infusión 1

Duración de la infusión (h)	Cantidad de radioligando liberado* (mCi)	Tiempo desde la infusión inicial (h)	Acumulación de dosis externa (mR/h)	Relación máxima (mR/h/mCi)
24	53,52	0	2,0	1,027729
		24	55	
24	52,62	24,5	54,8	0,659505
		48	70	
24	50,75	49	69,7	0,446169
		72	70	
		137	32,9	
		161	25	
		185	20	
		214	15,4	
72	156,89			

*Ajustado para desintegración radiactiva.

Un mes más tarde, en la “Infusión 2”, la dosis total fue aumentada a 389,2 mCi. Por infusión, fueron dados 189,8 mCi del radioligando en las primeras 24 h, 108,6 mCi en las segundas 24 h, y 90,8 mCi en las terceras 24 h. Para cada período de 24 h, la velocidad de infusión fue mantenida constante. Se muestran estos datos en la Tabla 3 y son representados en la Figura 1 como la “Infusión 2” marcada de la curva.

TABLA 3

Dosis de infusión 2

Duración de infusión (h)	Cantidad de radioligando liberado* (mCi)	Tiempo desde la infusión inicial (h)	Acumulación de dosis externa (mR/h)	Relación máxima (mR/h/mCi)
20	189,76	0	2	1,106654
		16	180	
		17	210	
		20	181	
22	108,62	22	171	0,670287
		23	180	
		42	200	
24	90,84	44	200	0,565236
		47	183	
		65	220	
		68	210	
		144	81	
		161	66	
66	389,22			

*Ajustado para desintegración radiactiva.

ES 2 307 325 T3

Un mes más tarde, una tercera dosis fue administrada por infusión ("Infusión 3"). Una dosis de 301 mCi fue infundida el primer período de 24 h. En los dos períodos subsecuentes de 24 h, fueron infundidos 25 y 21 mCi. Los datos son representados en la Tabla 4 y son representados en la Figura 1 por la "Infusión 3" marcada en línea.

TABLA 4
Dosis de infusión 3

Duración de la infusión (h)	Cantidad de radioligando liberado* (mCi)	Tiempo desde la infusión inicial (h)	Acumulación de dosis externa (mR/h)	Relación máxima (mR/h/mCi)
17	301,07	0	0,68	1,561
		2	36	
		3	90	
		4	144	
		8	260	
		9	270	
		13	400	
		16	470	
		17	460	
		19	410	
24	29,93	20	410	
		22	380	
		23	375	
		25	360	
		26	350	
		29	345	
		30	340	
		31	335	
		40	310	
24	20,48	46	280	
		47	275	
		67	230	
		90	179	
		164	70	
65	346,49			

*Ajustado para desintegración radiactiva.

Basado en las observaciones de la dosis en bolo final y las dos primeras dosis de infusión, es evidente que una dosis equivalente administrada por los diferentes métodos acumulaba a velocidades muy diferentes. Con una inyección en bolo de 178,8 mCi, la velocidad de dosis gamma externa máxima ocurría pronto después de la inyección, y disminuyó a aproximadamente 34 mR/h a las 24 h después de la inyección, una relación de 24 h de dosis externa medida de 0,19 mR/h para cada mCi suministrado. Para la Dosis de infusión 1, con una velocidad de infusión de 2,5 mCi por hora durante 3 días, fue visto un aumento de ambos en el área bajo la curva de acumulación (la cantidad total de radiación absorbida por el tumor) y en la velocidad de dosis de radiación externa máxima (contacto superficial de mR/h). La velocidad de dosis medida fue de aproximadamente 55 mR/h después de que sólo un tercio del radioligando había

sido infundido, y esta velocidad fue mantenida o excedida durante los tres días siguientes. La relación mR/mCi más alta de 1,03 ocurrió después de la primera infusión de 24 h, y fue casi cinco veces más alta que la relación más alta de la inyección en bolo. La pendiente de la curva de acumulación de dosis fue máxima durante las primeras 24 h, y luego se aplanó durante las 48 a 72 h siguientes, implicando que el sistema había alcanzado un límite con la respuesta subsecuente mínima. Después de 24 h, los mecanismos de “regeneración” celulares redujeron la marcha de la respuesta.

Cuando la mayor parte de la dosis fue infundida en las primeras 24 h como en las Infusiones 2 y 3, 189,8 y 301 mCi respectivamente, y la velocidad de infusión fue después reducida durante los períodos de 24 h subsecuentes, una mayor área bajo la curva y una actividad máxima más alta (220 y 470 mR/hora) fueron alcanzadas. Estos datos indican la importancia de administrar una dosis grande durante las primeras 24 h antes de que los mecanismos de “regeneración” internos reduzcan la marcha de la velocidad de respuesta.

Las diferencias entre las cuatro curvas no son intuitivas. Los datos sugieren que el radioligando estaba protegido de la eliminación por la degradación, la competición, o la excreción una vez que era incorporado en la célula, y que la maquinaria del transporte celular seguía importando radioligando a pesar de haber concentraciones más altas dentro de la célula hasta que los mecanismos de “regeneración” redujeron la respuesta de las 16 a las 24 h.

Representando los datos con una escala semilogarítmica, como se muestra en la Figura 2, y evaluando el área total bajo la curva, son evidentes dos conceptos importantes:

- (1) La eliminación inicial de péptido era mucho más sustancial para la administración en bolo, marchándose menos péptido durante la incorporación celular. La incorporación de radioligando por las células fue demostrada por la desintegración exponencial, en la cual la semivida se acercó a la semivida física del radioligando (67,3 h). La pendiente de esta línea de desintegración era notablemente constante, independientemente de la secuenciación de la dosis.
- (2) Cuando se normalizó la dosis administrada, el área bajo la curva o el tiempo de residencia aumentó hasta un quintuple simplemente ajustando según cuándo y cómo la dosis fuera administrada. Para la inyección en bolo, el área bajo la curva en la Figura 1 es 4,030 mR, correspondiente a una relación de 23 mR acumulados por mCi suministrado. Las áreas comparables para los experimentos de infusión son 10,398 mR, 37,370 mR y 41,993 mR. Estos datos corresponden a las relaciones de radioligando acumulado por mCi suministrado de 66 mR/mCi, 96 mR/mCi y 121 mR/mCi, respectivamente. Así las relaciones de infusión eran 3, 4 y 5 veces más altas que la relación en bolo. La infusión permitió a más de un radioligando disponible ser incorporado en la célula tumoral.

Para la Dosis de infusión 3, este mismo paciente fue monitorizado con cintigrafía con cámara gamma. Las fotografías indicaron no sólo un aumento de la respuesta del compuesto radiomarcado, sino que también podían ser identificados más focos tumorales. Además, la radiactividad permaneció en el área del tumor durante un período más largo de tiempo que fue visto antes en la administración en bolo. En este paciente, los focos tumorales eran todavía identificables por cintigrafía gamma trece días después de la terminación de la última dosis de infusión.

Ejemplo 2

Fueron realizados experimentos *in vitro* usando análogos de somatostatina radiomarcados y líneas celulares humanas para seguir la respuesta de un péptido radiomarcado con el tiempo en múltiples tipos de células.

Líneas celulares

Las células incluidas: (1) IMR-32 (ATCC N°. CCL-127), una línea celular de neuroblastoma humano con un nivel de expresión muy alto de receptores de somatostatina (SST), predominantemente SST-2; (2) SKNSH (ATCC N°. HTB-11), una célula metastásica de médula ósea de neuroblastoma humano que carece de receptores de somatostatina como se define por un ensayo de unión o por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RTPCR); y (3) SK-R2, una línea celular derivada de SKNSH transfectada con el gen para el receptor de SST-2. Las células SK-R2 e IMR-32 expresan los receptores de somatostatina tipo 2 (SST-2). Las células SKNSH no expresan a los receptores de somatostatina y sirven como control negativo. Las líneas celulares fueron obtenidas de la ATCC (IMR-32 y SKNSH) o de la Universidad del Estado de Ohio (Columbus, Ohio) (SK-R2). Todas las líneas celulares fueron mantenidas en CO₂ del 5% a 37°C en el medio definido por los proveedores de las líneas celulares.

Unión del péptido y ensayo de internalización

Las células fueron recuperadas, contadas con un hemocitómetro, y resuspendidas en tampón de unión (Medio Mínimo Esencial (MEM), Hepes 10 mM, BSA al 0,01%). El ensayo estándar usó 500.000 células en 1 ml de tampón de unión. El ligando radiactivo solo (500.000 cpm), o en combinación con un exceso molar de al menos 1.000 veces (10⁻⁶ M) del compuesto no radiactivo (para calcular la unión específica), fue añadido a un volumen final de 1 ml.

ES 2 307 325 T3

En la terminación del experimento, el medio de incubación fue eliminado, las células fueron aclaradas dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), y la radiactividad en las células fue determinada usando un contador gamma. Este nivel de radiactividad representa la unión total, lo que incluye tanto las fracciones de la membrana unidas como las interiorizadas. La unión específica fue determinada calculando la diferencia en los niveles de radiactividad medida sin el competidor no marcado menos la radiactividad con el competidor no marcado.

Para distinguir entre la unión a la membrana y la intracelular, las células fueron incubadas posteriormente durante 10 minutos a 4°C con HBSS acidificado (pH=4-5), fueron aclaradas en HBSS, y la radiactividad fue determinada de nuevo usando el contador gamma. Ya que el lavado ácido preferencialmente liberaba el ligando radiactivo de la superficie externa de la célula, la radiactividad restante fue atribuida a las fracciones interiorizadas. La unión asociada a la membrana entonces fue calculada como la diferencia entre la unión total y las fracciones interiorizadas.

Unión de ligando e internalización como una función del tiempo

Los tiempos para la unión de ligando e internalización fueron analizados usando los métodos de ensayo estándar descritos anteriormente. Todos los ligandos radiactivos y competidores usados fueron análogos de somatostatina que se unían preferencialmente a los receptores de las células SST-2. La primera serie de experimentos usaba las células IMR-32 que fueron expuestas a un radioligando durante períodos variables de tiempo (hasta 72 h). El medio de incubación fue sustituido al menos cada 48 h. Los radioligandos incluyeron ¹²⁵I-WOC-4a, ¹³¹I-WOC-4a, ¹²⁵I-WOC-3b e ¹¹¹In-pentetreotido. El competidor no marcado era el acetato de octreotido. WOC-4a y WOC-3b son análogos de somatostatina preferentes de SST-2 multi-tirosinados que pueden ser marcados a una alta actividad específica (8.800 Ci/mmol) y todavía conservar una alta actividad biológica y afinidad de unión con el receptor (Kd = 1 nM). WOC-3b y WOC-4a tienen las mismas estructuras y la síntesis que WOC-3B y WOC-4 descritas en la patente de EE.UU. N°. 5.597.894.

Los datos de unión específica e internalización para los compuestos radiomarcados ¹²⁵I-WOC-4a, ¹³¹I-WOC-4a, ¹²⁵I-WOC-3b y ¹¹¹In-pentetreotido son representados en las Figuras 3, 4, 5 y 6, respectivamente. Los datos indican que la unión de análogos de somatostatina a sus receptores celulares aumentaba con el tiempo con una unión máxima a las 48-72 horas. Las fracciones significativas de radiactividad total (40-75%) fueron incorporadas dentro de la célula.

Ejemplo 3

Determinación de la velocidad de pérdida de radiactividad

Las líneas celulares y técnicas de ensayo fueron como se describe en el Ejemplo 2. Fueron incubadas células IMR-32 durante 48 h en ¹²⁵I-WOC-4a (1 CPM/célula) y fueron lavadas tres veces en HBSS. Las células fueron contadas para determinar la radiactividad de la línea de fondo. Las células fueron mantenidas en MEM con suero bovino fetal del 10% (FBS), y el medio fue sustituido a diario. La radiactividad del medio sustituido fue contada, y la pérdida en tanto por ciento de radiactividad de las células fue calculada con el tiempo. Se muestran estos resultados en la Figura 7, que muestra que el tiempo de retención de ¹²⁵I-WOC-4a era de aproximadamente 11 días. Este resultado es altamente sorprendente ya que la semivida biológica descrita de somatostatina se mide en minutos, y todas las semividas de análogos de somatostatina conocidas son medidas en horas (acetato de octreotido, 90-120 minutos; lanreotido, 60-90 minutos).

Este experimento demostró que una vez que un compuesto radiomarcado es interiorizado en la célula, su tiempo de retención y por lo tanto su capacidad de suministrar la radiación a la célula es notablemente ampliada. El péptido interiorizado es protegido de la degradación, y la semivida física del isótopo se vuelve el determinante crítico de la dosis de radiación. Como la pérdida medida de radiactividad incluía cualquier pérdida debido a muerte celular y la subsecuente pérdida de integridad de membrana, el tiempo de retención real del radioligando dentro de una célula intacta podría ser algo más largo que los 11 días medidos.

Los resultados de los Ejemplos 2 y 3 proporcionaron tres observaciones importantes que apoyan el uso de este método en radiovisualización y radioterapia: (a) una proporción sustancial del receptor y su radioligando asociado fueron secuestrados dentro de la célula; (b) la internalización mediada por receptor progresiva ocurrió en un período amplio de tiempo (al menos 48 h); y (c) la internalización aumentó el tiempo de retención sustancialmente.

Ejemplo 4

Unión a células con y sin receptores de somatostatina

Para determinar que el radioligando se unía de hecho al receptor SST-2, fueron llevados a cabo experimentos con las líneas celulares IMR-32, SK-R2 y SKNSH. Fue usado ¹¹¹In-pentetreotido (1 CPM/célula) como radioligando y acetato de octreotido como competidor. Los métodos de ensayo fueron como los descritos en el Ejemplo 2. Los datos son representados en la Tabla 5.

TABLA 5

Unión de ^{111}In -pentetreotido a células con y sin receptores de somatostatina

	TOTAL	INTRACELULAR	MEMBRANA
IMR-32			
Unión total (CPM $\pm$ SD)	4,780 $\pm$ 928	2,408 $\pm$ 51	2,373 $\pm$ 417
Unión específica (CPM)	3,908	1,536	2,372
Kd = 4×10^{-9} M			
SKR-2			
Unión total (CPM $\pm$ SD)	36,261 $\pm$ 2,085	2,607 $\pm$ 672	33,655 $\pm$ 2,728
Unión específica (CPM)	35,475	1,792	33,683
Kd = 1×10^{-9} M			
SKNSH			
Unión total (CPM $\pm$ SD)	861 $\pm$ 30	775 $\pm$ 107	87 $\pm$ 114
Unión específica (CPM)	0	0	0

Como se observa en la Tabla 5, no fue detectada ninguna unión específica en las células SKNSH, que carecen de receptores de somatostatina. Sin embargo, en las células IMR-32, fueron observados niveles significativos de unión específica en la membrana plasmática y dentro de las células. La unión de membrana específica también fue observada en las células SK-R2 (genéticamente manipuladas para sobreproducir el receptor de membrana SST-2). En la línea celular SK-R2, el 95% de unión fue asociado a la membrana plasmática, y ocurrió relativamente menos internalización de ligando. El análisis gráfico de dispersión reveló una constante de disociación aparente (una medida de la afinidad de la unión entre el ligando y el receptor) de 1×10^{-9} M a 4×10^{-9} M para las células SK-R2 y IMR-32 respectivamente, que están en el intervalo esperado para estas interacciones receptor-ligando.

Este experimento demostró que (a) la unión de análogos de somatostatina a sus receptores y la internalización subsecuente es específica para células que expresan el receptor de somatostatina; y (b) la internalización requiere otros componentes celulares (probablemente elementos de transducción de la señal no vistos en las células genéticamente manipuladas), y no es una función intrínseca del receptor de membrana solo.

Ejemplo 5

Estudios de seguimiento de pulsos radiactivos

Para averiguar el papel de la competición después de la internalización, fueron incubadas células IMR-32 con un radioligando durante un tiempo suficiente para que ocurriera la internalización, y después fueron incubadas con el radioligando no marcado. Las células IMR-32 fueron incubadas de la noche a la mañana con ^{111}In -pentetreotido para cargar las células con el ligando radiactivo como se describe en el Ejemplo 2. Un grupo de tubos de cultivo fue lavado con ácido posteriormente y luego fue incubado durante 2 horas con un exceso de acetato de octreotido no marcado (un seguimiento en frío). Los niveles de radiactividad fueron comparados entonces con los de los tubos que no sufrieron el seguimiento en frío. Como se indica en la Figura 8, los niveles de radiactividad que permanecían en las células fueron similares tanto para los tubos control como para los de seguimiento en frío, indicando que una vez interiorizado el radioligando no competía con ningún compuesto no marcado. Estas observaciones tienen implicaciones significativas para el uso de análogos de somatostatina como la radioterapia: el ligando radiactivo intracelular no puede entrar en competencia con un competidor no marcado, y así será conservado en la célula.

Ejemplo 6

Experimentos de desplazamiento nuclear

5 Para determinar el movimiento intracelular de los análogos de somatostatina marcados, fueron incubadas células IMR-32 en matraces de cultivo celular T-150 que contenían Medio Mínimo Esencial con L-glutamina y aminoácidos no esenciales durante períodos variables de tiempo con los radioligandos ^{125}I -WOC-4a, ^{125}I -somatostatina y ^{111}In -pentetreotido. Las células fueron lavadas dos veces en medio a 4°C y fueron resuspendidas en sacarosa isotónica fría. Las células marcadas fueron pasadas por un homogeneizador de bolas tres veces para romper las membranas celulares dejando aproximadamente el 95% de los núcleos de las células intactos, de acuerdo con el método de Balch
 10 *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. **240**, p. 413 (1985). El homogeneizado de células fue mezclado con Percoll para dar una concentración final del Percoll al 0,292% y se centrífugo a 20.400 revoluciones por minuto en un rotor 40.2 de Beckman durante 45 minutos para generar un gradiente de densidades. Fueron usadas perlas de marcador de densidades (Pharmacia) para indicar los niveles de densidad en el tubo. El contenido del tubo fue fraccionado
 15 en una columna de fraccionamiento por gradientes de densidades ISCO. Los tubos resultantes fueron analizados según el contenido de somatostatina radiomarcada o análogos, el ADN para indicar núcleos, proteína, el marcador 5'-nucleotidasa de la membrana plasmática, y el marcador N-acetilglucosaminidasa del lisosoma. Fue hecha la asunción habitual de que la radiactividad medida en fracciones ricas en un cierto componente de la célula estaba asociada de hecho con aquel componente; por ejemplo, la radiactividad medida en una fracción rica en la membrana plasmática
 20 era debida a la asociación del compuesto radiomarcado con la membrana plasmática.

Los datos son representados en las Figuras 9A-C, 10A-C y 11A-C. La distribución de densidades se representa por triángulos en las figuras. Las fracciones nucleares fueron encontradas en el gradiente de densidades representado por los Tubos 12-15, y las fracciones de membrana por los Tubos 0-6. La figura 9 demuestra que la distribución celular inicial de ^{125}I -WOC-4a era principalmente sobre la membrana plasmática (Tubos 1-5). La figura 9A muestra que fue vista muy poca actividad nuclear a 1 h. A las 4 h, Figura 9B, la unión de la membrana todavía era indicada, pero la fracción nuclear comenzó a mostrar un aumento de la actividad. A las 24 h, Figura 9C, casi toda la actividad fue vista en las fracciones nucleares, indicando que ^{125}I -WOC-4a había sido trasladado al núcleo. Así, los datos indicaban que se requerían varias horas para que este compuesto radiomarcado se uniera a los receptores de membrana, para
 25 aquellos receptores que se interiorizaron en la célula, y para el radioligando que se trasladaba al núcleo. Los núcleos radiodesintegrantes entonces ionizarán el ADN, causando daño celular. Las figuras 11A (datos de 1 h), 11B (datos de 4 h) y 11C (datos de 24 h) indican que el tiempo de internalización y de desplazamiento para ^{111}In -pentetreotido era similar al de ^{125}I -WOC-4a.

35 La figura 10, sin embargo, indica que el tiempo para el movimiento de la ^{125}I -somatostatina natural era diferente. Tan pronto como en 1 h, Figura 10A, había tanta unión de membrana como pequeñas cantidades de unión nuclear. A las 4 h, Figura 10B, la unión a la membrana plasmática parecía haber alcanzado su punto máximo y la fracción nuclear se estaba disipando. A las 24 h, Figura 10C, este péptido radiomarcado de corta vida (una semivida biológica de 1 a 2 minutos) había abandonado completamente las células cultivadas, y no fue observada esencialmente ninguna unión a
 40 la membrana plasmática o nuclear.

El tiempo para que un compuesto radiomarcado se vuelva interiorizado es una función del tipo de receptor celular, del compuesto particular y del radioisótopo particular.

45 Ejemplo 7

Unión de somatostatina al ADN nuclear

Para demostrar que la somatostatina o su análogo se une al material genético, fue extraído ADN de las células que
 50 habían sido incubadas con el radioligando ^{111}In -pentetreotido, y fueron analizadas según su radiactividad.

Matraces T-75 en triplicado que contenían células IMR-32 y SKNSH que habían sido incubadas de la noche a la mañana con ^{111}In -pentetreotido como en el Ejemplo 2 fueron usados para la extracción del ADN. Las células fueron eliminadas de la superficie de cultivo usando un rascador de goma estéril. Las células suspendidas fueron lavadas
 55 tres veces en una solución salina tamponada fría de fosfato de Dulbecco y fueron tratadas con un procedimiento de extracción de ADN de acuerdo con las directrices del vendedor (células GenomicPrep® y kit de aislamiento de ADN a partir de tejido, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Las células fueron incubadas en la Solución de Lisis de Células del kit de aislamiento de ADN a 37°C durante 10 minutos. Después, $3\ \mu\text{l}$ de la solución de Rnasa fueron añadidos al lisado de células, seguido por la mezcla completa y la incubación a 37°C durante 1 hora. Las muestras fueron enfriadas
 60 a temperatura ambiente, y fueron añadidos $200\ \mu\text{l}$ de Solución de Precipitación de Proteína. Después de agitar, el contenido de cada tubo fue centrifugado a $14.000 \times g$ durante 1 minuto, y el pelete de ADN fue lavado con etanol del 70%. Después de secar el ADN fue hidratado en una Solución de Hidratación de ADN, y la concentración de ADN fue medida por espectrometría a 260 nm. Cantidades de cien microgramos ($100\ \mu\text{g}$) de cada tratamiento fueron transferidas a viales de recuento de radiactividad, y la cantidad de radiactividad asociada con cada uno fue medida en un contador gamma 5500 de Beckman. Los datos, así presentados en la Tabla 6, fueron obtenidos como cuentas por minuto (cpm).
 65 Las diferencias entre la radiactividad medida en células incubadas únicamente con radioligando y en células incubadas tanto con radioligando como con ligando no marcado fueron analizadas estadísticamente usando un test ANOVA. Se muestra la velocidad de acumulación de ^{111}In -pentetreotido en el ADN de células IMR-32 en la Figura 12.

Tabla 6: Incorporación de ^{111}In -pentetotridato $\pm$ acetato de octreotido en el ADN de células SST-2-positivas o SST-2-negativas

Células MR - 32 (SST-2 positivas)							
Tiempo (min.)	Sin desintegración corregida			Valores de desintegración corregida			p ¹
	Radioligando (CPM ± SD)	Radioligando + Ligando no marcado (CPM ± SD)	CPM específicamente unido (Diferencia)	Radioligando (CPM ± SD)	Radioligando + Ligando no marcado (CPM ± SD)	SPM específicamente unido (Diferencia)	
30	128 ± 28	83 ± 12	45	128 ± 28	83 ± 12	45	35
60	152 ± 165	83 ± 1	69	157 ± 165	83 ± 1	69	45
180	291 ± 44	165 ± 15	126	291 ± 44	165 ± 15	126	43
1440	264 ± 104	87 ± 6	177	338 ± 133	112 ± 8	226	67
2880	624 ± 59	203 ± 20	421	1023 ± 97	332 ± 33	690	67
Células SKNSH (SST-2 negativas) Sin desintegración corregida							
Tiempo (min.)	Radioligando (CPM ± SD)	Radioligando + Ligando no marcado (CPM ± SD)	CPM específicamente unido (Diferencia)	% específicamente unido	p'		
60	85 ± 8	91 ± 25	-6	0	NS		
1440	87 ± 1	80 ± 2	+7	8	NS		
4320	232 ± 10	174 ± 41	+58	25	NS		

¹Diferencias entre CPM del radioligando por sí mismo y del radioligando más ligando no marcado según se determina por ANOVA. NS = no significativo.

Además, el ADN de cada matraz fue partido por la mitad, y 1 mg de ADN de cada matraz fue tratado con proteasa-k (Life Technologies, Gaithersburg, MD) durante 1 hora a 37°C. El ADN tratado con enzima entonces fue precipitado de nuevo con etanol y acetato de sodio, fue lavado con etanol frío, y disuelto de nuevo en solución de hidratación de ADN. La concentración fue determinada por espectrofotometría a 260 nm. Cien microgramos (100 µg) de ADN tratado con proteasa y una cantidad igual de ADN no tratado fueron transferidos a viales de recuento de radiactividad y la cantidad de radiactividad fue medida en un contador gamma 5500 de Beckman, como se describe anteriormente. Los datos, así presentados en la Tabla 7 y la Figura 13, fueron obtenidos como cuentas por minuto (cpm).

TABLA 7

Unión de ¹¹¹In- pentetreotido al ADN celular⁽¹⁾

Experimento	CÉLULAS IMR-32		CÉLULAS SKNSH	
	Tratado con proteasa (CPM)	No tratado (CPM)	Tratado con proteasa (CPM)	No tratado (CPM)
1	10,276	11,512	122	316
2	9,564	10,122	412	319
3	12,648	14,566	208	220
Promedio + S.D.	10,829 ± 1614	12,066 ± 2273	247 ± 149	285 ± 56

⁽¹⁾ Los números representan las cuentas por minuto (CPM) para muestras de 100 µg de ADN para cada tipo de célula en experimentos con tres réplicas.

Como se muestra en las Tablas 6 y 7, una cantidad sustancial de ¹¹¹In-pentetreotido se asoció con el ADN celular de células IMR-32, mientras que prácticamente nada se unió al ADN de las células SKNSH. Como se discute anteriormente en el Ejemplo 4, las células SKNSH no tienen receptores de somatostatina tipo 2, y no interiorizan a los análogos de somatostatina radiomarcados.

Sorprendentemente, el ¹¹¹In-pentetreotido unido al ADN de células IMR-32 era resistente a los efectos de la proteasa-k no específica. En general, el tratamiento de proteasa eliminó sólo el 10-13% del CPM unido total, mostrando que la asociación del radioligando con el ADN no era debida a la unión a proteínas no específicas tales como histonas.

La cinética de unión del radioligando al ADN era comparable a la vista para el movimiento intracelular en IMR-32. Así, la velocidad de transducción intracelular del radioligando era aproximadamente igual a la velocidad de unión de ADN.

Ejemplo 8

Citotoxicidad de ¹²⁵I-WOC-4a

Fue sintetizado WOC-4a mediante técnicas de síntesis en fase sólida como se ha descrito previamente en el Ejemplo 2 y la patente N°. 5.597.894. Las células IMR-32 de neuroblastoma humanas (ATCC #CCL-127, Colección de Cultivos Tipo Americana, Rockville, MD), que antes se había demostrado que expresaban los receptores SST-2, y células de carcinoma epitelial pancreático humanas PANC-1 (ATCC #CRL-1469), que eran SST-2-negativas, fueron mantenidas en un cultivo a 37°C en aire humedecido con CO₂ al 5%. Fueron cultivadas células IMR-32 en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) con sales de Earle (Gibco, Grand Island, Nueva York) y fue suplementado con aminoácidos no esenciales, suero bovino fetal al 15% (Gibco, Grand Island, Nueva York), y un agente antibiótico-antimicótico (Gibco, Grand Island, Nueva York). Células PANC-1 fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (Gibco, Grand Island, Nueva York), que fue suplementado con suero de becerro fetal al 10% y una solución antibiótica-antimicótica. Ambas líneas celulares fueron transferidas una vez a la semana usando tripsina al 0,25% y EDTA 1 mM.

Para experimentos de citotoxicidad a corto plazo, fueron recuperadas las células, lavadas y sembradas en racimos de cultivo de células en 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) a una densidad de 5 x 10³ células/pocillo. En los experimentos a corto plazo, de dosis variables, las células fueron incubadas en tampón de unión (MEM, HEPES 10 mM, BSA al 0,01%). Fue añadido ¹²⁵I-WOC-4a a los pocillos apropiados a concentraciones variables de 0,1-100 CPM/célula. Después de la exposición, el medio radiactivo fue sustituido con medio de cultivo y las células fueron mantenidas durante cinco días adicionales. La viabilidad fue analizada con un ensayo de viabilidad de células enzimático de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) como se describe en R.F. Hussain *et al.*, "A New Approach for Measurement of Cytotoxicity Using Colorimetric Assay", *Journal of Immunological Methods*, vol. 160, p. 89 (1993). Fueron analizados entonces los resultados colorimétricos usando un lector de microplaca (Dynatech MR 500, Dynatech Labs, Chantilly, VA). Los resultados fueron expresados en densidades ópticas (OD).

En los experimentos de exposición a largo plazo, siete matraces T75 (Corning, Cambridge, MA) fueron sembrados con 25 millones de células IMR-32. Las células fueron incubadas durante 48 h a 37°C en una atmósfera humedecida de CO₂ al 5%/aire al 95% y fueron expuestas a uno de los siguientes: medio de control (tampón de unión); 1 CPM/célula de ¹²⁵I-WOC-4a; 1 CPM/célula de ¹²⁵I-WOC-4a con acetato de octreotido 10⁻⁶ M (Productos farmacéuticos Novartis, Hanovre Este, NJ); 1 CPM/célula de ¹²⁵I solo; 1 CPM/célula de ¹²⁵I con acetato de octreotido 10⁻⁶ M; o acetato de octreotido 10⁻⁶ solo. Las células entonces fueron recuperadas, lavadas tres veces con medio de cultivo recién preparado, y fueron crioconservadas durante 4 semanas a -85°C en 1 ml de medio de cultivo al 90% y DMSO al 10% (Sigma, San Louis, MO). Después de la crioconservación, las células fueron descongeladas rápidamente, y la viabilidad fue evaluada con azul de tripano de exclusión (n=3/grupo). El resto de las células fue puesto en placas de nuevo en placas de 96 pocillos (n=21/grupo) (Costar, Cambridge, MA) y fue cultivado en condiciones estándar durante 24 h. El ensayo MTT confirmó después la viabilidad de estas células.

Después de la exposición al fármaco a corto plazo, fue determinado el efecto de cada dosis de ¹²⁵I-WOC-4a sobre la viabilidad de células IMR-32 y PANC-1. La viabilidad de células promedio (±SD) fue calculada y el efecto de la dosis fue analizado por análisis de la varianza (ANOVA). Fueron usando tests t de student cuando la viabilidad era comparada para una concentración de fármaco sola entre los dos tipos de célula. En el grupo de exposición a largo plazo, la viabilidad de célula promedio (±SD) fue calculada para cada grupo de tratamiento y fue comparada con las del grupo de control por ANOVA (p <0,05).

Cuando células IMR-32 fueron incubadas durante 48 h con ¹²⁵I-WOC-4a a dosis variables de 0,1-100 CPM/célula, hubo una disminución dependiente de la dosis en la viabilidad de las células, como se mide por el ensayo de MTT. ¹²⁵I-WOC-4a indujo una disminución del 33% en la viabilidad de las células a una dosis de 1 CPM/célula y una disminución del 87% en la viabilidad de las células a una dosis de 100 CPM/célula (Figura 14). Estas diferencias eran estadísticamente diferentes por ANOVA (p <0,05). Sin embargo, cuando la línea celular SST-2 negativa (PANC-1) fue expuesta a las mismas concentraciones de ¹²⁵I-WOC-4a, no fue encontrada estadísticamente ninguna diferencia significativa en la viabilidad de las células entre el control y cualquier grupo de tratamiento (n=21 por grupo) como se muestra en la Figura 14. Estos resultados indican que después de una exposición a corto plazo (48 h), ¹²⁵I-WOC-4a induce una citotoxicidad dependiente de SST-2.

Para evaluar el efecto de una exposición a largo plazo (4 semanas) a ¹²⁵I-WOC-4a en células que expresaban SST-2, fueron expuestas células IMR-32 a 1 CPM/célula de ¹²⁵I-WOC-4a, 1 CPM/célula de ¹²⁵I-WOC-4a con acetato de octreotido 10⁻⁶ M, acetato de octreotido 10⁻⁶ solo, ¹²⁵I solo, o ¹²⁵I con acetato de octreotido. La viabilidad de las células de cada grupo de tratamiento fue comparada para controlar los valores después de cuatro semanas, exposición crioconservada. Se muestran estos datos en la Figura 15. ¹²⁵I-WOC-4a indujo una citotoxicidad estadísticamente significativa; sin embargo, no fue observada ninguna citotoxicidad después de la exposición a dosis similares de ¹²⁵I solo o ¹²⁵I con acetato de octreotido. Además, la citotoxicidad de ¹²⁵I-WOC-4a no estaba inhibida por la adición de un exceso de 10.000 veces de acetato de octreotido, implicando que la incorporación intracelular de pequeñas cantidades de ¹²⁵I-WOC-4a puede ser citotóxica para células SST-2-positivas. Esta técnica crioconservada permite una exposición a largo plazo al radioligando, pero previene de la proliferación de células, lo que podría enmascarar los efectos citotóxicos del radioligando.

Estos estudios demostraron que ¹²⁵I-WOC-4a inducía citotoxicidad en células de neuroblastoma que expresaban los receptores SST-2. Esto implica que ¹²⁵I-WOC-4a será un potencial agente terapéutico para tumores que contienen SST-2.

Ejemplo 9

Respuesta celular de hormona esteroidea

Para seguir el tiempo de respuesta de una hormona esteroidea, tres líneas celulares fueron incubadas con un estrógeno radiomarcado usando procedimientos similares a los del Ejemplo 2. Tres líneas celulares de cáncer de mama fueron usadas; MCF-7 (ATCC N°. HTB-22), T-47D (ATCC N°. HTB-133) y ZR-75-1 (ATCC N°. CRL-1500). El estrógeno usado fue el 17-β-estradiol, el principal estrógeno segregado en seres humanos. El compuesto radiomarcado fue ¹²⁵I-17-β-estradiol, que fue obtenido de New England Nuclear o fue sintetizado según el procedimiento siguiente: Una columna G-10 de Sephadex de 10 ml fue equilibrada durante 1 h con PBS 0,1 M. Una solución fue preparada de 12,5 μg del conjugado de estradiol (BL-43), 25 μl de metanol, 50 μl de tampón fosfato 0,05 M, pH 7,5, Na¹²⁵I 3 mCi, y 25 μl de una mezcla de 10 mg de cloramina-T y 10 ml de tampón fosfato 0,05 M. Después de la mezcla durante 40 s, fueron añadidos 25 μl de metabisulfito de sodio 20 mg/10 ml tampón fosfato 0,05 M y fueron mezclados 40 s más. La mezcla entonces fue añadida a la columna Sephadex y fue eluida primero con PBS 0,1 M. Finalmente, el estradiol radiomarcado fue eluido con PBS 0,1 M y 1,4-dioxano (70:30).

El procedimiento de unión estándar descrito en el Ejemplo 2 fue usado pero fue usado estradiol radiomarcado como ligando con 1000x de exceso de estradiol no radiactivo como competidor. A diferencia de los péptidos que deben unirse inicialmente a la membrana plasmática, los esteroides se unen sólo a los receptores intracelulares. Así, no debería ser encontrada ninguna radiactividad en la membrana. La Tabla 8 muestra los datos de este experimento.

TABLA 8

Unión específica de ^{125}I -17- β -estradiol con el tiempo

Línea celular	1 h (CPM)	4 h (CPM)	24 h (CPM)	48 h (CPM)
T-47D	401	506	532	455
ZR-75-1	4102	4865	3370	3057
MCF-7	1605	2253	4109	731

Los datos demuestran la unión específica para las tres líneas celulares a diferentes densidades. Esta unión y radiactividad fueron mantenidas durante al menos 24 h. Estos datos son similares a los datos de respuesta para hormonas peptídicas. La acumulación progresiva del esteroide radiomarcado en las tres líneas celulares es demostrada en las Figuras 16A, 16B y 16C. La velocidad de acumulación depende de la línea celular. Así, la terapia de infusión causaría altas velocidades de acumulación y de retención de esteroides radiomarcados.

Ejemplo 10

Resultados preliminares de un ensayo clínico piloto de infusiones de ^{111}In -pentetreotido 180 mCi mensuales

Durante seis meses, fueron llevados a cabo ensayos clínicos piloto en diez pacientes humanos con cánceres indolentes metastásicos progresivos y neuroendocrinos sintomáticos que expresaban el receptor de somatostatina. Se dieron a los diez pacientes de una a seis dosis de ^{111}In -pentetreotido. La primera dosis mensual era una inyección en bolo de 180 mCi. La segunda dosis mensual fue la infusión de 180 mCi en unas 72 h. La tercera dosis mensual fue la infusión de 180 mCi en unas 24 h. A partir de entonces, todas las dosis mensuales fueron la infusión de 180 mCi en unas 24 h. Los beneficios clínicos (como se prueba por un menor dolor, ganancia de peso, menor malestar, etc.) ocurrieron en 6 de los 10 pacientes neuroendocrinos (células carcinoides/islote). Respuestas radiográficas parciales (mayores que la reducción del 50% del producto de los diámetros tumorales perpendiculares) ocurrieron en 2 pacientes, y una necrosis tumoral significativa fue desarrollada en 7 de los 10 pacientes neuroendocrinos. La toxicidad relacionada con el tratamiento incluyó plaquetas 2 Grado III, 1 Grado II WBC, 1 Grado I WBC y 2 Grado I Hb según la escala de clasificación del INC (Instituto Nacional del Cáncer). Este experimento demostró que ^{111}In -pentetreotido en dosis mensuales de 180 mCi era un agente antineoplásico eficaz y bien tolerado en algunos sujetos con neoplasmas con expresión del receptor de somatostatina.

Ejemplo 11

Descripción del diseño del ensayo

Futuros ensayos clínicos comenzarán con un ensayo no aleatorio para comparar la administración en bolo e infusional de ^{111}In -pentetreotido 180 mCi. Hasta 30 participantes serán reclutados de aproximadamente 100 pacientes con cánceres neuroendocrinos que expresan el receptor de somatostatina metastásicos, como se define por una exploración (Octreoscan®) diagnóstica de ^{111}In -pentetreotido 6 mCi positiva. La mayoría de estos pacientes ya ha recibido octreotido y todavía muestra signos de progresión lenta en la exploración CT, marcadores bioquímicos y/o síntomas clínicos (estado clínico, pérdida de peso, aumento del malestar, etc.).

Población de estudio y elegibilidad

Los sujetos habrán completado una terapia “estándar de atención médica” y todavía mostrarán signos de enfermedad progresiva. La mayoría de sujetos con malignidad del sistema endocrino habrán tenido al menos un año de bioterapia anterior con octreotido o interferón. Los pacientes con malignidades no endocrinas habrán tenido quimioterapia “estándar de atención médica” o radioterapia. Un subconjunto de estos pacientes habrá recibido radioterapia de rayos externa a huesos que soportan peso y/o quimioterapia citotóxica.

Después de una exploración de ^{111}In -pentetreotida dosimétrica y exploraciones CT, los sujetos que muestren una respuesta patológica del radioisótopo en las áreas correspondientes a los sitios de enfermedad metastásica serán elegibles para el ensayo. Después de la dosis en bolo e infusional, los sujetos que respondan serán elegibles para seguir recibiendo tratamientos mensuales hasta la progresión de la enfermedad o garantías de regresión que paren esta terapia.

Intervención

¹¹¹In-pentetreotido será administrado como un bolo intravenoso (“iv”) rápido o como una infusión iv en unas 24 h. Cada sujeto servirá como su propio control. Una iv será comenzada y la dosis radiactiva será administrada en varios segundos, 24 h ó 72 h. Los pacientes recibirán hidratación iv (100 cc/h) con solución salina normal durante la terapia.

Algunos sujetos entonces entrarán en la parte de la escala de medicación de Fase I clásica del ensayo. Tres pacientes serán evaluados en las dosis siguientes de ¹¹¹In-pentetreotido: 180, 360, 540, 720, 900, 1080, 1260 y 1440 mCi. Es esperado que estas dosis serán administradas como una infusión iv continua en 24 h.

Objetivos

El objetivo principal del primer ensayo será determinar la velocidad óptima de administración de dosis de 180 mCi de ¹¹¹In-pentetreotido. Los recuentos sanguíneos y químico de sangre serán analizados antes y semanalmente durante 3 semanas después de cada tratamiento para identificar cualquier efecto tóxico. La exploración nuclear ocurrirá a diario durante 3 días, y durante los días 7, 14, y 21 después de la dosis para determinar las velocidades de secreción y respuesta. Muestras de plasma serán recogidas y almacenadas antes de la terapia y mensualmente durante 6 meses para analizar los biomarcadores relacionados con el tumor. Muestras de plasma adicionales y de orina serán recogidas a diario para calcular las velocidades de eliminación del radioligando. Serán realizadas exploraciones CT de mama, abdominales y pélvicas (para determinar la velocidad de respuesta radiográfica) antes de las primera y tercera dosis. Relaciones de respuesta radiactivas (tumor frente a línea de fondo), relaciones terapéuticas (tumor frente a riñón), velocidades de secreción, y dosis radiactiva (áreas bajo mRoentgen/h frente a la curva de tiempo) serán calculadas.

El objetivo principal del segundo ensayo será determinar la cantidad máxima tolerada de ¹¹¹In-pentetreotido que se puede dar. Las dosis siguientes de ¹¹¹In-pentetreotido serán evaluadas en grupos de 3 pacientes: 180, 360, 540, 720, 900, 1080, 1260 y 1440 mCi. Los mismos recuentos sanguíneos, químicos, exploración nuclear y evaluaciones radiográficas que se describen anteriormente serán realizados. Si al menos ocurren dos toxicidades de Grado IV de NCI relacionada con el fármaco, el tratamiento será terminado en aquel nivel. El número de cursos que pueden ser administrados será determinado entonces como limitación de la dosis.

Los pacientes serán examinados antes de cada tratamiento y mensualmente durante 3 meses después de la terapia. Su calidad de vida será evaluada según el estado clínico, incluyendo menor dolor, ganancia de peso o menor malestar. Las respuestas clínicas serán determinadas como presentes, ningún cambio o ausentes. Las respuestas bioquímicas serán evaluadas por la medida de cromogranina A en plasma y/o 5-HIAA urinario 24 h u otros marcadores relacionados con la enfermedad elevados. Una respuesta parcial es definida como una disminución del 50% o mayor en el marcador del tumor. Las respuestas radiográficas serán determinadas comparando el producto de los diámetros del tumor perpendiculares usando el siguiente criterio WHO: (a) Respuesta completa: la desaparición completa de la enfermedad; (b) Respuesta parcial: una disminución del 50% o mayor; (c) Respuesta estable: menos de una disminución del 50% y menos de un aumento del 20%; y (d) Enfermedad progresiva: mayor de un aumento del 20%.

Análisis de datos

El tamaño de la muestra para el estudio en fase I piloto es determinado con el objetivo de este estudio como se indica anteriormente. En un ensayo preliminar, si el fármaco en investigación es un 20% eficaz o más, uno o varios éxitos de tratamiento deberían ser vistos en los catorce primeros pacientes tratados, con un nivel de confianza del 95%. Si no es observado ningún éxito en los catorce primeros pacientes, el fármaco no merece ningún uso investigativo más. Así, el tamaño de la muestra para esta fase de estudio I será de catorce pacientes evaluables. 15 sujetos adicionales serán estudiados después de un análisis del intervalo de los 14 primeros sujetos. Este último grupo ayudará a la determinación de la toxicidad y la eficacia. Es esperado que los neoplasmas neuroendocrinos indolentes dominarán las 15 primeras sesiones ya que esta población ha mostrado el mayor potencial de beneficio.

Para determinar si la administración de In¹¹¹-pentetreotido en bolo o continua es óptima, las áreas bajo las 3 curvas (mRoentgen/h frente al tiempo) serán comparadas y las semividas serán calculadas. El método óptimo de administración será aquel método que cause el área bajo la curva más grande, con ensayos estadísticos estándar para comparar entre y dentro de sujetos dependiendo de la distribución de la varianza y si las medidas paramétricas son indicadas. El paquete de software estadístico NCSS o “Number Crunching Statistical Software” será usado.

*Ejemplo 12**Acumulación de análogos de somatostatina radiomarcados en células angiogénicas*

Para demostrar que los análogos de somatostatina radiomarcados se acumulan en vasos sanguíneos angiogénicos, se les implantaron a ratones desnudos células tumorales de neuroblastoma humano SKNSH que carecían de receptores de somatostatina. Se permitió a los tumores crecer a aproximadamente 1 cm de diámetro, un período de aproximadamente tres a cuatro semanas. A los ratones entonces les fueron inyectados 50 μ Ci de ¹²⁵I-WOC-4a. Se permitió que el radioligando se eliminase durante 1 semana. El Día 7 los ratones fueron explorados en una placa fotosensible y una

placa de rayos X estándar. Las radiografías resultantes fueron sobrepuestas en el registro para permitir la localización del radioligando. El radioligando fue localizado en el tumor. Como las células tumorales no tenían receptores para análogos de somatostatina y no podían unir el radioligando, fue concluido que el radioligando visto en el área del tumor estaba unido por los vasos sanguíneos angiogénicos.

Fueron usadas células endoteliales vasculares derivadas de placenta humanas para analizar la unión de las células al análogo de somatostatina, ^{125}I -JIC-2D. El radioligando, un análogo de somatostatina, ^{125}I -JIC-2D, fue hecho por síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en la patente de EE.UU. N°. 5.597.894. Este péptido tiene una secuencia de aminoácidos siguiente: $\text{D-Lys-D-Tyr-D-Lys-D-Tyr-D-Lys-C}$ [Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-NH₂. Las células fueron obtenidas cultivando discos de venas placentarias humanas en coágulos de fibrina durante 14 días. En este método, una fracción de discos exhibe una respuesta angiogénica. Estos discos y sus brotes angiogénicos son recuperados mecánicamente y disociados por agitación. Los discos de vena entonces son desechados y las células endoteliales reunidas. Las células fueron recuperadas, contadas con un hemocitómetro, y resuspendidas en tampón de unión (Medio Mínimo Esencial (MEM), Hepes 10 mM, BSA al 0,01%). Un ensayo estándar usaba 500.000 células en 1 ml de tampón de unión. El ligando radiactivo solo (500.000 cpm), o en combinación con un exceso molar de al menos 1.000 veces (10^{-6} M) del compuesto no radiactivo (para calcular la unión específica), fue añadido a un volumen final de 1 ml. En la terminación del experimento, el medio de incubación fue eliminado, las células fueron aclaradas dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), y la radiactividad en las células fue determinada usando un contador gamma. Este nivel de radiactividad representa la unión total, lo que incluye tanto las fracciones de membrana unidas como interiorizadas. La unión específica fue determinada calculando la diferencia en los niveles de radiactividad medida sin el competidor no marcado menos la radiactividad con el competidor no marcado.

Para distinguir entre la unión a la membrana e intracelular, las células fueron incubadas posteriormente durante 10 minutos a 4°C con HBSS acidificado (pH=4-5), fueron aclaradas en HBSS, y la radiactividad fue determinada usando de nuevo el contador gamma. Ya que el lavado con ácido preferencialmente liberaba el ligando radiactivo de la superficie externa de la célula, la radiactividad restante fue atribuida a las fracciones interiorizadas.

Como se muestra en la Figura 17, el análogo de somatostatina radiomarcado unido a las células angiogénicas y la enorme mayoría del radioligando fue interiorizada en la célula.

Ejemplo 13

Inhibición del análogo de somatostatina radiomarcado del crecimiento de células angiogénicas

Para demostrar que los análogos de somatostatina radiomarcados inhiben el crecimiento de vasos sanguíneos angiogénicos, fue usado el modelo de angiogenesis de vena placentaria humana como se describe en J.C. Watson *et al.*, "Up-Regulation of Somatostatin Receptor Subtype 2 (SST-2) mRNA Occurs During the Transformation of Human Endothelium to the Angiogenic Phenotype", publicación presentada en el 12° Simposio Internacional de Péptidos Reguladores, Copenhague, Dinamarca, septiembre de 1996; J.C. Watson "SST-2 Gene Expression Appears During Human Angiogenesis", *Regulatory Peptides*, vol. 64, p. 206 (Resumen) (1996); y J.C. Watson "Breast Cancer Increases Initiation of Angiogenesis Without Accelerating Neovessel Growth Rate", *Surgery*, vol. 122, pp. 508-14 (1997). Venas placentarias humanas fueron cortadas en discos de 2 mm de diámetro y fueron incorporadas en gel fibrinógeno al 0,3%. Este gel entonces fue cubierto con medio de cultivo tisular que contenía suero de becerro fetal al 10-20% (FCS). En condiciones normales, cuerdas endoteliales comenzarán a brotar desde el borde del corte transeccionado de los discos de vena a los seis días.

Estos discos de vena fueron colocados en pocillos de tres placas de cultivo separadas. Se permitió a una placa de cultivo, la muestra de control, crecer sin tratamiento. Otra placa fue tratada con 50 $\mu\text{Ci/mL}$ del análogo de somatostatina radiomarcado, ^{111}In -pentetreotido; y la tercera placa fue tratada con cantidades equivalentes de $^{111}\text{In-Cl}$. Los discos entonces fueron incubados durante catorce días. Después de 14 días las placas de cultivo fueron examinadas según el número de pocillos en los cuales fue iniciado el crecimiento angiogénico. Se muestra la iniciación en porcentaje en la Figura 18. La iniciación en % vista en ambas placas de cultivo tratadas era sustancialmente menor que la placa de control. La iniciación en % más baja fue vista en la placa de cultivo tratada con ^{111}In -pentetreotido. La concentración molar del análogo de somatostatina radiomarcado añadido a las placas de cultivo estaba en el intervalo de femtomolar (10^{-15}). Esta concentración es 1000x o más baja que la concentración de análogo de somatostatina no marcado que se sabe que inhibe la angiogenesis; una concentración de 10^{-5} M a 10^{-8} M. Así cualquier efecto era debido al radiomarcador y no solamente a la presencia del análogo de somatostatina. Cualquier diferencia entre $^{111}\text{In-Cl}$ y ^{111}In -pentetreotido es debida a un efecto de emisión de Auger sobre el crecimiento de la célula angiogénica por el efecto de Auger sobre el ADN. Sólo el radiomarcador unido al análogo de somatostatina sería incorporado en el ADN. Así la mayor disminución es debida a esta incorporación y a la emisión de Auger sobre el ADN.

Usando un analizador de imagen digital, fue medida el área media del tejido que brota que rodea los discos. Como se muestra en la Figura 19, el área de los vasos (mm^2) era también sustancialmente menor en ambas placas de cultivo tratadas. De nuevo, la placa tratada con el ^{111}In -pentetreotido mostró la menor parte de área de nuevo crecimiento.

Para medir el índice de crecimiento del tejido vascular angiogénico, cada dos días durante el período de incubación de 14 días, fue medida la longitud de los brotes. Se da el índice de crecimiento según se mide por los mm/día para

las tres placas de cultivo en la Figura 20. De nuevo, el índice de crecimiento en las dos placas de cultivo tratadas está sustancialmente por debajo de él del control. Sin embargo, no hay ninguna diferencia en el índice de crecimiento entre las dos muestras tratadas.

Así, el análogo de somatostatina radiomarcado inhibió el crecimiento vascular angiogénico hasta a concentraciones mucho más bajas que las requeridas para el análogo no marcado para inhibir el crecimiento angiogénico. Esto indica que la emisión gamma causa alguna inhibición y la emisión de Auger por el análogo radiomarcado causaba una inhibición adicional. La inhibición más eficaz era del análogo radiomarcado, que incluía tanto el efecto de emisión de Auger como gamma.

Otros análogos de somatostatina serán analizados usando los mismos discos vasculares placentarios humanos. Estos discos serán colocados en pocillos de dos placas de cultivo separadas. Se permitirá a una placa de cultivo desarrollarse hasta su madurez sin tratamiento. La otra placa de cultivo será expuesta a varios tratamientos: (1) análogo de somatostatina radiomarcado (^{125}I -WOC-4a, ^{131}I -WOC-4a, ^{111}In -DPTA-WOC-4a, ^{111}In -DPTA-JIC-2D, ^{125}I -JIC-2D o ^{111}In -DPTA- ^{125}I -WOC-4a dual marcado o ^{111}In -DPTA- ^{125}I -JIC-2D); (2) análogo de somatostatina frío, no marcado (WOC-4a o JIC-2D); (3) radioisótopo solo (^{125}I o ^{131}I); (4) una combinación del análogo de somatostatina radiomarcado y su análogo no marcado correspondiente (por ejemplo, ^{125}I -WOC-4a y WOC-4A); o (5) una combinación del análogo de somatostatina frío no marcado y el radioisótopo desunido (por ejemplo, ^{125}I y WOC-4A). Los discos serán incubados durante tres días con el análogo presente en una dosis variables de 10 a 1.000.000 cuentas por pocillo. Después de tres días será añadido medio recién preparado y los discos serán observados hasta su madurez. El porcentaje de pocillos que inician una respuesta angiogénica será calculado para los pocillos no tratados y tratados. Los resultados de los diferentes tratamientos serán analizados con ANOVA.

De forma alternativa, para amplificar el grado de destrucción de células causado por la radiactividad, los discos de vena serán crioconservados y mantenidos congelados en nitrógeno líquido después de una exposición de tres días al radioligando. La congelación inhibirá la división celular, pero no afectará a la radiactividad. Otro grupo de placas será construido con discos de vena tratados de modo idéntica, pero con ninguna fuente de radiación. Al final de tres días de tratamiento, estos discos de vena serán recuperados, lavados y crioconservados en medio de cultivo tisular que contiene dimetilsulfóxido al 10% (DMSO). Estos discos de vena serán crioconservados en un congelador con control de velocidad y almacenados en nitrógeno líquido durante 2 meses, o durante un período que sea seis veces la semivida física del radioisótopo usado. En este tiempo, los discos de vena serán descongelados y replantados en pocillos conteniendo gel de fibrinógeno y se permitirá crecer como se describe anteriormente. Después de dos semanas de crecimiento, los pocillos tratados y no tratados serán comparados.

Estos experimentos demuestran que los análogos de somatostatina radiomarcados inhibirán selectivamente la iniciación o la promoción de la respuesta angiogénica humana en una manera similar a la inhibición del crecimiento de células tumorales en células tumorales con receptores de somatostatina. Así, para el uso de análogos de somatostatina radiomarcados en radiovisualización o en radioterapia para vasos sanguíneos angiogénicos, la administración por infusión será más eficaz que una inyección en bolo.

Ejemplo 14

Sobrerregulación de receptores de PDGF en células angiogénicas humanas

Usando el modelo de angiogenesis de venaplacentaria humana *in vitro* descrito anteriormente, los inventores sustituyeron discos tomados del endotelio vascular humano de la aorta y la vena cava inferior para analizar la presencia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y su receptor. Una respuesta angiogénica similar fue vista en catorce días de incubación de discos de 2 mm en un coágulo de fibrina al 0,3%, suplementada con suero fetal bovino. El ARN fue extraído de la vena cava inferior y la aorta que fue obtenida de donantes de órganos y de explantes angiogénicos de tejido coincidente cultivado como antes. Fueron llevadas a cabo reacciones en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) después sobre cada muestra con cebadores específicos para la cadena A y la cadena B de PDGF y el receptor usando 500 ng de ARN por reacción. Los cebadores fueron hechos de acuerdo con los datos de secuencia publicados. Los productos de la RT-PCR fueron analizados por electroforesis de gel lo que reveló bandas en las posiciones esperadas para estos productos en los explantes angiogénicas tanto de la aorta como de la vena cava inferior, pero no en sus vasos naturales correspondientes. Estos resultados fueron repetidos en muestras de vasos sanguíneos de tres pacientes con resultados idénticos. Esto sugiere tanto que la cadena A como la cadena B de PDGF pueden jugar un papel importante en la regulación de la respuesta angiogénica. Esto indica que la radioterapia dirigida hacia este factor de crecimiento o su receptor puede ser eficaz en el desarrollo restrictivo de la angiogenesis asociada con el crecimiento de tumores.

Cualquier experto ordinario en la técnica reconocerá que por técnicas similares a las descritas en los ejemplos anteriores, puede ser determinada la eficacia de la administración en bolo frente a la infusión de otros péptidos radiomarcados y esteroides para radioterapia y radiovisualización de tumores.

Por otro lado, en caso de un conflicto irreconciliable, sin embargo, la presente memoria descriptiva sería la que contaría.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un compuesto radiomarcado dependiente del receptor para la fabricación de un medicamento para uso en una terapia para acumular selectivamente dicho compuesto radiomarcado dentro de células diana en un paciente, en el que las células diana son seleccionadas a partir del grupo que consiste en células tumorales y células angiogénicas, y en el que las células diana expresan receptores para el compuesto radiomarcado, comprendiendo dicha terapia administrar una dosis del compuesto radiomarcado al paciente por infusión durante un período mayor de dos horas.
- 10 2. Un uso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la velocidad de infusión es aproximadamente igual a la velocidad de respuesta celular y desplazamiento al núcleo del compuesto radiomarcado por las células diana.
3. Un uso como se reivindica en la reivindicación 1 ó 2, en el que el período de infusión está entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 30 días.
- 15 4. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el período de infusión está entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 5 días.
- 20 5. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas células diana son células tumorales.
6. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho compuesto radiomarcado comprende un péptido dependiente del receptor unido a un radioisótopo.
- 25 7. Un uso como se reivindica en la reivindicación 6, en el que dicho péptido dependiente del receptor se selecciona a partir del grupo que consiste en el factor de crecimiento del sistema nervioso, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, colecistoquinina, el péptido intestinal vasoactivo, el péptido liberador de gastrina, el factor inhibidor de la leucemia, somatostatina, oxitocina, bombesina, calcitonina, arginina vasopresina, angiotensina II, el péptido natriurético atrial, la insulina, glucagón, prolactina, la hormona del crecimiento, la gonadotropina, la hormona liberadora de tirotropina, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento, la hormona liberadora de la gonadotropina, hormona liberadora de la corticotropina, interleuquinas, interferones, transferrina, sustancia P, neuromedina, neurotensina, neuropéptido Y, opioides y sus derivados y análogos.
- 30 8. Un uso como se reivindica en la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho péptido dependiente del receptor es somatostatina.
- 35 9. Un uso como se reivindica en la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho péptido dependiente del receptor es un análogo de somatostatina.
- 40 10. Un uso como se reivindica en la reivindicación 9, en el que dicho análogo de somatostatina se selecciona a partir del grupo que consiste en octreotido, pentetreotido, vapreotido, lanreotido, WOC-3, WOC-3b WOC-4a y JIC-2D.
- 45 11. Un uso como se reivindica en la reivindicación 9 ó 10, en el que dicho análogo de somatostatina es pentetreotido.
12. Un uso como se reivindica en la reivindicación 9 ó 10, en el que dicho análogo de somatostatina es WOC-4a.
- 50 13. Un uso como se reivindica en la reivindicación 9 ó 10, en el que dicho análogo de somatostatina es WOC-3b.
14. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en el que dicho radioisótopo tiene una semivida entre aproximadamente una hora y aproximadamente 60 días.
- 55 15. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en el que dicho radioisótopo tiene una semivida entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 60 días.
16. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, en el que dicho radioisótopo tiene una semivida entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 60 días.
- 60 17. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, en el que dicho radioisótopo se selecciona a partir del grupo que consiste en ^{67}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y , ^{86}Y , ^{169}Yb , ^{188}Re , ^{125}I , ^{124}I , ^{123}I , ^{129}I , ^{131}I y ^{77}Br .
18. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, en el que dicho radioisótopo es ^{111}In .
- 65 19. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, en el que dicho radioisótopo es ^{125}I .
20. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, en el que dicho radioisótopo es ^{131}I .

21. Un uso como se reivindica en la reivindicación 6, en el que dicho compuesto radiomarcado se selecciona a partir del grupo que consiste en ^{111}In -pentetretotido (^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotido), (^{111}In -DOTA⁰-D-Phe¹-Tyr³)-octreotido, (^{90}Y -DOTA⁰-D-Phe¹-Tyr³)-octreotido, (^{86}Y -DOTA⁰-D-Phe¹-Tyr³)-octreotido, ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-RC-160, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RC-160, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CPTA-RC-160, ^{123}I -RC-160, ^{125}I -RC-160, ^{131}I -RC-160, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -octreotido, ^{188}Re -RC-160, ^{123}I -tyr³-octreotido, ^{125}I -tyr³-octreotido, ^{131}I -tyr³-octreotido, ^{125}I -lanreotido, ^{123}I -lanreotido, ^{131}I -lanreotido, ^{90}Y -DOTA-lanreotido, ^{86}Y -DOTA-lanreotido, ^{111}In -DPTA-lanreotido, ^{111}In -DOTA-lanreotido, ^{111}In -DPTA-somatostatina, ^{90}Y -DOTA-somatostatina, ^{86}Y -DOTA-somatostatina, ^{125}I -somatostatina, ^{131}I -WOC-3, ^{125}I -WOC-3b, ^{131}I -WOC-4a, ^{125}I -WOC-4a, ^{125}I -JIC-2D, ^{123}I -JIC-2D y ^{131}I -JIC-2D.
22. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho compuesto radiomarcado es acumulado en células tumorales seleccionadas a partir del grupo que consiste en tumores del sistema endocrino, melanomas, carcinomas de mama, tumores de célula Merkel, linfomas, carcinomas de pulmón de células pequeñas, tumores gastrointestinales, astrocitomas, gliomas, meningiomas, tumores carcinoides, tumores de célula de islote, carcinomas de célula renales, neuroblastomas y feocromocitomas.
23. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicho compuesto radiomarcado es ^{111}In -pentetretotido.
24. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho compuesto radiomarcado es ^{125}I -WOC-4a.
25. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho compuesto radiomarcado es ^{131}I -WOC-4a.
26. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho compuesto radiomarcado es ^{125}I -WOC-3b.
27. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho compuesto radiomarcado es ^{125}I -somatostatina.
28. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho compuesto radiomarcado es acumulado en células tumorales seleccionadas a partir del grupo que consiste en tumores de glándula pituitaria, tumores pancreáticos del sistema endocrino, carcinoides, paragangliomas, feocromocitomas, carcinomas medular de tiroides, carcinomas de pulmón de células pequeñas, neuroblastomas, meningiomas, linfomas, glucagonomas, carcinomas de mama, carcinomas de células renales, gliomas, astrocitomas y melanomas.
29. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en el que dicho compuesto radiomarcado es acumulado en células de neuroblastoma.
30. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en el que dicho compuesto radiomarcado es acumulado en células de carcinoma pulmonar de células pequeñas.
31. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en el que dicho compuesto radiomarcado es acumulado en células tumorales del sistema endocrino.
32. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho compuesto radiomarcado comprende un esteroide dependiente del receptor unido a un radioisótopo.
33. Un uso como se reivindica en la reivindicación 32, en el que dicho esteroide dependiente del receptor se selecciona a partir del grupo que comprende estrógeno, testosterona, progesterona, glucocorticosteroides, mineralocorticoides, y sus derivados y análogos.
34. Un uso como se reivindica en la reivindicación 33, en el que dicho esteroide dependiente del receptor es el estradiol.
35. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, en el que dicho radioisótopo tiene una semivida entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 60 días.
36. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35, en el que dicho radioisótopo tiene una semivida entre aproximadamente 5 horas y aproximadamente 60 días.
37. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 32 a 36, en el que dicho radioisótopo tiene una semivida entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 60 días.
38. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 32 a 37, en el que dicho radioisótopo se selecciona a partir del grupo que consiste en ^{67}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y , ^{86}Y , ^{169}Yb , ^{188}Re , ^{125}I , ^{124}I , ^{123}I , ^{129}I , ^{131}I y ^{77}Br .
39. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 32 a 38, en el que dicho radioisótopo es ^{125}I .

ES 2 307 325 T3

40. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 32 a 38, en el que dicho compuesto radiomarcado es ¹²⁵I-17-β-estradiol.

5 41. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 32 a 40, en el que dicho compuesto radiomarcado es acumulado en células de cáncer de mama.

42. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas células diana son células angiogénicas.

10 43. Un uso como se reivindica en la reivindicación 42, en el que dicho compuesto radiomarcado comprende un radioisótopo unido a un grupo que consiste en somatostatina, análogos de somatostatina, el factor de crecimiento endotelial vascular, y el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

15 44. Un uso como se reivindica en la reivindicación 43, en el que dicho análogo de somatostatina se selecciona a partir del grupo que consiste en octreotido, pentetreotido, vapreotido, lanreotido, WOC-3, WOC-3b, WOC-4a y JIC-2D.

20 45. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 43 ó 44, en el que dicho análogo de somatostatina es pentetreotido.

46. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 43 ó 44, en el que dicho análogo de somatostatina es WOC-4a.

25 47. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 43 ó 44, en el que dicho análogo de somatostatina es WOC-3b.

48. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 43 ó 44, en el que dicho análogo de somatostatina es JIC-2D.

30 49. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 43 a 48, en el que dicho radioisótopo tiene una semivida entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 60 días.

35 50. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 43 a 49, en el que dicho radioisótopo tiene una semivida entre aproximadamente 5 horas y aproximadamente 60 días.

51. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 43 a 50, en el que dicho radioisótopo tiene una semivida entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 60 días.

40 52. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 43 a 51, en el que dicho radioisótopo es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20.

53. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 42 a 52, en el que dicho compuesto radiomarcado es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 21, 23, 24, 25, 26 y 27.

45 54. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo además la etapa de visualizar la radiactividad en el área de dichas células diana por cintigrafía.

50 55. Un uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo además la etapa de repetir el procedimiento de la reivindicación 1 hasta que haya una disminución sustancial en el número de células diana en el paciente.

55

60

65

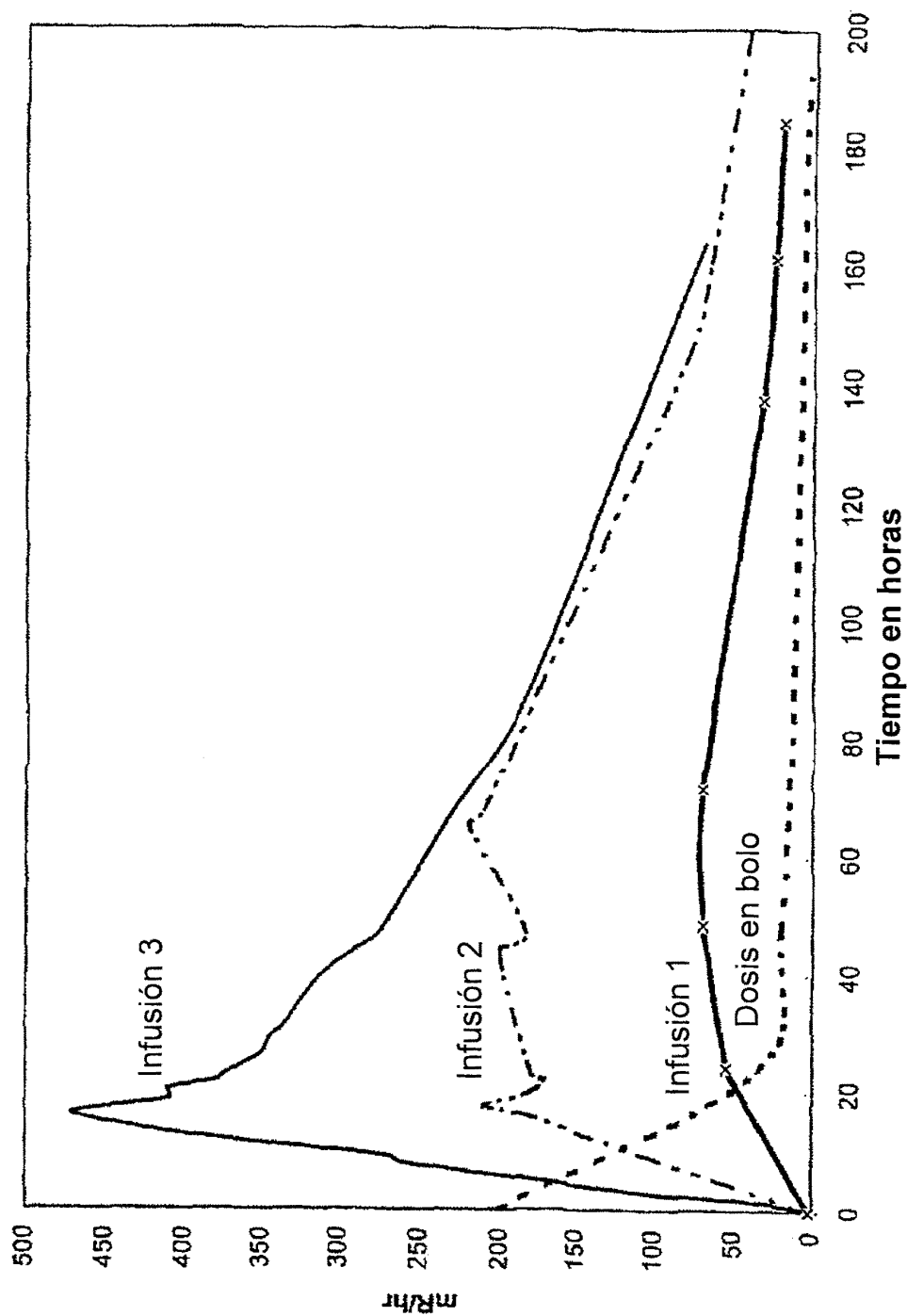
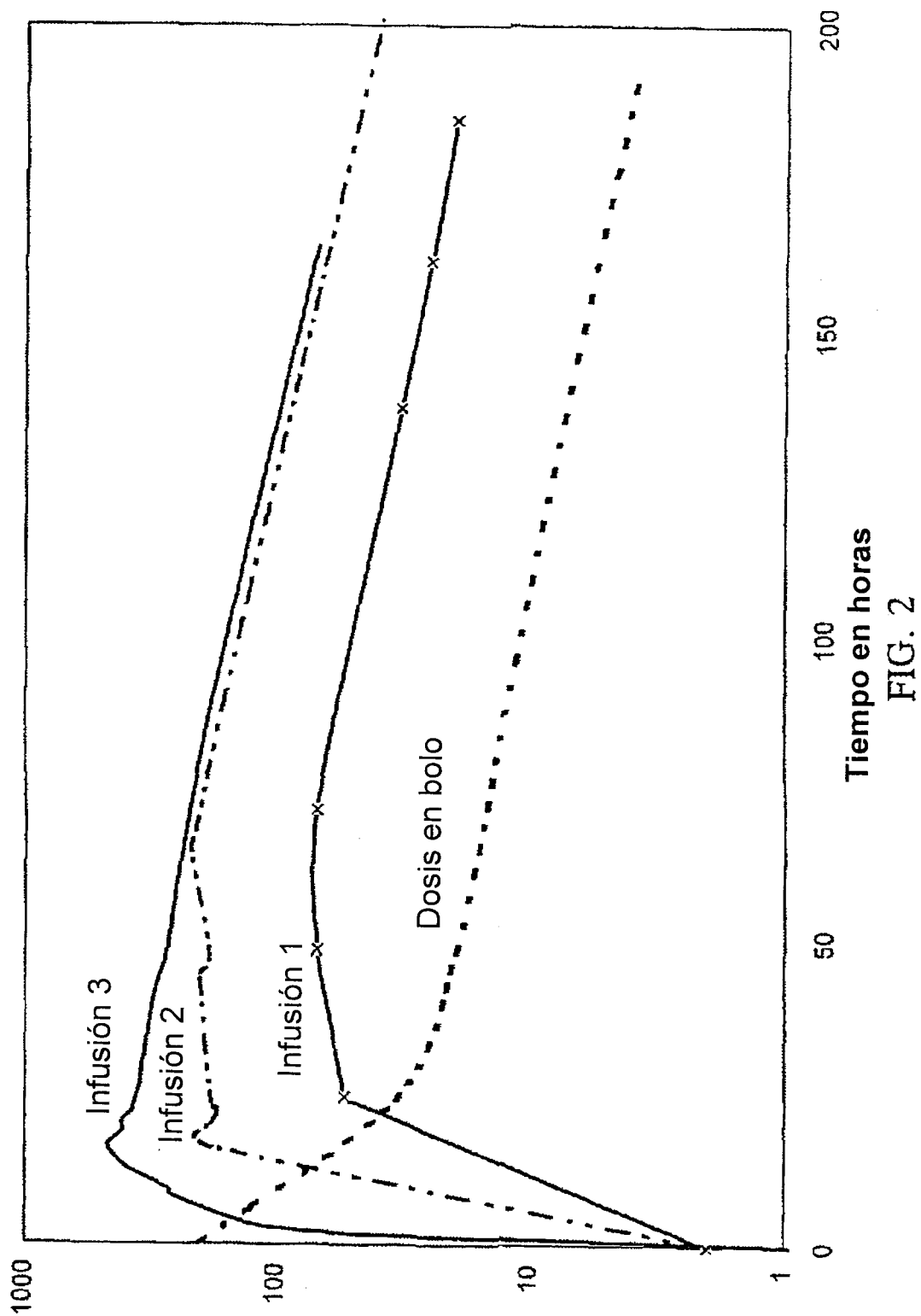


FIG. 1



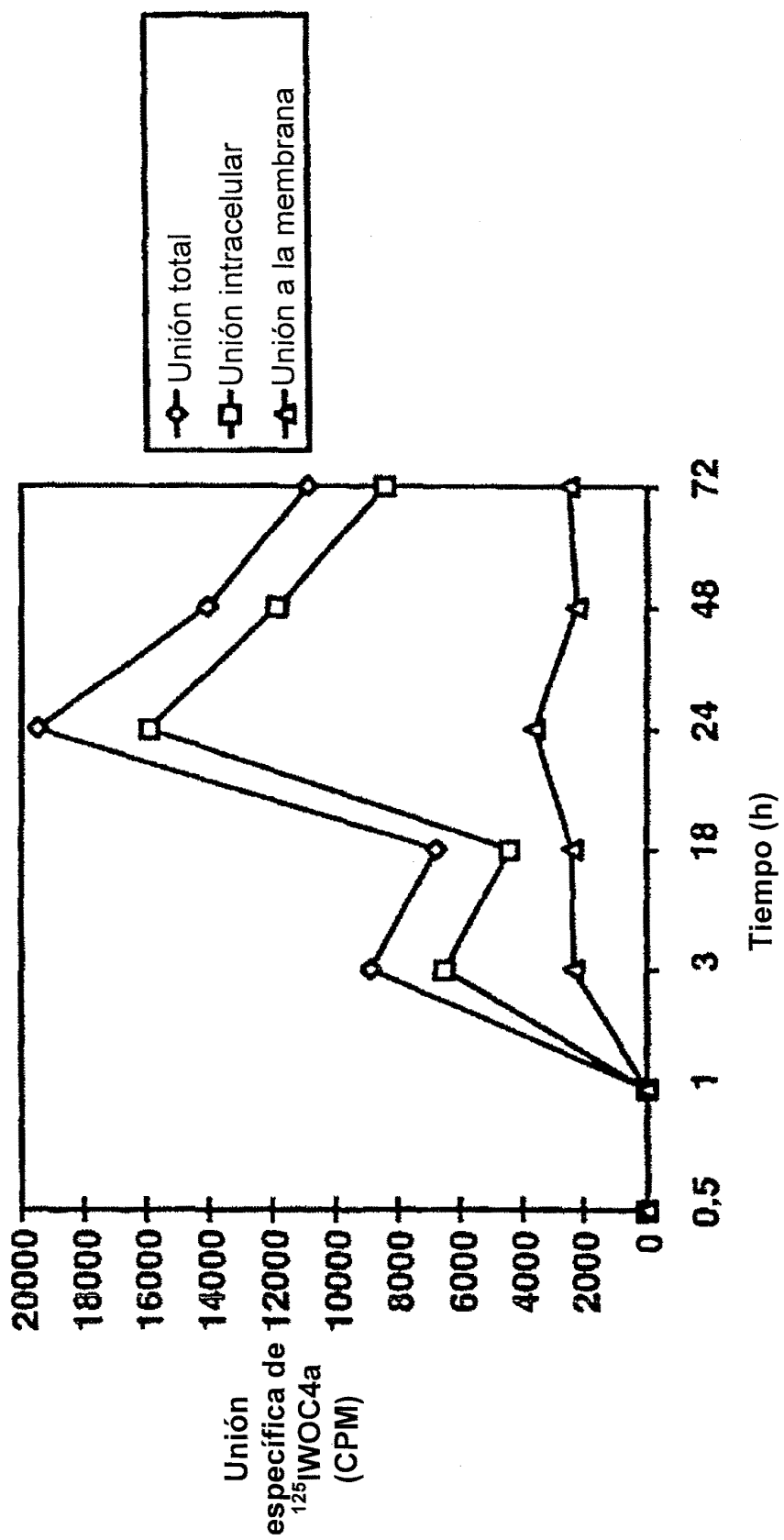


FIG. 3

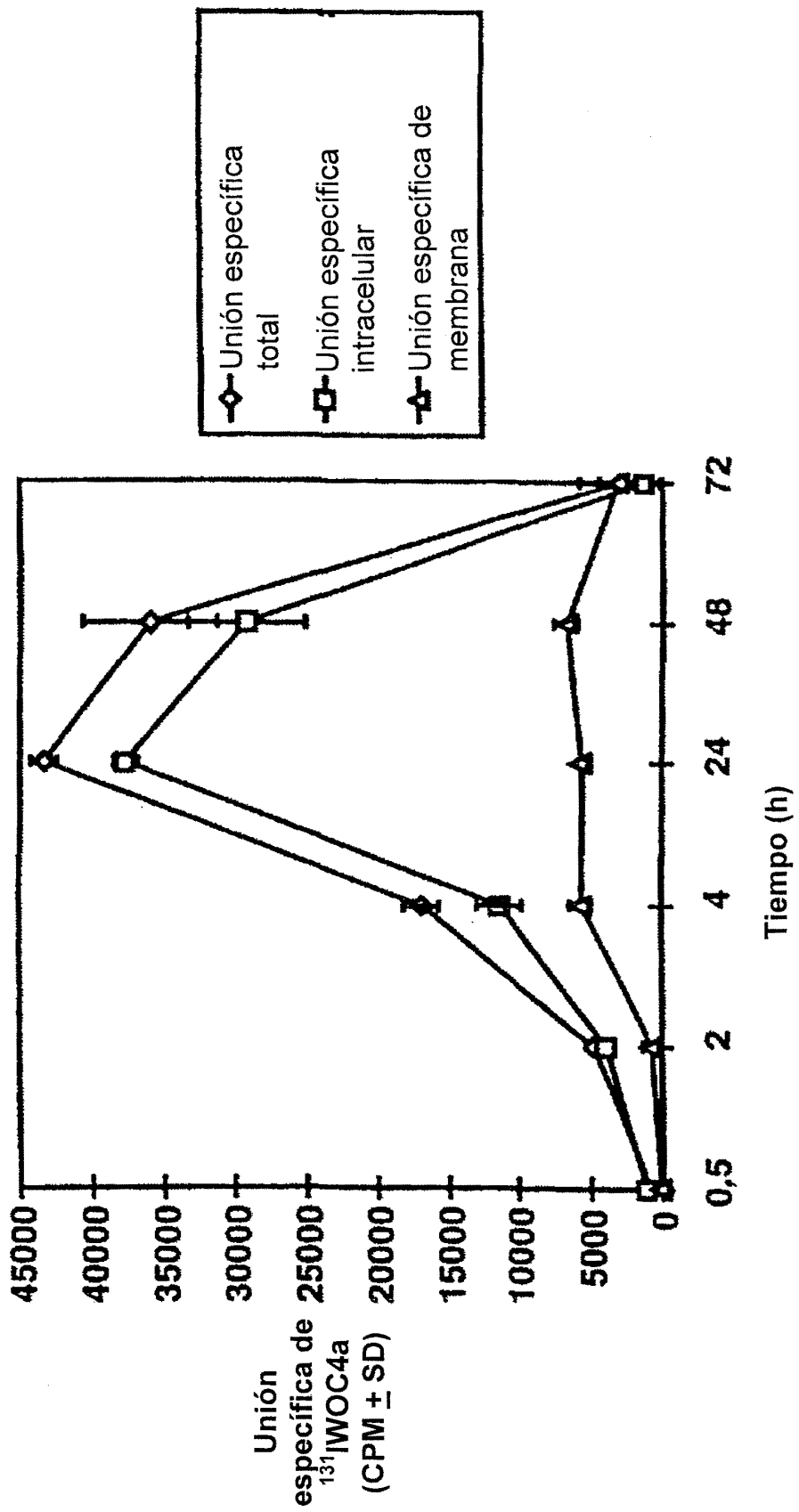


FIG. 4

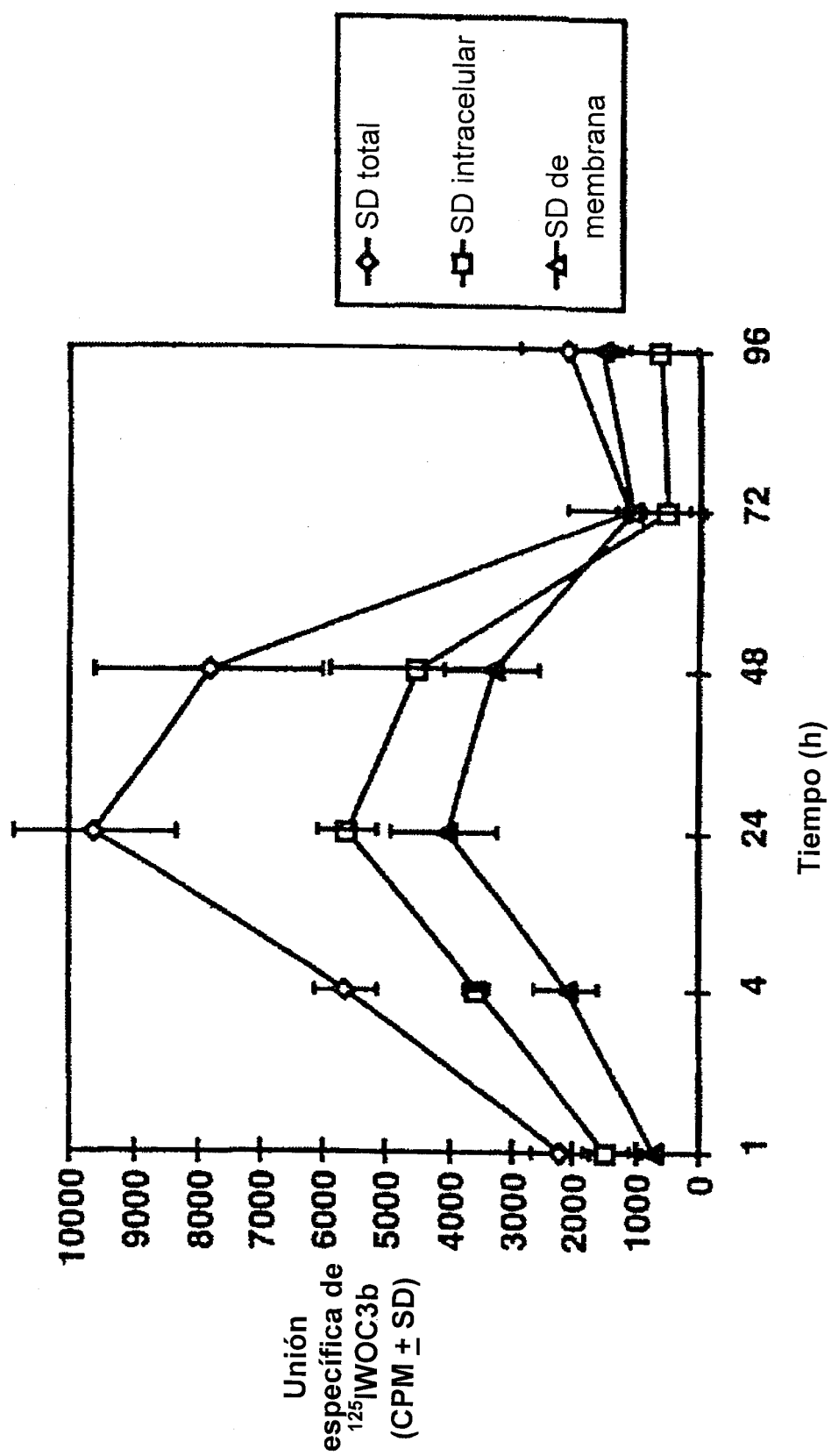


FIG. 5

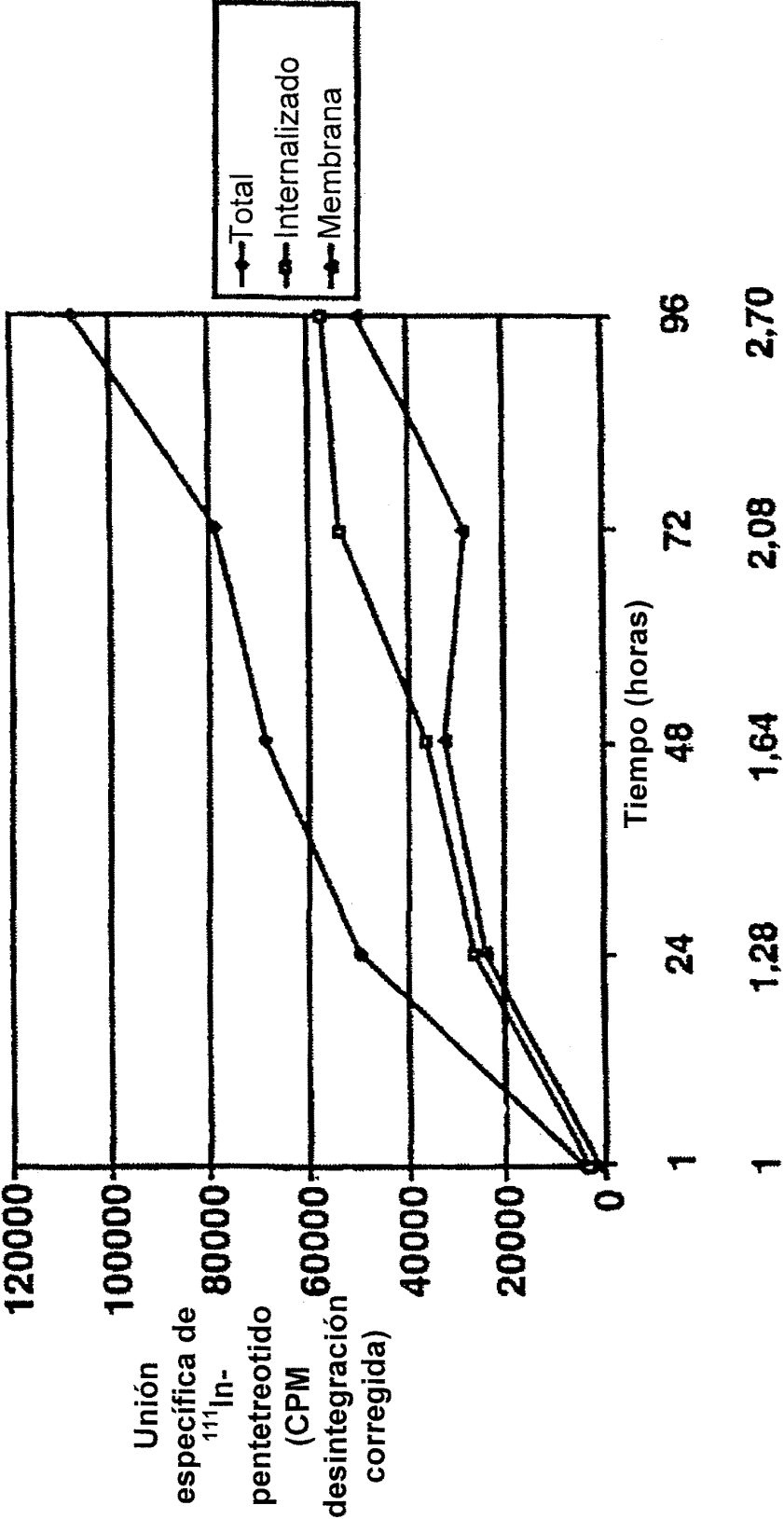


FIG. 6

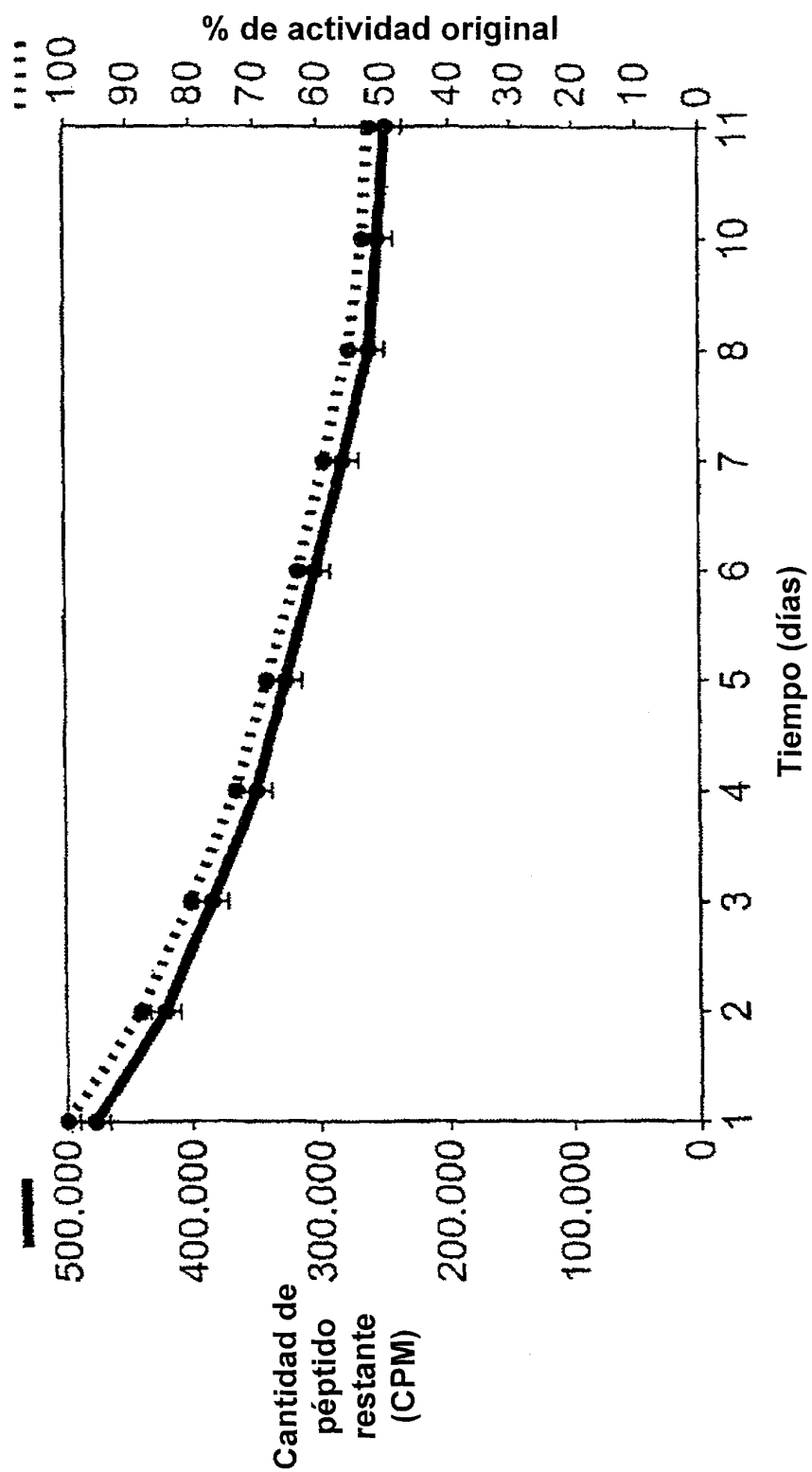


FIG. 7

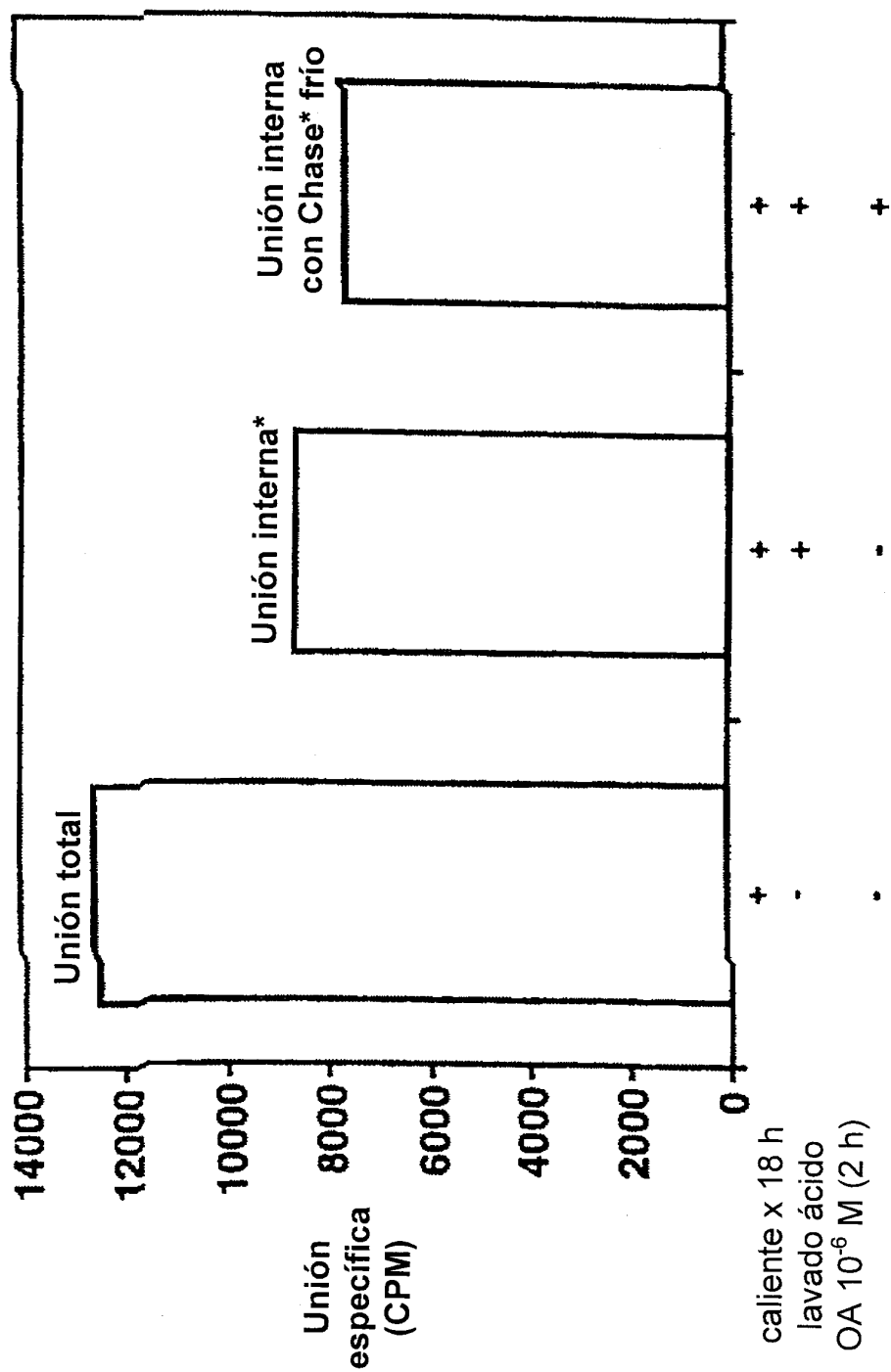


FIG. 8

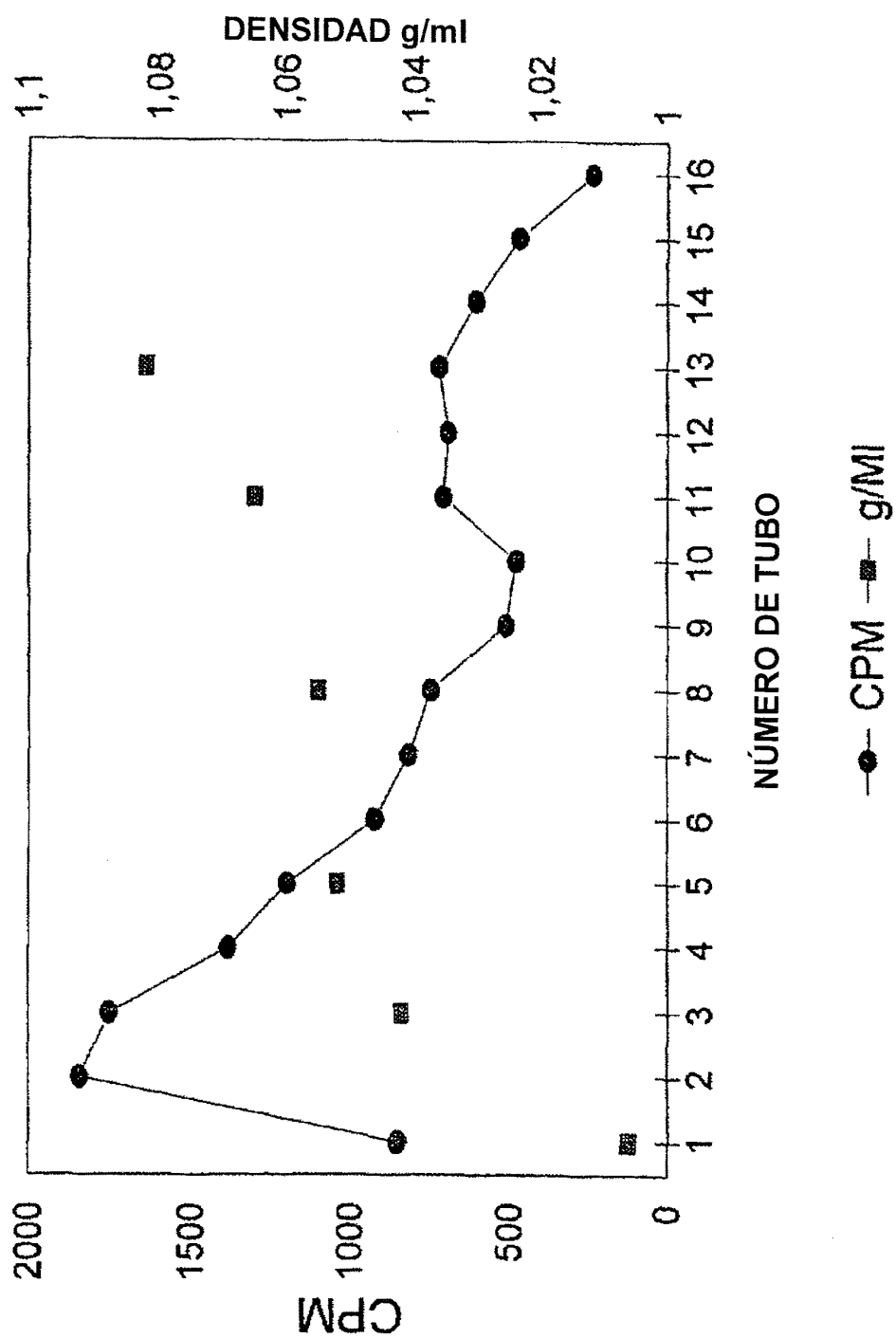
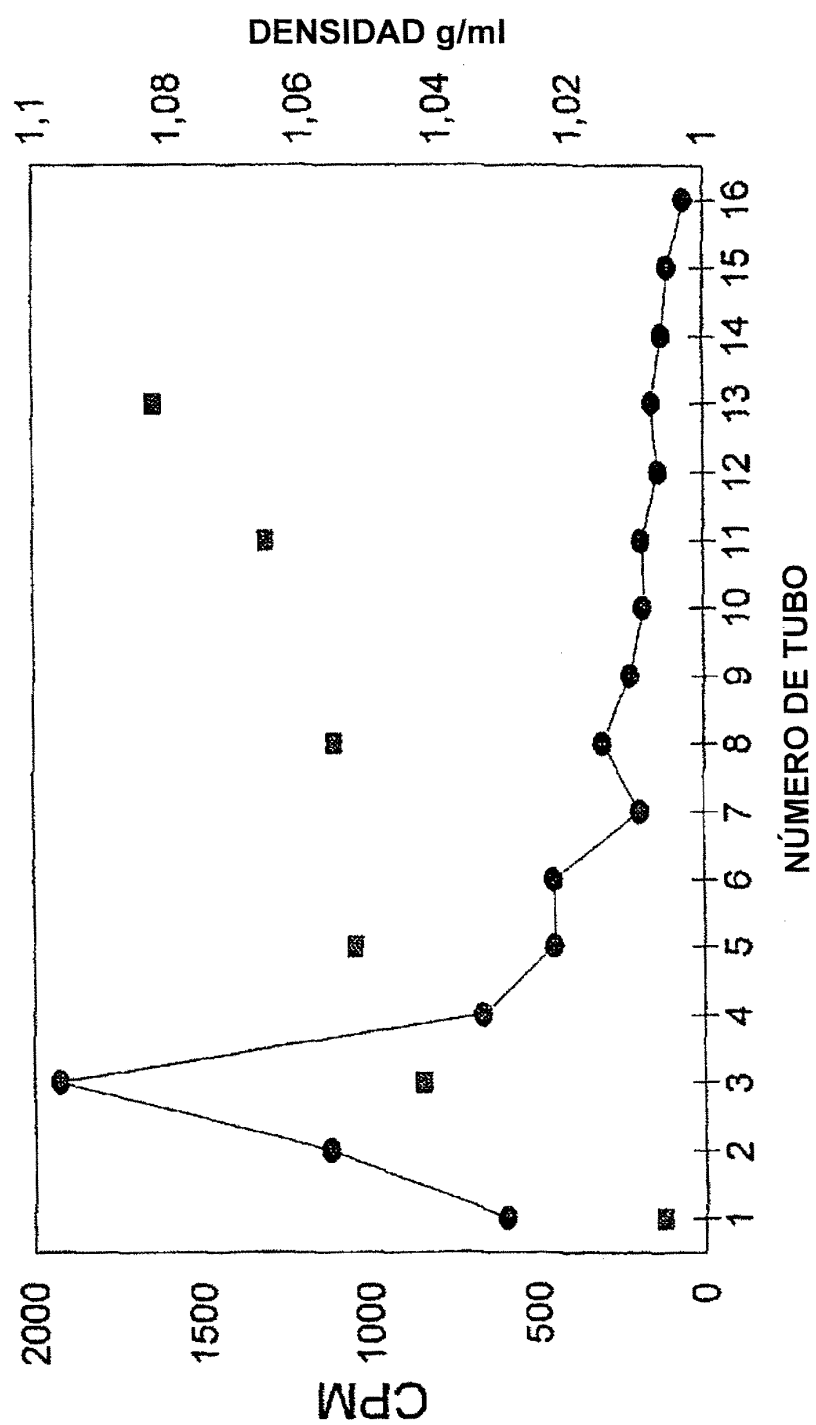


FIG. 9A



● CPM ■ g/ml

FIG. 9B

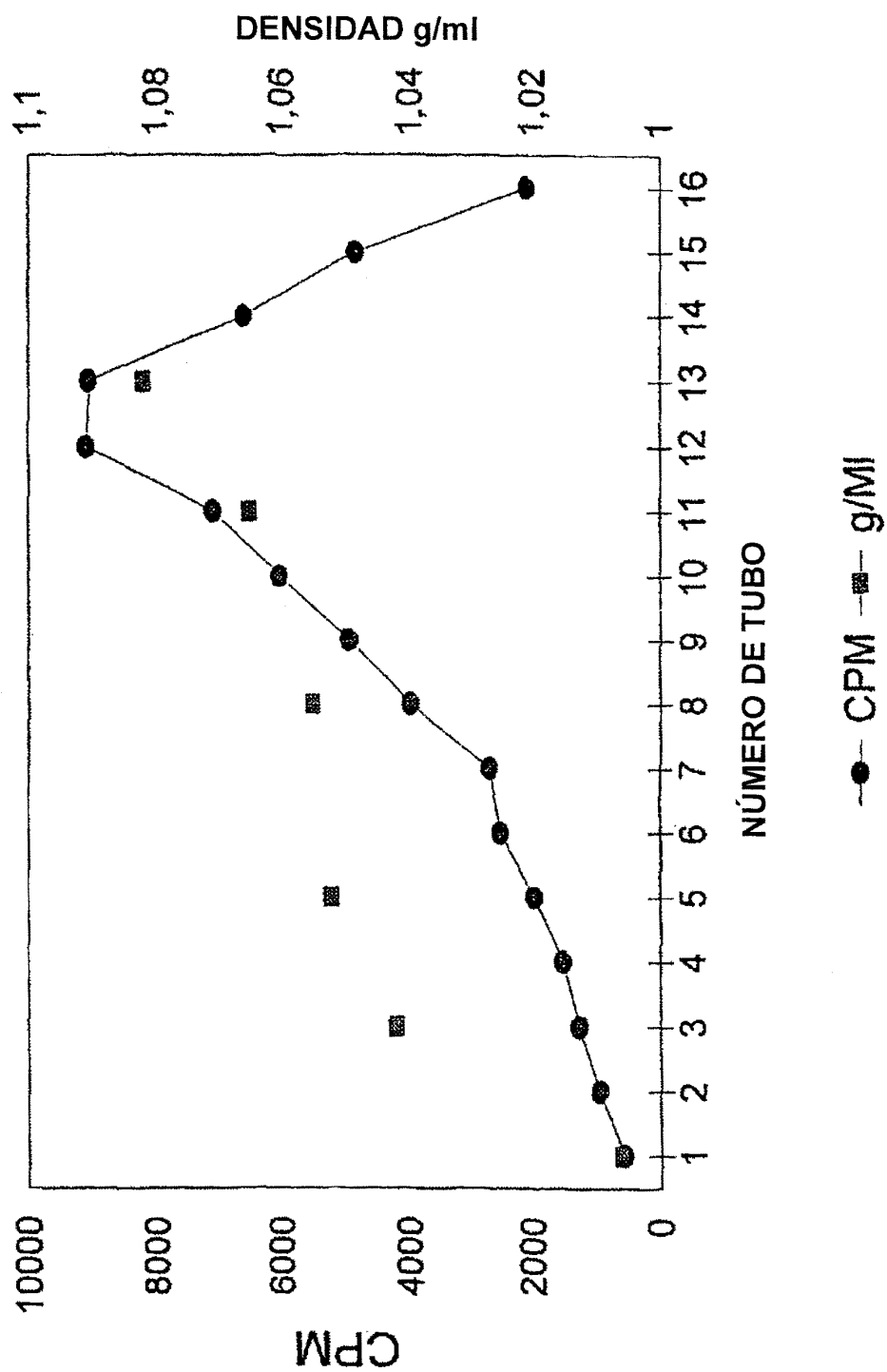


FIG. 9C

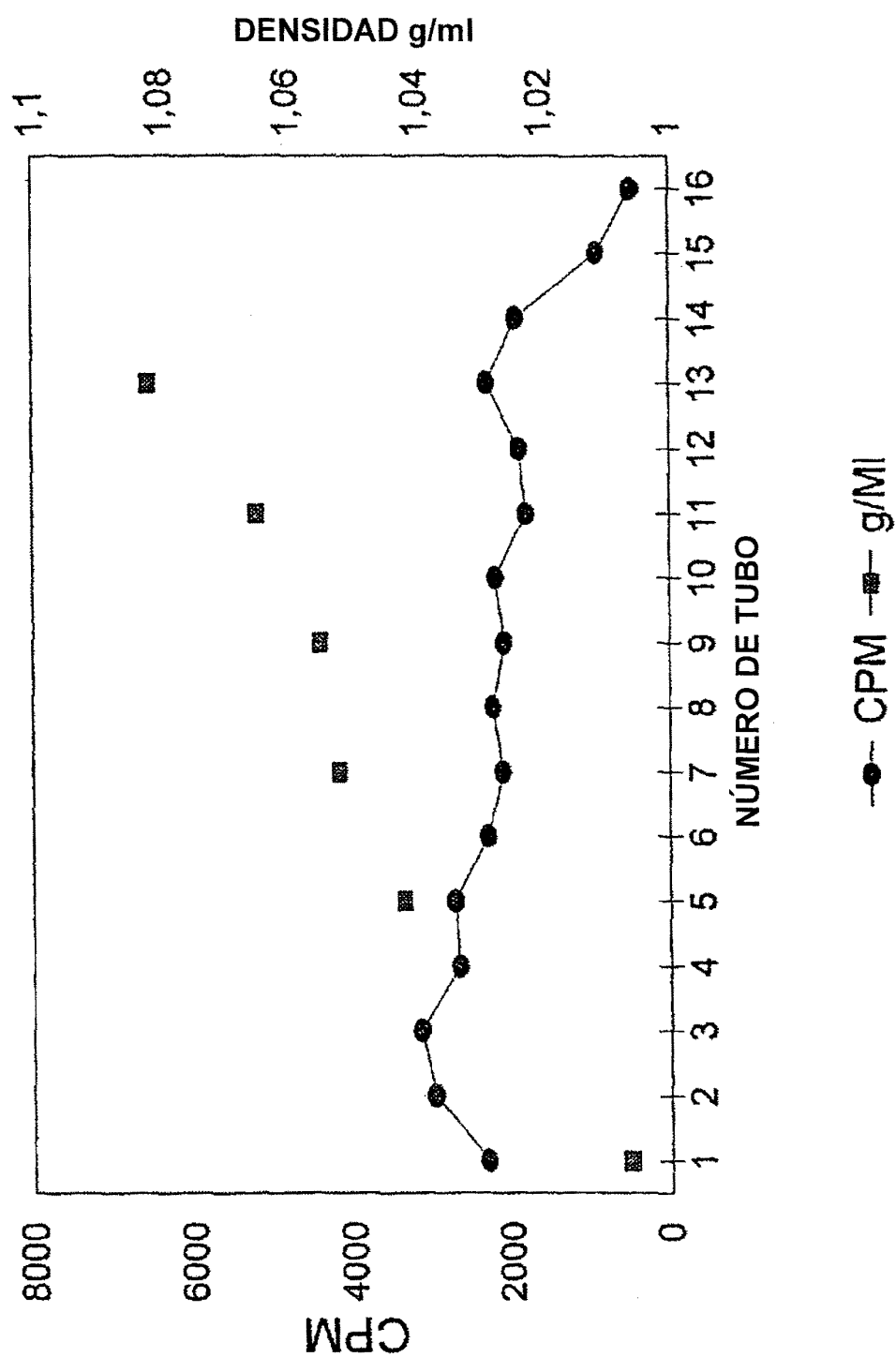


FIG. 10A

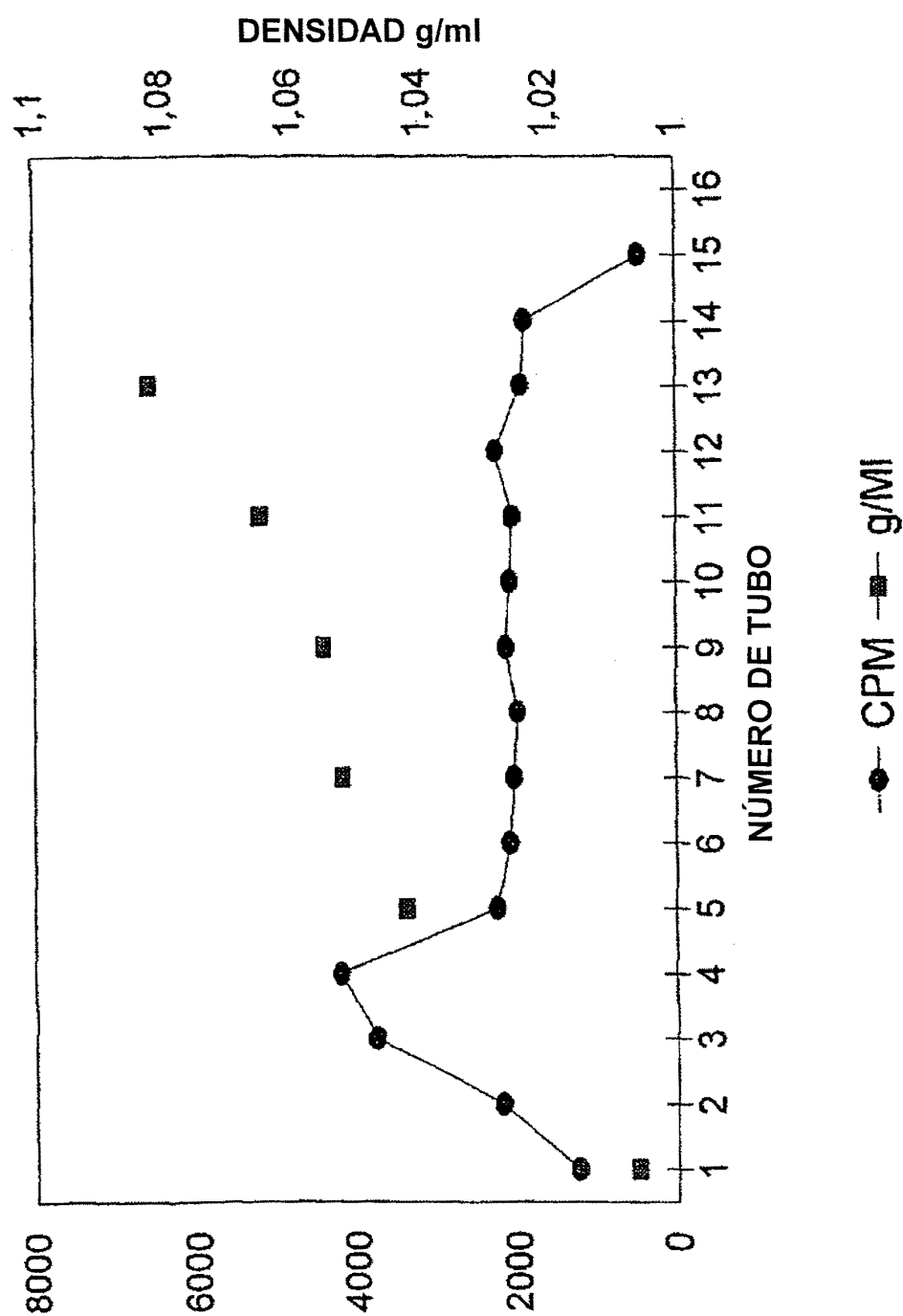


FIG. 10B

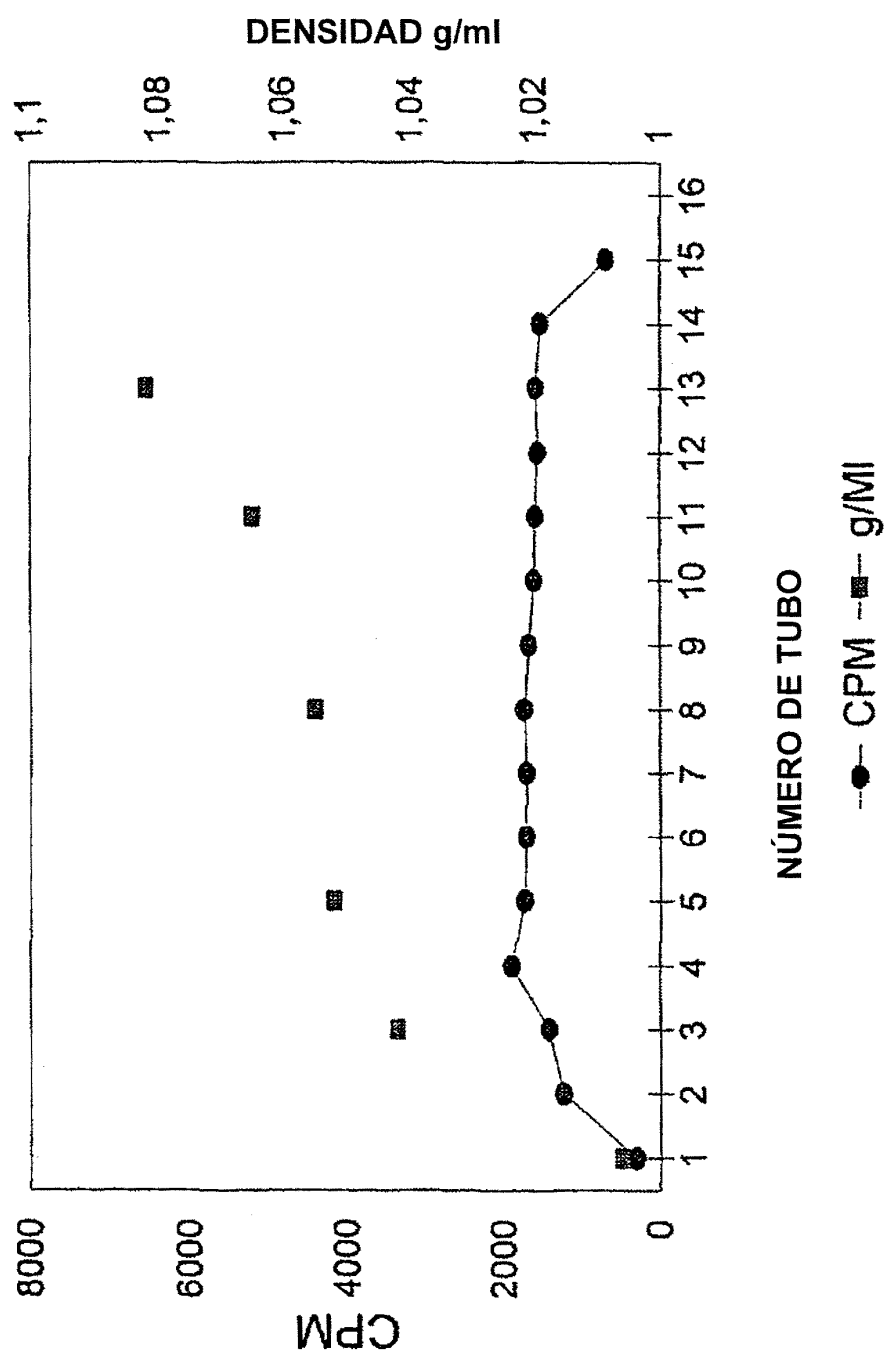


FIG. 10C

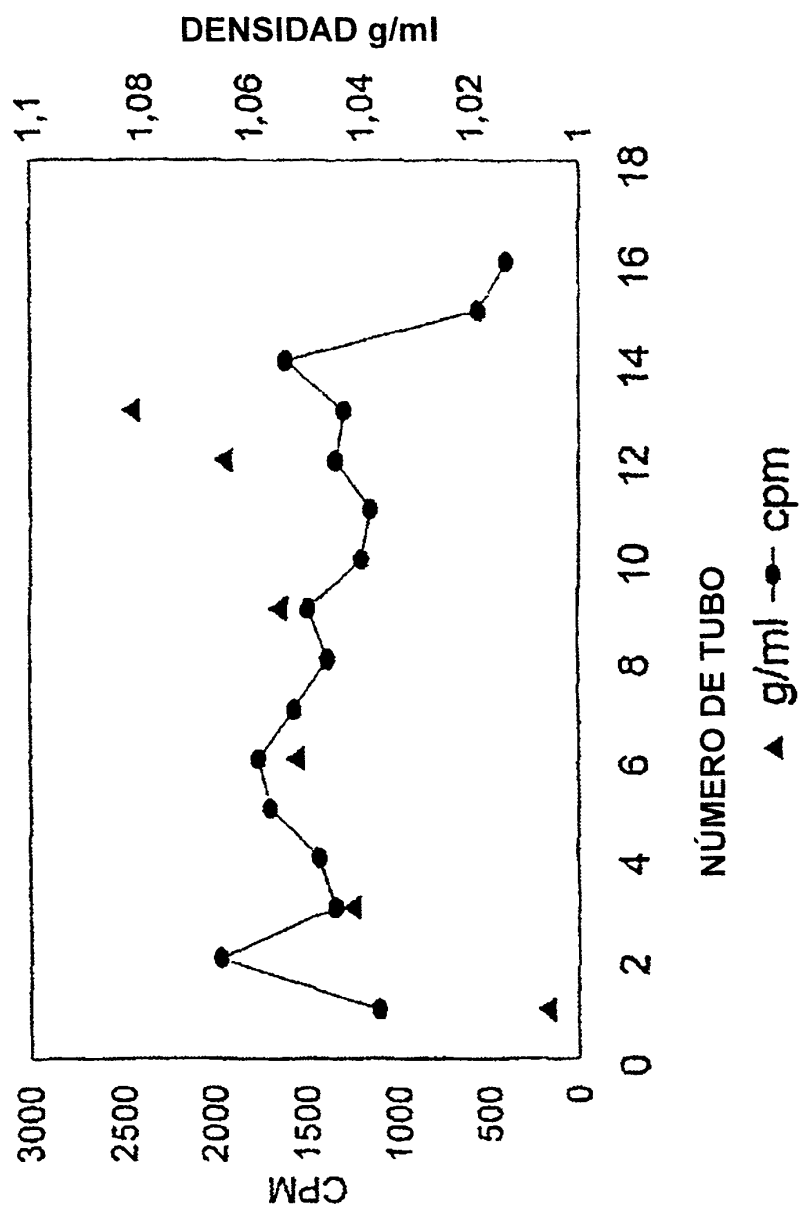


FIG. 11A

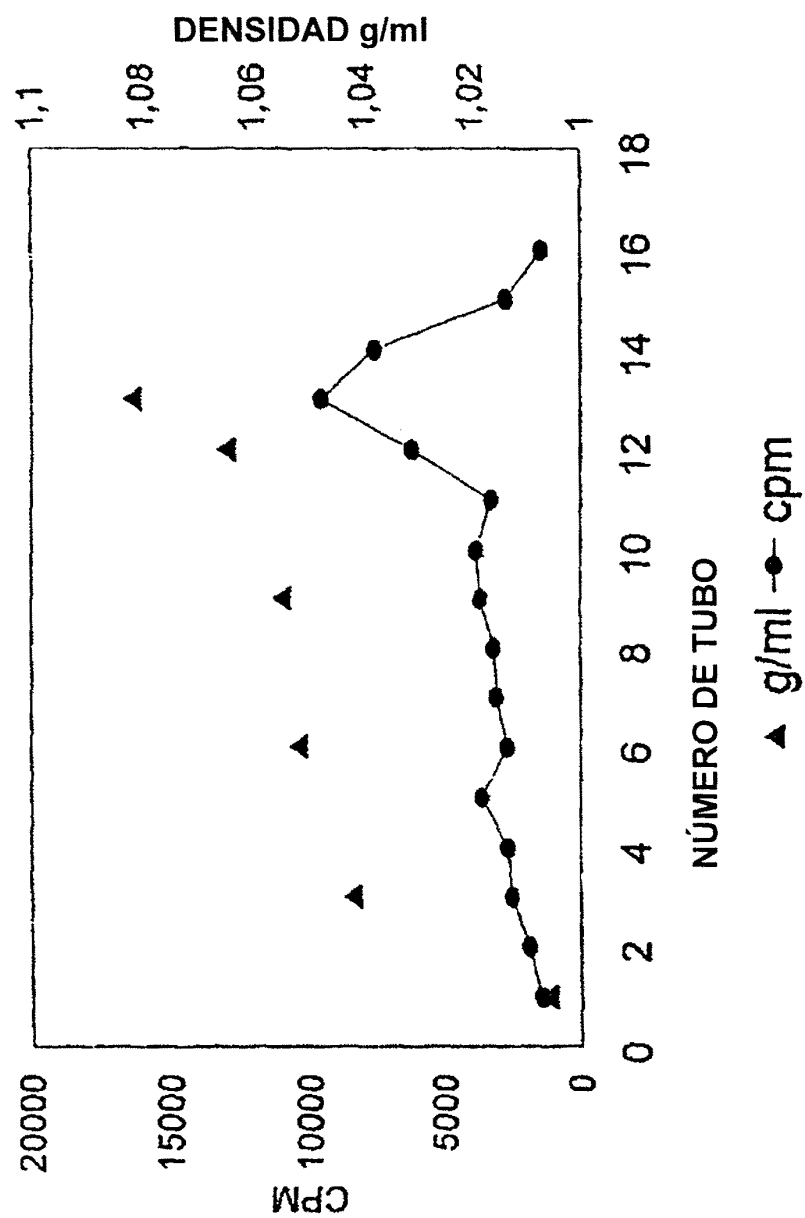


FIG. 11B

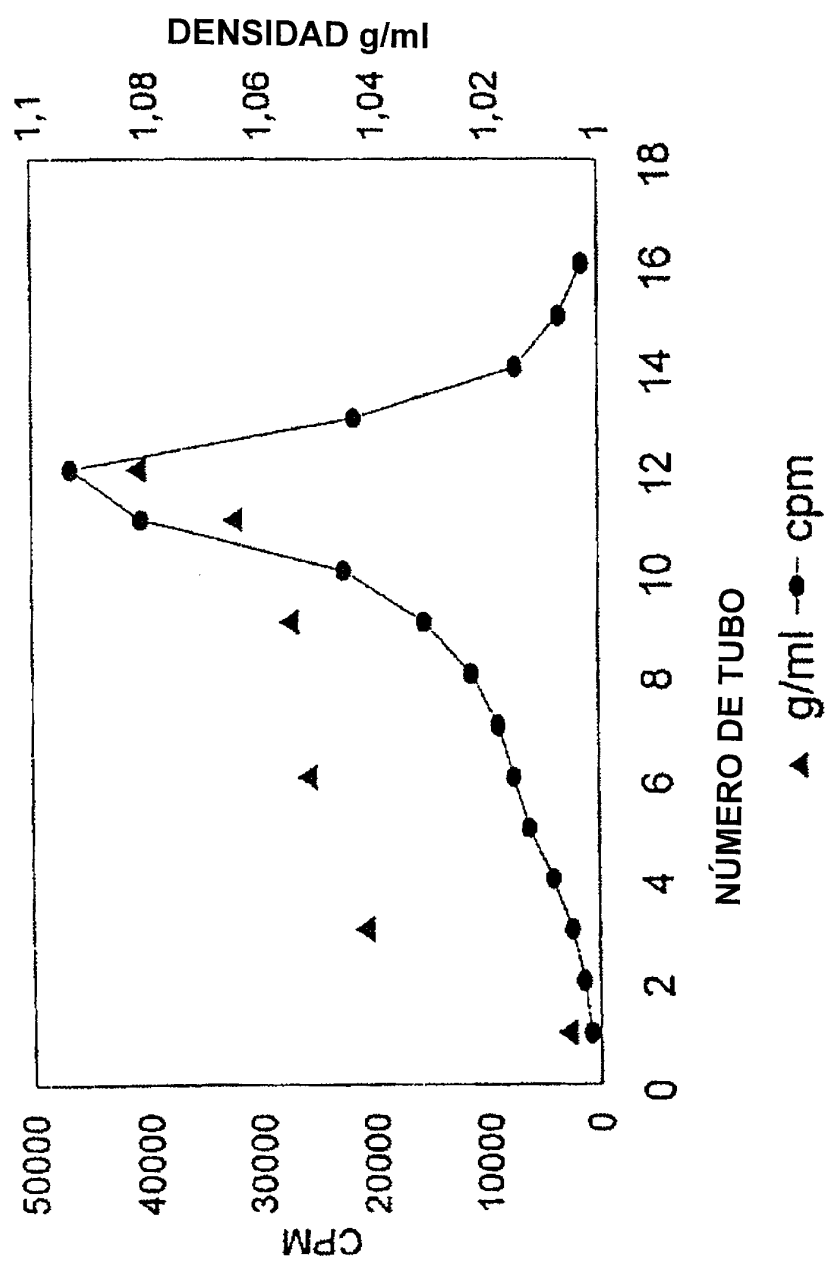


FIG. 11C

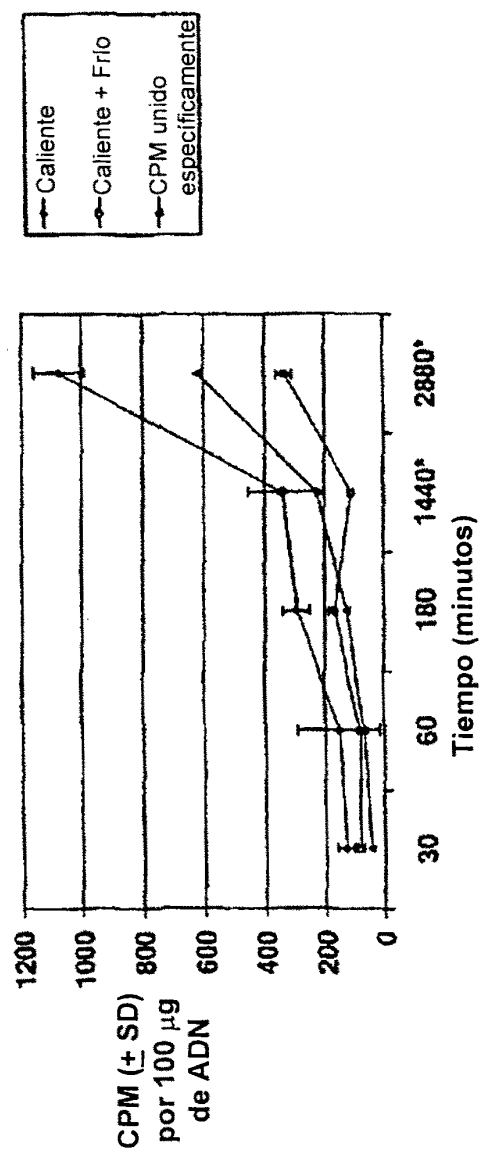


FIG. 12

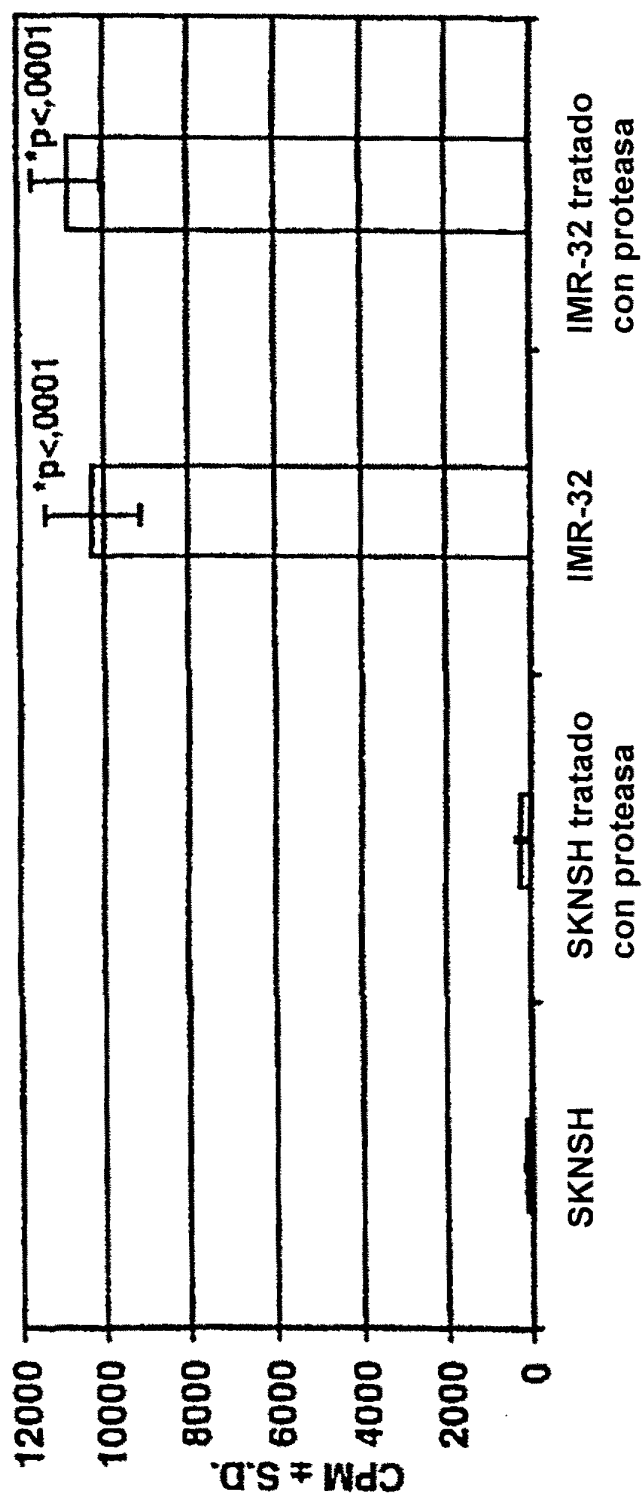


FIG. 13

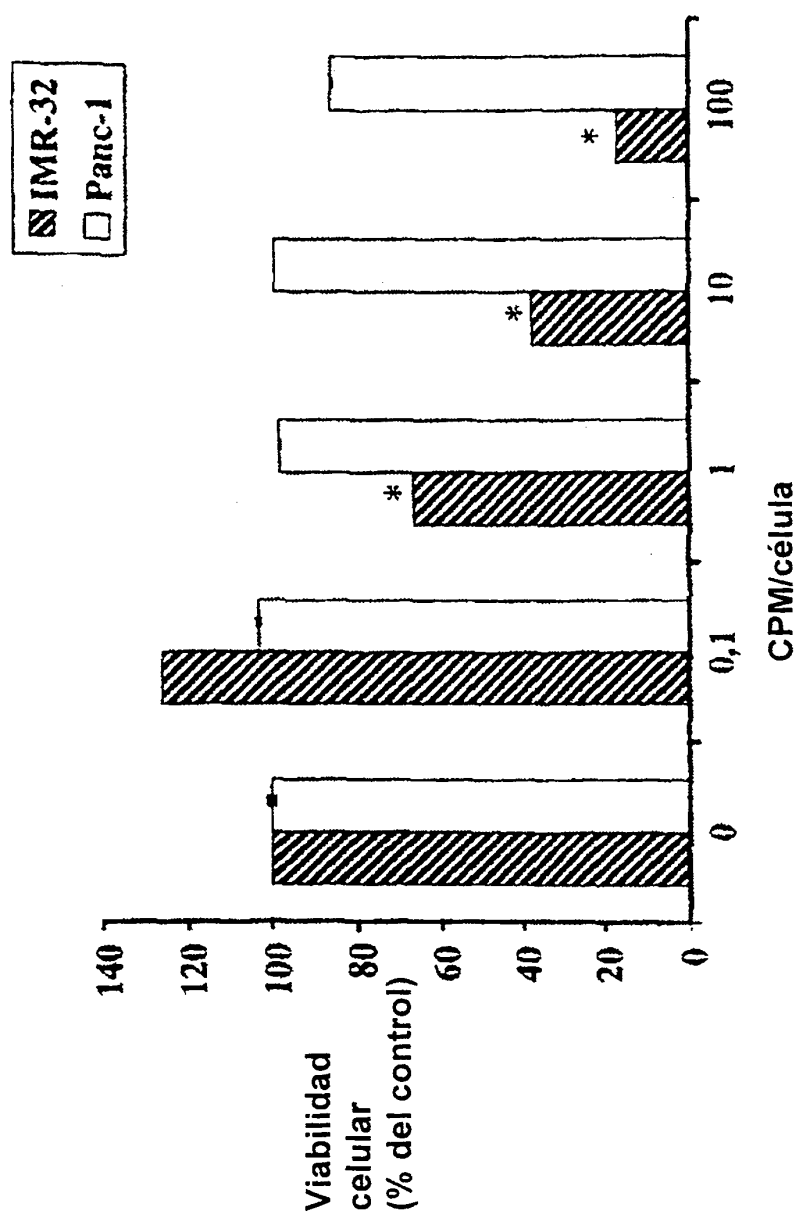


FIG. 14

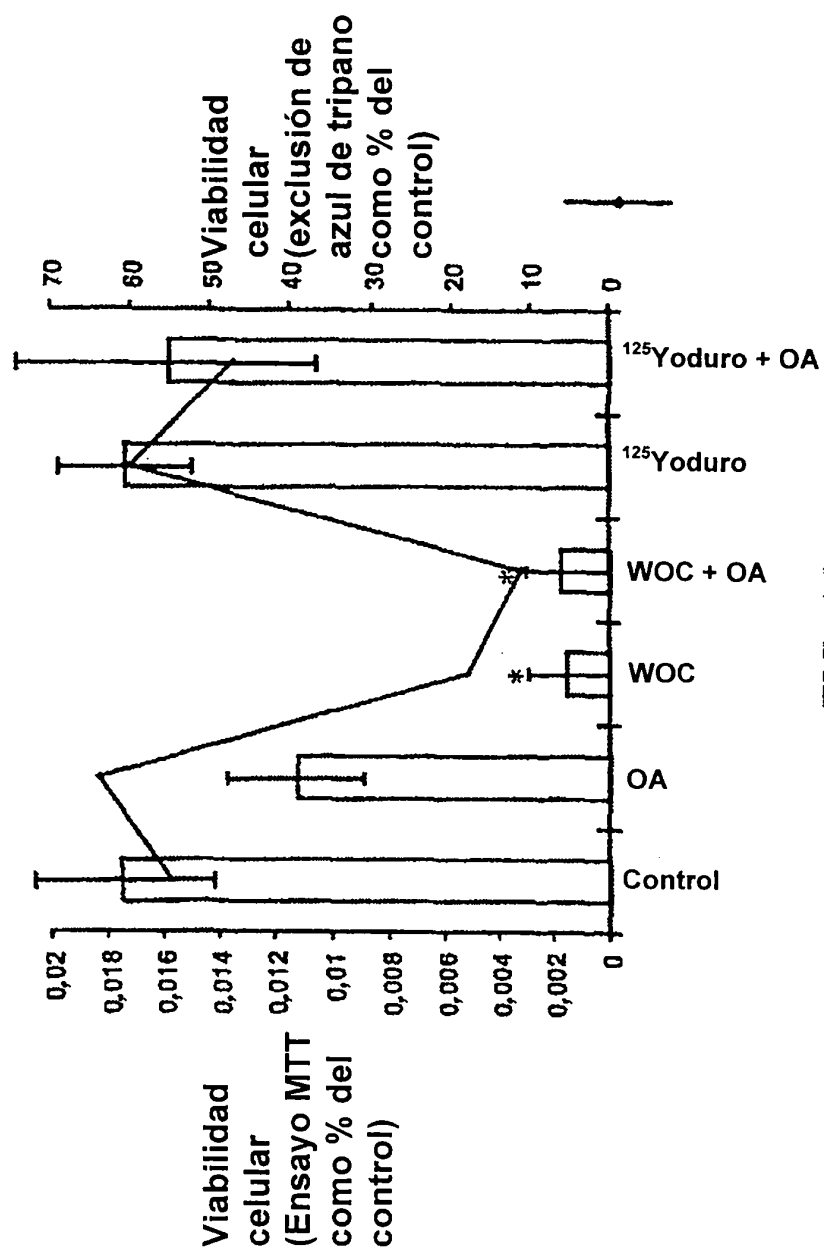


FIG. 15

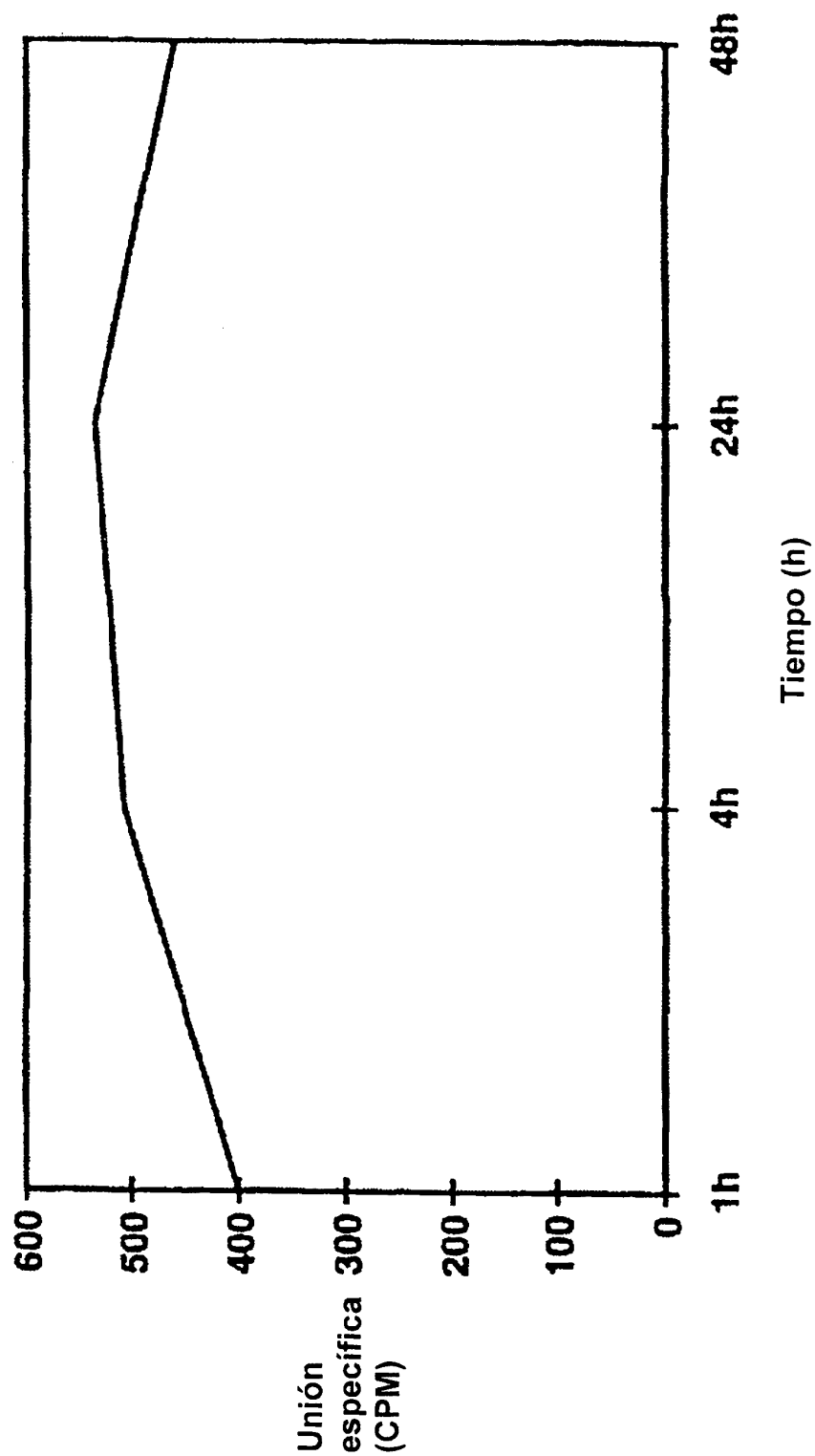


FIG. 16A

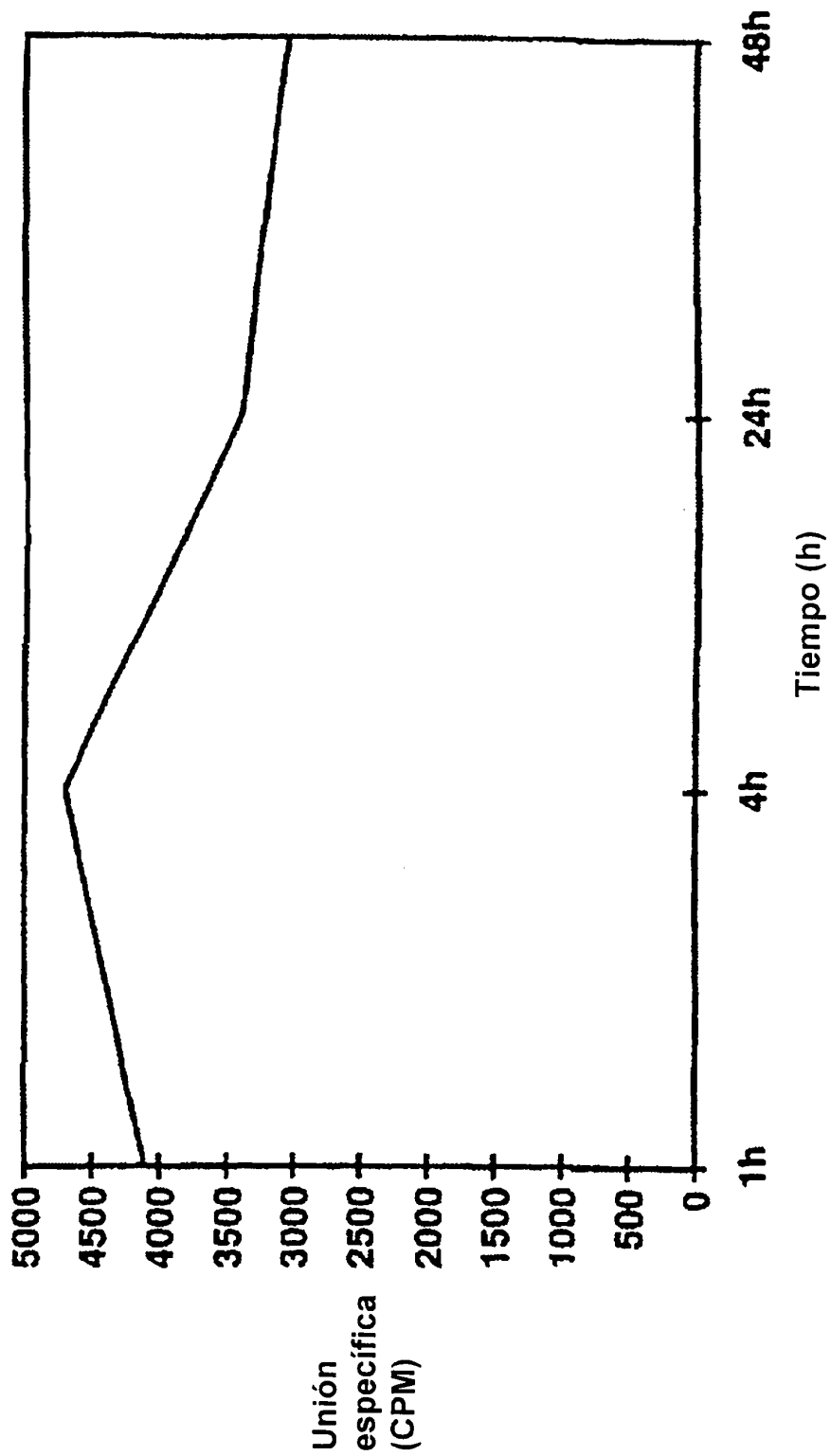


FIG. 16B

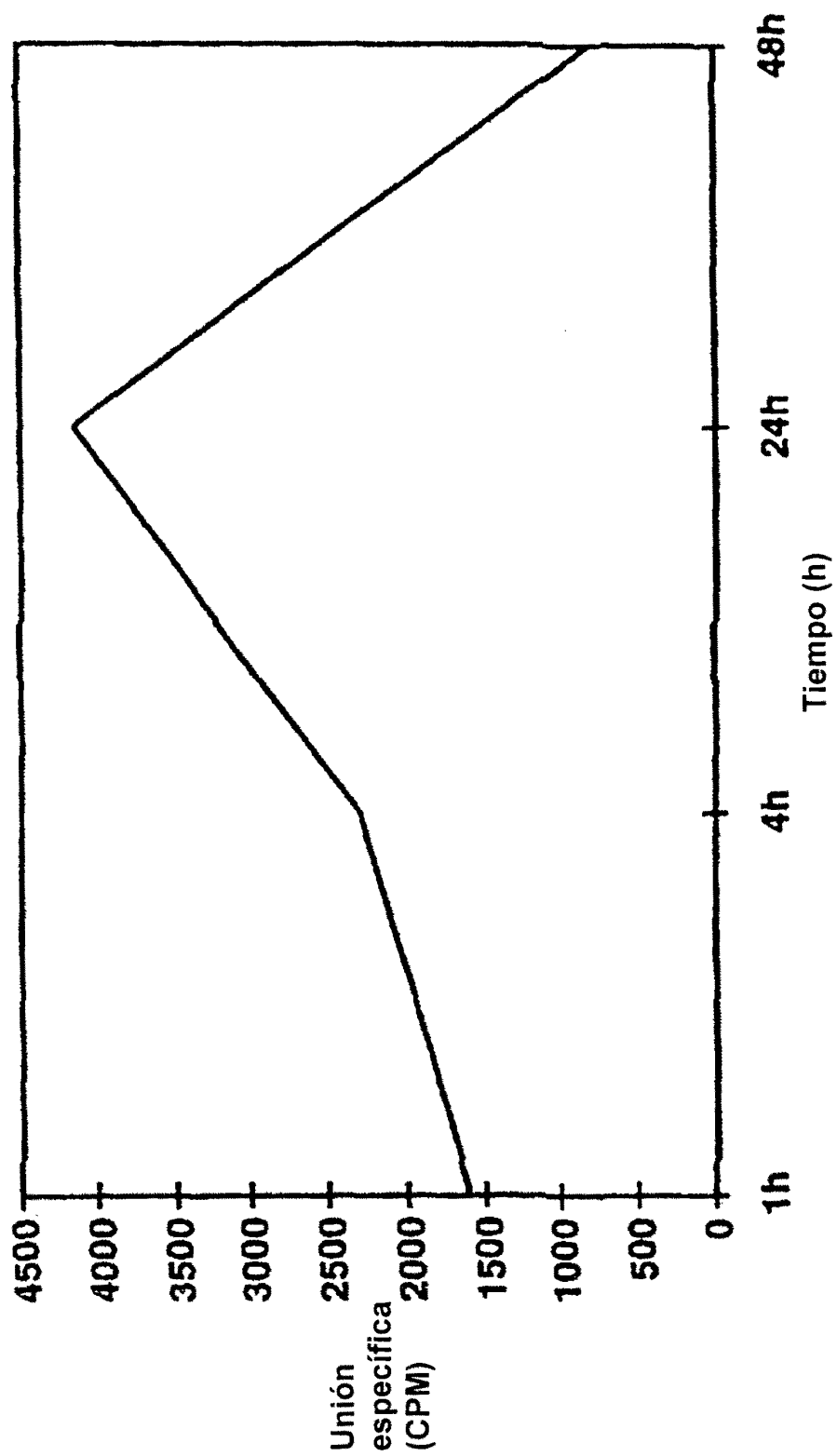


FIG. 16C

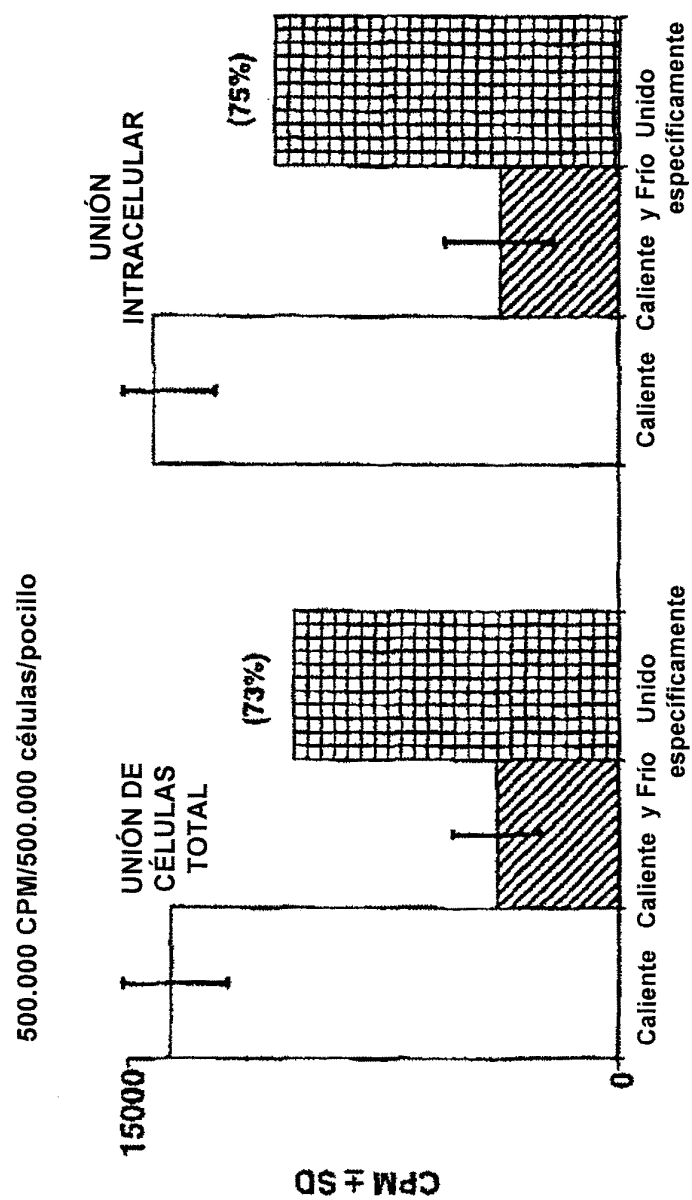


FIG. 17

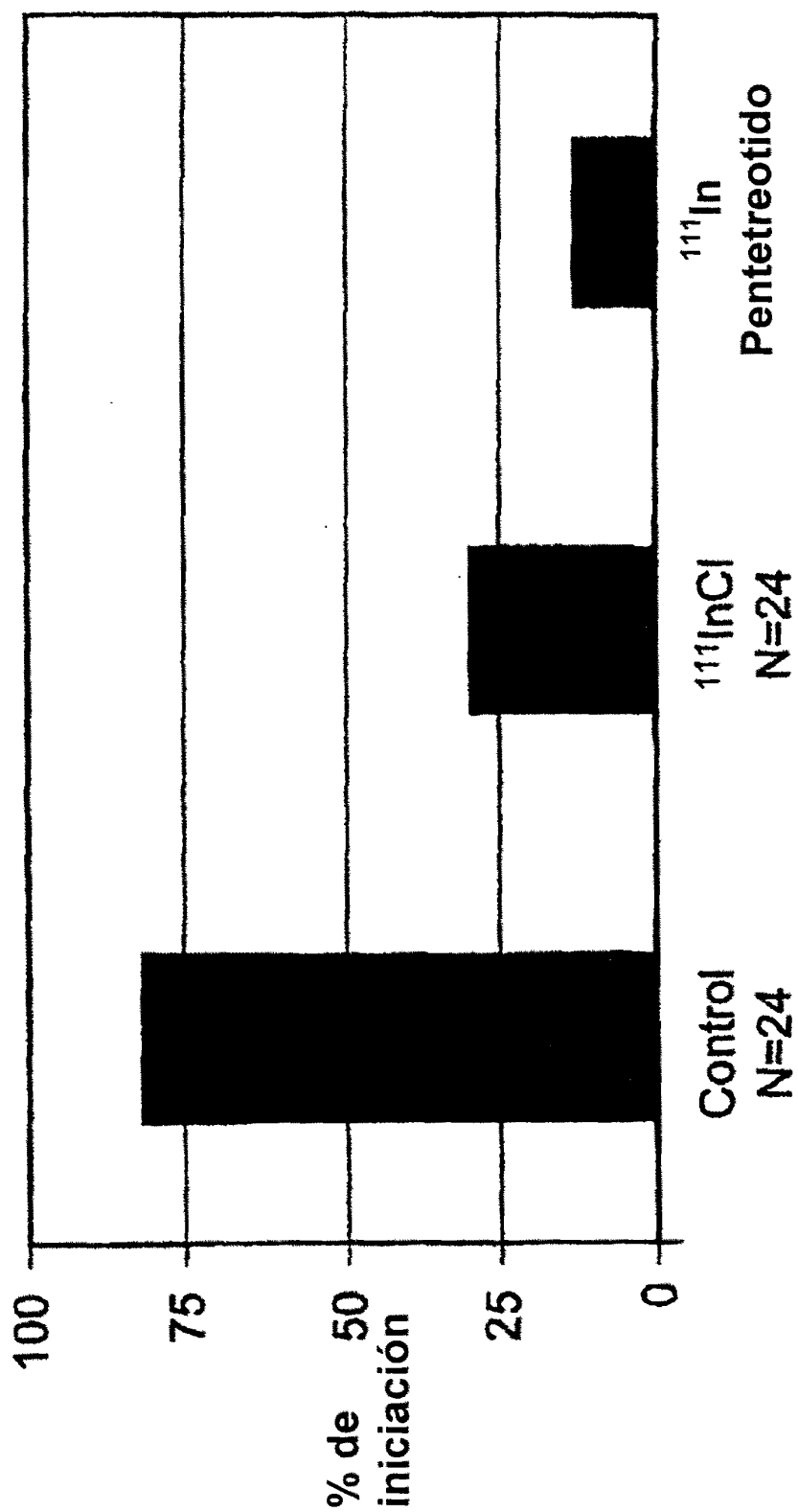


FIG. 18

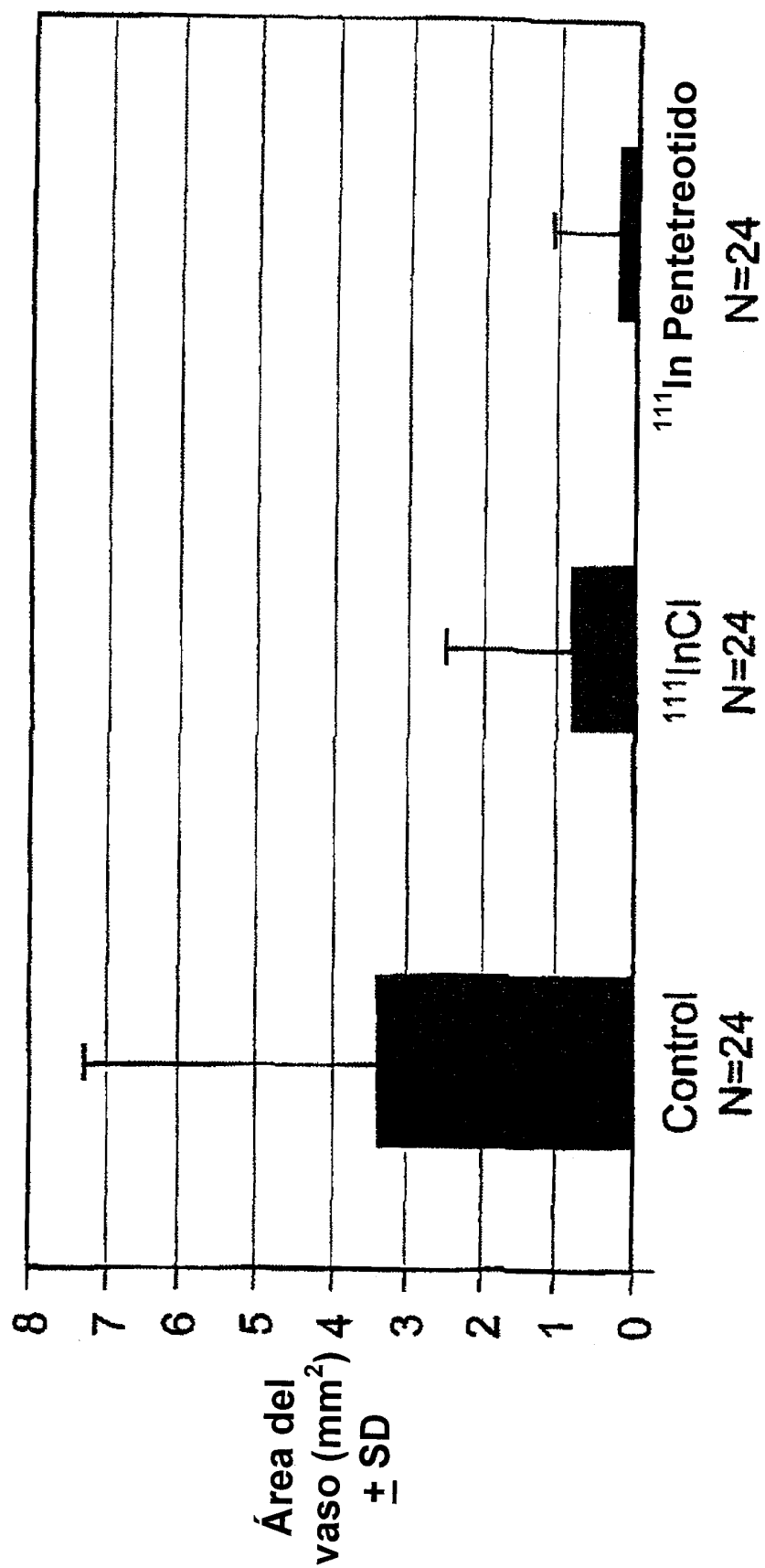


FIG. 19

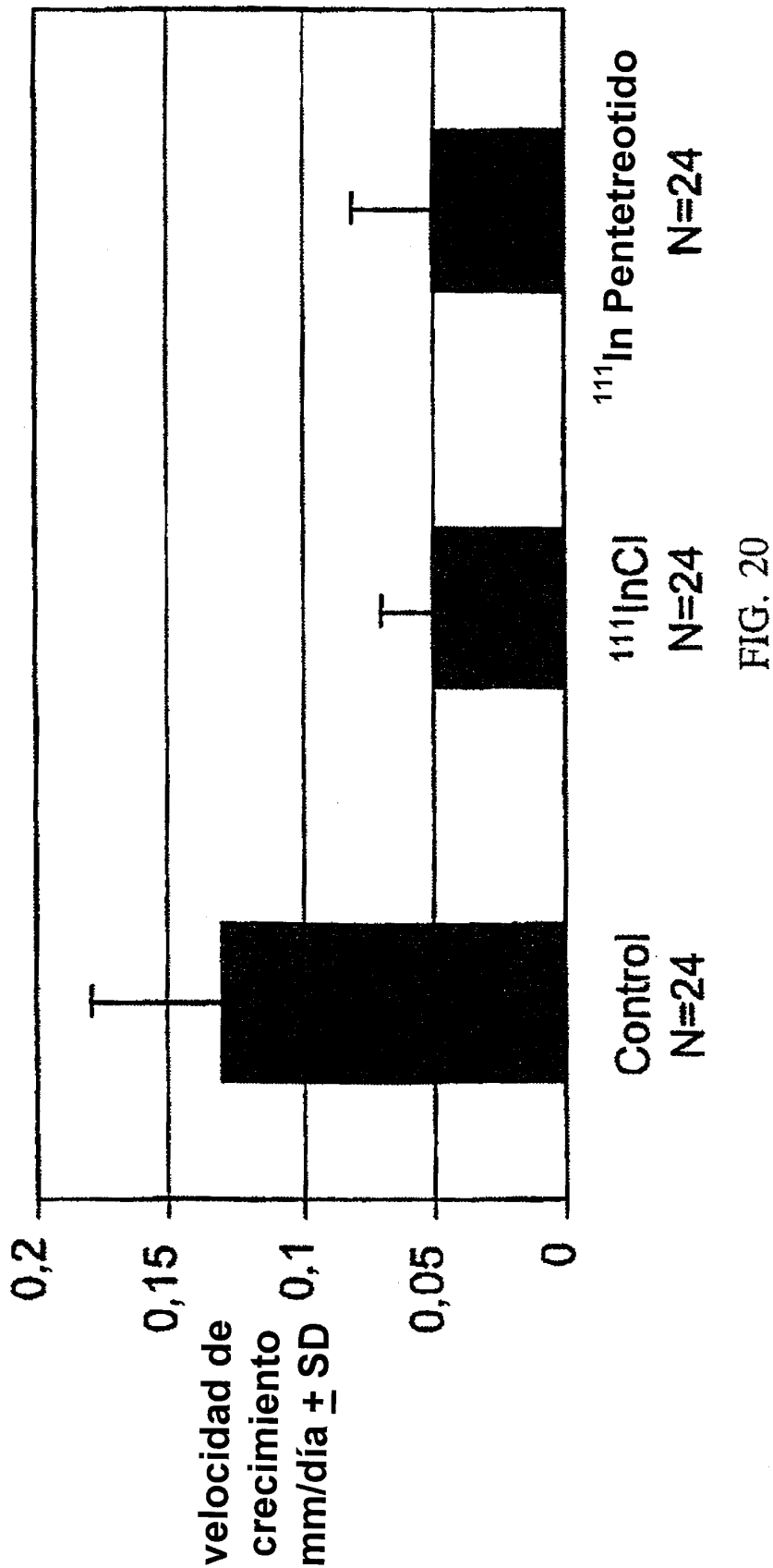


FIG. 20