

Organización y
Digitalización CSA Ltda



PCT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

10-1100036

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: CONJUGADOS ANTAGONISTAS PEPTIDICOS A LA BOMBESINA

SOLICITANTE: UNIVERSITÄSPITAL BASEL y UNIVERSITÄT BERN

DIRECCIÓN: Hebelstrasse 32, CH-4031 Basilea y Hochschulstrasse 4, CH-3012 Bern

APODERADO: J. IAN RAISBECK

BOGOTÁ 06 de Septiembre de 2010

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOU



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-110036- -00000-0000

Fecha: 2010-09-06 17:13:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 150

PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2010/000127

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: UNIVERSITÄSSPITAL BASEL y
UNIVERSITÄT BERN

Dirección: Hebelstrasse 32, CH-4031 Basilea y
Hochschulstrasse 4, CH-3012 Bern

Nacionalidad o Domicilio: Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: J. IAN RAISBECK

Dirección: Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá, D.C.

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.376.996 Btá
TP 135.799

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: 1) HELMUT MAECKE; 2) JEAN CLAUDE REUBI;
3) ROSALBA MANSI

Dirección: 1) Bergfriedweg 7, 79541 Alemania ; 2) Austrasse 4, Wabern
Suiza; 3) Langackerstrasse 2, CH-4142 Münchenstein Suiza

Nacionalidad o Domicilio: 1) Alemania; 2) Suiza 3) Italiana

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/001403

Fecha Febrero 27, 2009

Publicación Internacional No. WO 2009/109332

Fecha Septiembre 11, 2009

6

Título (54) CONJUGADOS ANTAGONISTAS PEPTÍDICOS ANÁLOGOS A LA
BOMBESINA

Clasificación Internacional (51) C07D 7/08, A61K 51/08

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

Marzo 7, 2008

(31) Número de Solicitud

08075180.3

9

Comprobante de pago No. 10-

Fecha Septiembre de 2010

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver expediente No.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA). (IPRP)

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

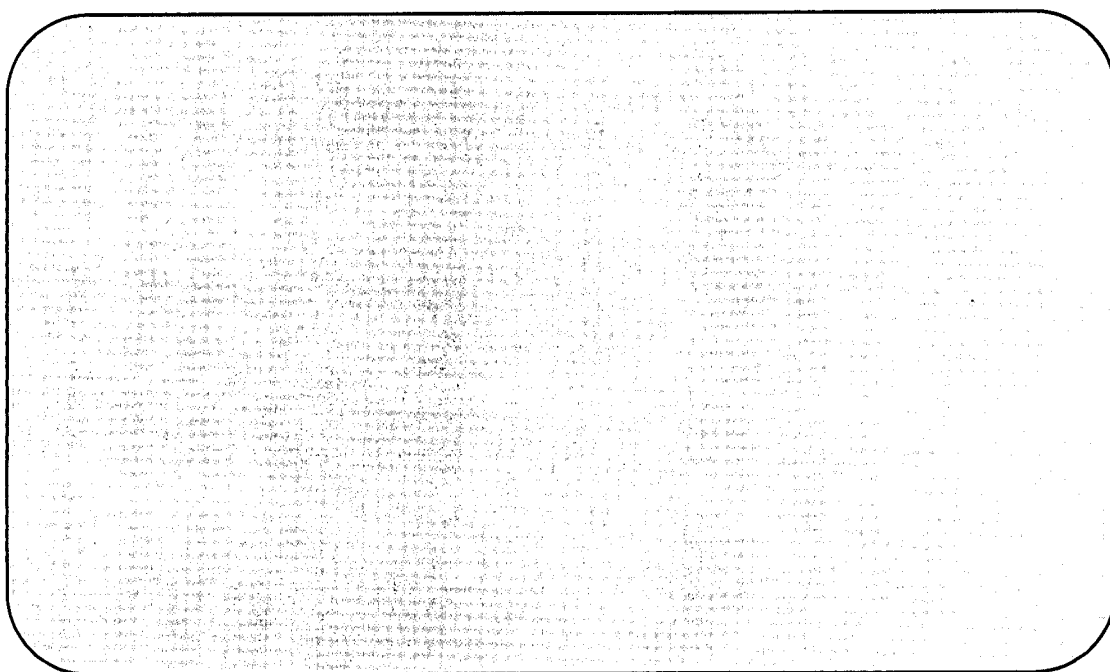
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. Formulario PCT/IB/306.

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

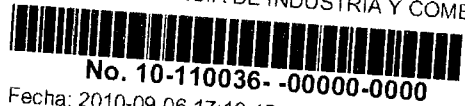
NOMBRE: J. IAN RAISBECK

FIRMA:

C.C. 79.376.996 Btá T.P. 135.799

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-110036- -00000-0000

Fecha: 2010-09-06 17:13:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 150

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 74,030
FECHA : SEPTIEMBRE 6 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISREK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	378391311	06/09/2010	3,879,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
	TOTAL :	\$ 554,000.00

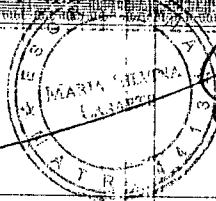
SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



ACTUACION NOTARIAL



N 012447903

1 **FOLIO 458.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CIENTO DOS.-**
2 **SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de**
3 **OLARTE, Carlos Reinaldo y otro del Poder otorgado por**
4 **UNIVERSITÄTSSPITAL BASEL.-**-----

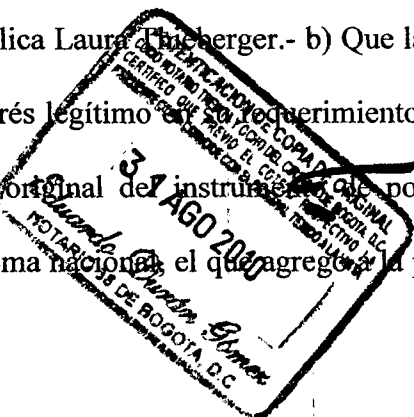
5 En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día
6 **VEINTINUEVE** de **JULIO** del año **DOS MIL DIEZ**, ante mí, María Silvina
7 Lasarte, Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial Número 1.788,
8 **COMPARECE: Dagmar MESSERER**, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968,
9 hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento
10 Nacional de Identidad Número 20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria
11 número 27-20383892-7, con domicilio especial en la Avenida Leandro N. Alem
12 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de
13 edad.- **INTERVIENE:** por su propio derecho **EXPRESA: PRIMERO:** Que la
14 Sociedad "**UNIVERSITÄTSSPITAL BASEL**", con domicilio en Hebelstrasse 32,
15 CH-4031, Basilea, Suiza, le confirió, con fecha 24 de Marzo de 2.009, en dicho país,
16 un **PODER**, el cual mediante escritura número 63, de fecha 2 de Junio de 2009,
17 otorgada ante mi, al folio 232, protocolo respectivo, de este Registro Notarial Número
18 1788, a mi cargo, fue incorporado y transcrito al mismo, cuya primera copia tengo
19 para este acto a la vista y en lo pertinente transcribiré en la presente.- **SEGUNDO:**
20 Manifiesta bajo juramento que el referido poder invocado se encuentra plenamente
21 vigente en virtud de no haber sido revocado, suspendido ni limitado en ninguna de sus
22 partes.- **TERCERO:** En consecuencia, **DICE:** Que en uso de la facultad conferida
23 **SUSTITUYE PARCIALMENTE** el poder mencionado a favor de **Carlos Reinaldo**
24 **OLARTE** y/o **James Ian RAISBECK**, al solo y único objeto de que en nombre y
25 representación de la Sociedad "**UNIVERSITÄTSSPITAL BASEL**", y actuando en





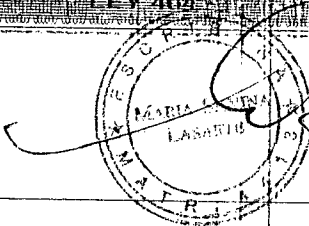
N 012447903

forma individual, indistinta y/o alternadamente, se presenten exclusivamente ante las
autoridades de COLOMBIA, que correspondan y realicen los actos enumerados en el
citado poder y con las facultades que surgen del mismo, el que transcripto en lo
pertinente dice: "FOLIO 232.- ...- ESCRITURA NÚMERO: SESENTA Y TRES.- ...-
En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, ..., el día DOS de JUNIO del año DOS
MIL NUEVE, ante mí, ..., Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial
Número 1.788, COMPARECE: Dagmar MESSERER, argentina, nacida el 28 de
mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del
Documento Nacional de Identidad Número 20.383.892, ..., domiciliada legalmente en
la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos Aires.- La
compareciente es mayor de edad.- INTERVIENE: por su propio derecho.- Y la
compareciente EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la
Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del
PODER que le fuera conferido en Basilea, Suiza, el día 24 de Marzo de 2.009, por la
Entidad "UNIVERSITÄTSSPITAL BASEL", con domicilio en Hebelstrasse 32, CH-
4031, Basilea, Suiza, sobre cuya plena vigencia responde la requirente bajo
juramento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de poder cuya
incorporación y transcripción a este protocolo solicita la compareciente, se encuentra
extendido en idioma castellano, certificada la firma por notario en idioma inglés,
legalizado en idioma inglés (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de
octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por la Traductora
Pública Laura M. Heberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo manifestado tiene
interés legítimo en el requerimiento.- En consecuencia, me hace entrega en este acto
del original del instrumento de poder relacionado con su respectiva traducción al
idioma nacional, el que agregado a la presente y transcripto dice: "MOELLER & CO ...





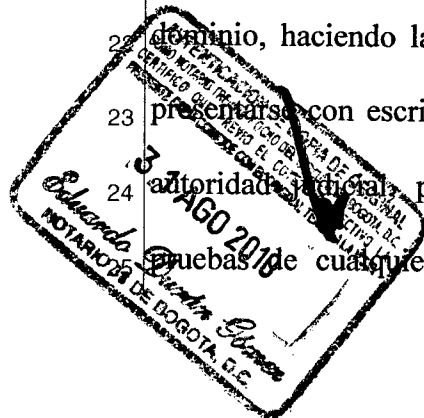
ACTUACIÓN NOTARIAL
LEY 402



[Handwritten signature]

N° 012447904

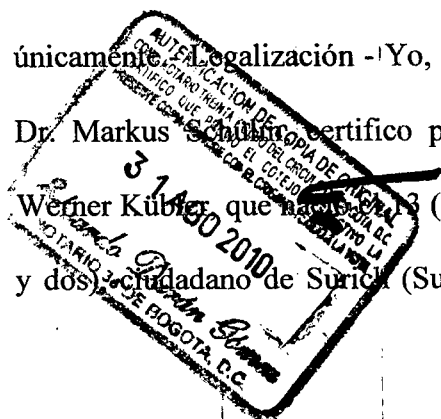
1 PODER Los abajo firmante/s Universitätsspital Basel domiciliados en Hebelstrasse
2 32, CH-4031 Basel, Suiza declaran por el presente otorgar a Dagmar MESSERER
3 poder general amplio y suficiente para recabar de las autoridades ..., sud y
4 centroamericanas ... que correspondan, la obtención de patentes de invención, el
5 registro y la renovación de marcas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual
6 y/o nombres de dominio, a cuyo efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas
7 autoridades todas las gestiones necesarias al objeto indicado, presentar solicitudes,
8 formular descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos,
9 oblar impuestos, justificar explotaciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias,
10 recibir documentos y valores, percibir y hacer cuanto fuere necesario ante las
11 autoridades administrativas de cualquier orden. Por otra parte, les confieren mandato
12 para que en su nombre y representación puedan iniciar y proseguir cualquier juicio
13 que actualmente los que suscriben tengan o en el futuro tuvieran ..., en Sudamérica,
14 Centroamérica ..., con motivo de su nombre, marcas de fábrica o de comercio,
15 patentes de invención y modelos y/o de sus derechos de propiedad intelectual que
16 actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover juicios de cualquier
17 jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales, contra los
18 falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos que
19 infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposición u
20 otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el nombre, las
21 marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o nombres de
22 dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán
23 presentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier
24 autoridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos, rendir
pruebas de cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver

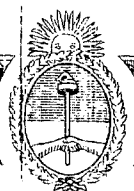
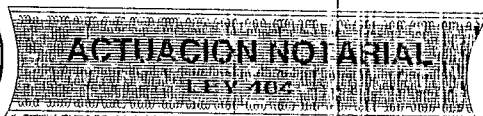




N 012447904

posiciones, asistir a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, 26
recusar, apelar, transar, someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar 27
cauciones, pedir embargos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, 28
pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de 29
sentencias, prestar juramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en 30
general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este 31
mandato. Podrán asimismo substituir el presente poder en todo o en parte. Dado y 32
firmado en Basel, (Sigue fecha en idioma inglés) - Sigue una firma ilegible - Hay un 33
sello que dice: "Universitätsspital Basel - Dr. Werner Kübler, MBA - Direktor - CH- 34
4031 Basel".- ES COPIA FIEL, doy fe.- En hoja adjunta consta: a) La certificación 35
notarial de la firma obrante en el poder, en idioma inglés, efectuada por el Escribano 36
de Basilea, Suiza, Markus Schülin; y b) La legalización de la firma y sello del 37
nombrado notario, en idioma inglés, firmada por la Funcionaria de la Cancillería de 38
Estado del Cantón de Basilea, Hanna Lauener (Sello de Apostilla de la Convención de 39
La Haya del 5 de octubre de 1961).- En hoja adjunta sigue la referida traducción al 40
idioma nacional la que transcriba textualmente, dice: "TRADUCCIÓN PÚBLICA (A 41
continuación de un PODER otorgado en idioma nacional, por el "Universitätsspital 42
Basel" (Hospital Universitario de Basilea), con sede en Basilea, Suiza, figuran los 43
siguientes textos, que traducidos dicen:) Basilea, 24 de marzo de 2009 - (Firma 44
ilegible y sello:) Hospital Universitario de Basilea - Dr. Werner Kübler, MBA - 45
Director - CH-4031 Basilea - La versión en inglés es para su información 46
únicamente. Legalización - Yo, el Escribano Público infrascripto de Basilea (Suiza), 47
Dr. Markus Schülin, certifico por el presente la autenticidad de la firma del Dr. 48
Werner Kübler, que nació el 13 (trece) de diciembre de 1962 (mil novecientos sesenta 49
y dos), Ciudadano de Suiza (Suiza) domiciliado en Vorderdorfstrasse 19, CH-8112 50





N 012447905

1 Otelfingen (Suiza), titular del Documento de Identidad Suizo N° c0184257, firma que
2 aparece en la página que antecede, habiendo sido trazada en mi presencia.- Basilea
3 (Suiza), 24 (veinticuatro) de marzo de 2009 (dos mil nueve) - (Sello en oblea aplicado
4 sobre precinto:) Dr. Markus Schülin; Escribano de Basilea - Leg. Prot. 36/2009 -
5 (Firmado y aclarado:) Dr. Markus Schülin, Escribano - APOSTILLA - (Convención
6 de La Haya del 5 de octubre de 1961) - País: Suiza - Este instrumento público fue
7 firmado por el Dr. en Jur. Markus Schülin actuando en carácter de Escribano Público
8 y lleva el sello del arriba mencionado.- Certificado en Basilea, el 25 de marzo de
9 2009, por la Cancillería de Estado del Cantón de Basilea - Ciudad con el N°
10 2158/3926 - Sello: CANCELLERÍA DE ESTADO DEL CANTÓN DE BASILEA
11 CIUDAD - - Firma (Firmado y aclarado:) Hanna Lauener - ES TRADUCCIÓN FIEL
12 de las partes pertinentes del documento de referencia que en los idiomas inglés y
13 alemán he tenido a la vista y he vertido al idioma nacional, en Buenos Aires, el 16 de
14 abril de 2009.- Hay una firma ilegible. Hay un sello que dice: "Laura Thieberger -
15 Matrícula de Traductores - Alemán - Francés - Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III -
16 98 - (La Plata) - Inglés - Tomo III: Folio 14 (Cap.) - Tomo III Folio 329 (La Plata) -
17 Colegio de Traductores Públicos N° 173".- ES COPIA FIEL, doy fe.- A continuación
18 hay un sello que dice: "COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS DE LA
19 CIUDAD DE BUENOS AIRES Corresponde a la Legalización N° T4-11613/09.
20 Sigue una firma ilegible: Matías Haikins ...- En el margen superior hay un sello
21 timbrador ...- En el margen inferior hay otro sello timbrador ...- A continuación sigue
22 la legalización de la firma de la nombrada traductora, ...- En este estado la
23 compareciente DICE: que en la forma expresada deja INCORPORADO y
24 TRANSCRITO en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de
mi, Escribano Autorizante, expida primera copia de la presente.- Constancias



100730 354343



30/07/2010

10:50:08

APOSTILLA

100730 100112

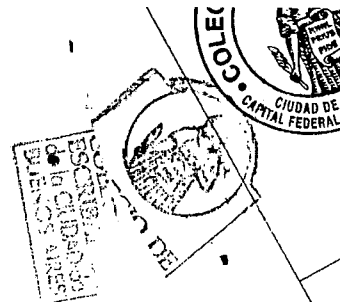


30/07/2010

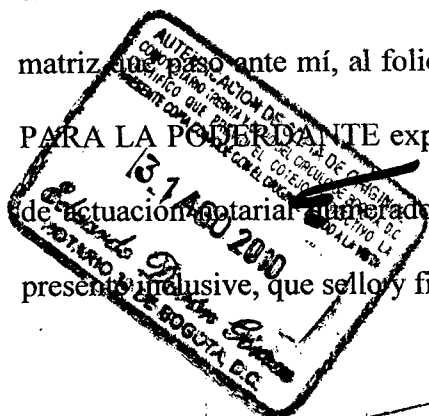
\$39.00

10:50:20

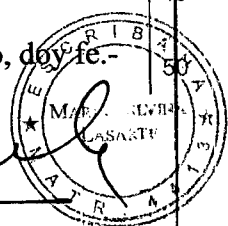
N 012447905

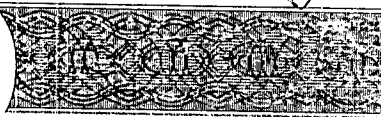


Notariales: Identidad de la compareciente ...: Se justifica la misma por conocimiento de la Autorizante.- ...- LEO esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad, la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARÍA SILVINA LASARTE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 232 del Registro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA APODERADA expido la presente PRIMERA COPIA en tres (3) sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el número N 010867962 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.- Sigue mi firma y mi sello notarial.”- **ES COPIA FIEL**, de las partes pertinentes de la escritura de referencia, doy fe.- **CUARTO:** Finalmente la compareciente expresa: a) Que el presente otorgamiento no significa por parte de su representada renunciar al ejercicio de las facultades sustituidas; b) Que los nombrados apoderados sustitutos no podrán sustituir el presente poder en ninguna de sus partes; c) Que el presente instrumento no se encuentra alcanzado por el Impuesto de Sellos, en virtud de no revestir el carácter de oneroso.- Constancias Notariales: Identidad de la Compareciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de la Autorizante.- Informo a la compareciente respecto de los alcances de las cláusulas contenidas en la presente escritura y del derecho de leer por sí este instrumento.- LEO esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARÍA SILVINA LASARTE. Escribana. Está mi sello. **CONCUERDA** con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 458 del Registro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA PODERANTE expido la presente **PRIMERA COPIA** en tres (3) sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el número N 012447903 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-



[Handwritten signature]





7

L 009595066

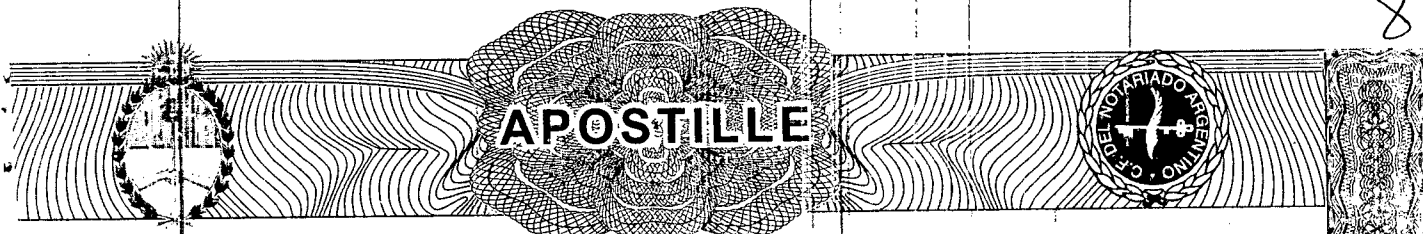
EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, **LEGALIZA** la firma y sello del escribano **MARIA SILVINA LASARTE** obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° **100730354343/8**. La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Viernes 30 de Julio de 2010

ESC. ALBERTO HORACIO HUEYO
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO





REPUBLICA ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00287299

1. PAIS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por ~~ALBERTO HORACIO HUEYO~~

3. Quien actúa en calidad de ~~CONSEJERO~~

4. Lleva el sello / timbre de ~~COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES~~

5. En ~~LA CIUDAD DE BUENOS AIRES~~

6. El día 30/07/2010

Por ~~EL~~ COLEGIO DE ESCRIBANOS ~~DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES~~

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

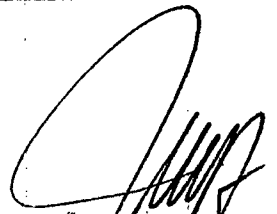
(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 100730100112

9. Sello / Timbre



10. Firma


Eduardo A. ESPAÑA SOLA
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO





ACTUACION NOTARIAL



N 012447900

1 **FOLIO 455.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CIENTO UNO.-**
2 **SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de**
3 **OLARTE, Carlos Reinaldo y otro del Poder otorgado por UNIVERSITÄT**
4 **BERN.-**-----

5 En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día
6 **VEINTINUEVE** de **JULIO** del año **DOS MIL DIEZ**, ante mí, María Silvina
7 Lasarte, Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial Número 1.788,
8 **COMPARECE: Dagmar MESSERER**, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968,
9 hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento
10 Nacional de Identidad Número 20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria
11 número 27-20383892-7, con domicilio especial en la Avenida Leandro N. Alem
12 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de
13 edad.- **INTERVIENE:** por su propio derecho **EXPRESA: PRIMERO:** Que la
14 Sociedad **"UNIVERSITÄT BERN"**, con domicilio en Hochschulstrasse 4, CH-3012,
15 Berna, Suiza, le confirió, con fecha 16 de Marzo de 2.009, en dicho país, un PODER,
16 el cual mediante escritura número 62, de fecha 2 de Junio de 2.009, otorgada ante mí,
17 al folio 229, protocolo respectivo, de este Registro Notarial Número 1788, a mi cargo,
18 fue incorporado y transcrito al mismo, cuya primera copia tengo para este acto a la
19 vista y en lo pertinente transcribiré en la presente.- **SEGUNDO:** Manifiesta bajo
20 juramento que el referido poder invocado se encuentra plenamente vigente en virtud
de no haber sido revocado, suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.-

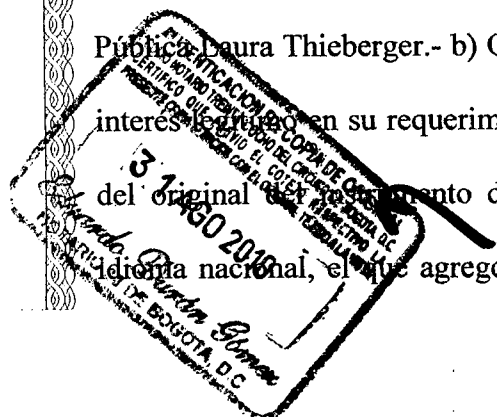
21 **TERCERO:** En consecuencia, **DICE:** Que en uso de la facultad conferida
22 **SUSTITUYE PARCIALMENTE** el poder mencionado a favor de **Carlos Reinaldo**
23 **OLARTE** y **James Ian RAISBECK**, al solo y único objeto de que en nombre y
24 representación de la Sociedad **"UNIVERSITÄT BERN"**, y actuando en forma





N 012447900

individual, indistinta y/o alternadamente, se presenten exclusivamente ante las
autoridades de COLOMBIA, que correspondan y realicen los actos enumerados en el
citado poder y con las facultades que surgen del mismo, el que transcripto en lo
pertinente dice: "FOLIO 229.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO:
SESENTA Y DOS.- ...- En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, ..., el día DOS de
JUNIO del año DOS MIL NUEVE, ante mí, ..., Escribana Autorizante, titular del
Registro Notarial Número 1.788, COMPARECE: Dagmar MESSERER, argentina,
nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli,
soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número 20.383.892, ...,
domiciliada legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta
Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIENE: por
su propio derecho.- Y la compareciente EXPRESA: Que a los efectos que hubiere
lugar, solicita de mí, la Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en
este protocolo del PODER que le fuera conferido en Berna, Suiza, el día 16 de Marzo
de 2.009, por la Entidad "UNIVERSITÄT BERN", con domicilio en Hochschulstrasse
4, CH-3012, Berna, Suiza, sobre cuya plena vigencia responde la requirente bajo
juramento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de poder cuya
incorporación y transcripción a este protocolo solicita la compareciente, se encuentra
extendido en idioma castellano, certificada la firma por notaria en idioma inglés,
legalizado en idioma castellano (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5
de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por la Traductora
Pública Daura Thieberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo manifestado tiene
interés legítimo en su requerimiento.- En consecuencia, me hace entrega en este acto
del original del instrumento de poder relacionado con su respectiva traducción al
idioma nacional, el que agregó a la presente y transcripto dice: "MOELLER & CO





ACTUACIÓN NOTARIAL

15 Y 404



N 012447901

(Sigue aclaración en idioma inglés) PODER Los abajo firmantes Universität Bern domiciliados en Hochschulstrasse 4, CH-3012 Bern, Suiza declaran por el presente otorgar a Dagmar MESSERER poder general amplio y suficiente para recabar de las autoridades ..., sud y centroamericanas ... que correspondan, la obtención de patentes de invención, el registro y la renovación de marcas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a cuyo efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas autoridades todas las gestiones necesarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explotaciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, percibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier orden. Por otra parte, les confieren mandato para que en su nombre y representación puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o en el futuro tuvieran ..., en Sudamérica, Centroamérica ..., con motivo de su nombre, marcas de fábrica o de comercio, patentes de invención y modelos y/o de sus derechos de propiedad intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover juicios de cualquier jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales, contra los falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposición u otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el nombre, las marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán presentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier autoridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos, rendir pruebas de cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver





N 012447901

posiciones, asistir a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, 26
recusar, apelar, transar, someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar 27
cauciones, pedir embargos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, 28
pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de 29
sentencias, prestar juramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en 30
general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este 31
mandato. Podrán asimismo substituir el presente poder en todo o en parte. Dado y 32
firmado en - 2009/03/16 - Sigue una firma ilegible (Aclarado:) Dr. Daniel Odermatt - 33
(Sigue texto en idioma inglés).- ES COPIA FIEL, doy fe.- Al dorso consta: a) La 34
certificación notarial de la firma obrante en el poder, en idioma inglés, efectuada por 35
la Escribana de Berna, Suiza, Katharina Anderegg; y b) La legalización de la firma y 36
sello de la nombrada notaria, en idioma castellano, firmada por la Funcionaria de la 37
Cancillería de Estado del Cantón de Berna, Suiza, Ursula Liechti (Sello de Apostilla 38
de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961), doy fe.- En hojas adjuntas 39
sigue la referida traducción al idioma nacional la que transcriba textualmente, dice: 40
"TRADUCCIÓN PÚBLICA (A continuación de un PODER otorgado en idioma 41
nacional, por la "Universität Bern" (Universidad de Berna), con sede en Berna, Suiza, 42
figuran los siguientes textos, que traducidos dicen:) (Firmado y aclarado:) Dr. Daniel 43
Odermatt - Director de la Administración, 16-03-2009.- La versión en inglés es para 44
su información únicamente.- Legalización - Yo, la infrascripta, Katharina Anderegg, 45
Escribana Pública del Cantón de Berna (Suiza), inscrita en el Registro Notarial del 46
Cantón de Berna, con oficina en Berna, Seftigenstrasse 2, certifico por el presente la 47
autenticidad de la firma antepuesta "Odermatt" del Dr. Daniel Odermatt, que nació el 48
13 de febrero de 1963, ciudadano de Dallenwil, que reside en Stettlen, 49
Bergackerstrasse 236, Director Gerente de la Universidad de Berna, competente para 50

13 de febrero de 1963, ciudadano de Dallenwil, que reside en Stettlen, 49
Bergackerstrasse 236, Director Gerente de la Universidad de Berna, competente para 50

13 de febrero de 1963, ciudadano de Dallenwil, que reside en Stettlen, 49
Bergackerstrasse 236, Director Gerente de la Universidad de Berna, competente para 50

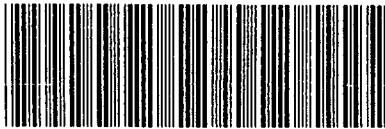


N 012447902

1 proceder y de mi personal conocimiento.- En fe de lo cual firmo y estampo el sello
2 oficial, el dieciséis de marzo de dos mil nueve.- 16 de marzo de 2009 - N° 4813 -
3 (Hay una firma ilegible y un sello:) KATHARINA ANDEREGG - ESCRIBANA
4 DEL CANTÓN DE BERNA (Sello:) APOSTILLA - (Convención de La Haya del 5
5 de octubre de 1961) - País: Confederación Suiza, Cantón de Berna - Este instrumento
6 público fue firmado por Katharina Anderegg actuando en carácter de Escribana y
7 lleva el sello de la Escribana del Cantón de Berna.- Certificado en Berna, el
8 16/03/2009 por Ursula Liechtl, Funcionaria de la Cancillería de Estado del Cantón de
9 Berna con el N° 1003 - Sello: CANTÓN DE BERNA - CANCELLERÍA DE
10 ESTADO- (Hay una firma ilegible y una liquidación de derechos) - ES
11 TRADUCCIÓN FIEL de las partes pertinentes del documento de referencia que en los
12 idiomas inglés y alemán he tenido a la vista y he vertido al idioma nacional, en
13 Buenos Aires, el 17 de abril de 2009.- Hay una firma ilegible. Hay un sello que dice:
14 "Laura Thieberger - Matrícula de Traductores - Alemán - Francés - Tomo II Folio
15 254 (Cap.) Tomo III - 98 - (La Plata) - Inglés - Tomo III: Folio 14 (Cap.) - Tomo III
16 Folio 329 (La Plata) - Colegio de Traductores Públicos N° 173".- ES COPIA FIEL,
17 doy fe.- A continuación hay un sello que dice: "COLEGIO DE TRADUCTORES
18 PÚBLICOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Corresponde a la Legalización
19 N° T4-11612/09. Sigue una firma ilegible: Matías Haikins...- En el margen superior
20 hay un sello timbrador ...- En el margen inferior hay otro sello timbrador ...- A
21 continuación sigue la legalización de la firma de la nombrada traductora, ...- En este
22 estado la compareciente DICE: que en la forma expresada deja INCORPORADO y
23 PLAN ENCRIPTO en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de
24 la Escribana Autorizante, expida primera copia de la presente.- Constancias
Notariales: Identidad de la compareciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se



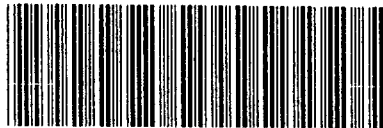
100730 354344



30/07/2010

10:50:08

100730 100113



30/07/2010

\$39.00

10:50:20

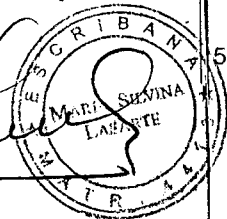


N 012447902

justifica la misma por conocimiento de la Autorizante.- ...- LEO esta escritura a la
compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad, la firma ante mí, doy
fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARÍA SILVINA LASARTE. Escribana. Está
mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 229 del
Registro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA APODERADA expido la
presente PRIMERA COPIA en tres (3) sellos de actuación notarial números N
010791469, N 010791470 y el presente número N 010867961, que sello y firmo en la
fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.- Sigue mi firma y mi sello notarial.”.- ES
COPIA FIEL, de las partes pertinentes de la escritura de referencia, doy fe.-
CUARTO: Finalmente la compareciente expresa: a) Que el presente otorgamiento no
significa por parte de su representada renunciar al ejercicio de las facultades
sustituidas; b) Que los nombrados apoderados sustitutos no podrán sustituir el
presente poder en ninguna de sus partes; y c) Que el presente instrumento no se
encuentra alcanzado por el Impuesto de Sellos, en virtud de no revestir el carácter de
oneroso.- Constancias Notariales: Identidad de la Compareciente (Artículo 1.002
del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de la Autorizante.- Informo
a la compareciente respecto de los alcances de las cláusulas contenidas en la presente
escritura y del derecho de leer por sí este instrumento.- LEO esta escritura a la
compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad la firma ante mí, doy
fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARÍA SILVINA LASARTE. Escribana. Está
mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 455 del
Registro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA PODERDANTE expido la
presente PRIMERA COPIA en tres (3) sellos de actuación notarial numerados
correlativamente desde el número N 012447900 al presente inclusive, que sello y
firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-



[Handwritten signature]





L 009595065

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, **LEGALIZA** la firma y sello del escribano **MARIA SILVINA LASARTE** obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° **100730354344/8**. La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, Viernes 30 de Julio de 2010



[Signature]
ESC. ALBERTO HORACIO HUEYO
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO

CONSEJERO

AUTENTICACION DE COPIA DEL ORIGINAL
COMPROBADO POR MI Y POR EL COLEGIO DE ESCRIBANOS D.C.
CERTIFICO QUE PREVIÓ EL COLEGIO RESPECTIVO LA
FIDELIDAD DE LA COPIA CON EL ORIGINAL TENIENDO LA MIRA
3.1 AGO 2010
Edgardo Durán Gómez
NOTARIO 38 DE BOGOTÁ, D.C.

13



REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00287300

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por ALBERTO HORACIO HUEYO

3. Quien actúa en calidad de CONSEJERO

4. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS
AIRES

5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 30/07/2010

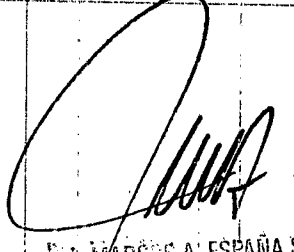
7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO
(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 100730100113

9. Sello / Timbre

10. Firma




ESD. MARCOS A. ESPAÑA SOLA
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 September 2009 (11.09.2009)

(10) International Publication Number
WO 2009/109332 A1

- (51) International Patent Classification:
C07K 7/08 (2006.01) A61K 51/08 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2009/001403
- (22) International Filing Date:
27 February 2009 (27.02.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
08075180.3 7 March 2008 (07.03.2008) EP
- (71) Applicants (for all designated States except US): **UNIVERSITÄTSSPITAL BERN** [CH/CH]; Hebelstrasse 32, CH-4031 Basel (CH). **UNIVERSITÄT BERN** [CH/CH]; Hochschulstrasse 4, CH-3012 Bern (CH).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **MAECKE, Helmut** [DE/DE]; Bergfriedweg 7, 79541 Lörrach (DE). **REUBI, Jean Claude** [CH/CH]; Ausstrasse 4, CH-3084 Wabern (CH). **MANSI, Rosalba** [CH/CH]; Langackerstrasse 2, CH-4142 Münchenstein (CH).
- (74) Agent: **BURKERT, Frank**; c/o Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft, Müllerstr. 178, 13353 Berlin (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))



WO 2009/109332 A1

(54) Title: BOMBESIN ANALOG PEPTIDE ANTAGONIST CONJUGATES

(57) Abstract: To provide a diagnostic and therapeutic medicament, a bombesin analog peptide antagonist conjugate is provided which has general Formula (I): $[A-(B)_n]_x-C$, wherein A is a metal chelator comprising at least one radionuclide metal, B is a spacer linked to N-terminal of C or a covalent bond and C is a bombesin analog peptide antagonist having a sequence as claimed, where further x is an integer from 1 to 3 and n is an integer from 1 to 6.

Bombesin Analog Peptide Antagonist Conjugates

INTRODUCTION

The invention relates to therapeutic or diagnostic/imaging radiopharmaceuticals, the
5 preparation and use thereof wherein the therapeutic or diagnostic radiopharmaceuticals are
defined as binding moieties having an affinity for and are capable of binding to bombesin
receptors and more particularly to gastrin releasing peptide (GRP) receptor. The binding
moieties are labeled to metal complexing group for alpha-, beta-, gamma- and positron
emitting isotopes. The use includes treating a subject having a neoplastic disease comprising
10 the step of administering to the subject an effective amount of a therapeutic
radiopharmaceutical having a metal chelated with a chelating group attached to a moiety
capable of binding to bombesin receptors and more particularly to gastrin releasing peptide
(GRP) receptor over-expressed on tumor cells. The use includes diagnosing or imaging a
subject having a neoplastic disease using a diagnostic/imaging radiopharmaceutical having a
15 metal chelated with a chelating group attached to a moiety capable of binding to bombesin
receptors and more particularly to gastrin releasing peptide (GRP) receptor over-expressed on
tumor cells. The method consists of forming a therapeutic or diagnostic compound from a
precursor compound consisting of a metal chelating group covalently linked with a moiety
capable of binding bombesin receptors and more particularly to gastrin releasing peptide
20 (GRP) receptor.

BACKGROUND

In designing an effective radiopharmaceutical tracer for use as a diagnostic agent, it is
imperative that the drugs have appropriate *in vivo* targeting and pharmacokinetic properties.
25 Fritzberg *et al.* (1992, J. Nucl. Med., 33:394) state further that radionuclide chemistry and
associated linkages underscore the need to optimize the attachment and labeling chemical
modifications of the biomolecule carrier. Hence the type of radionuclide, the type of
biomolecule and the method used for linking them to one another may have a crucial effect
onto the radiotracer properties.

30

15

Peptides are biomolecules that play a crucial role in many physiological processes including actions as neurotransmitters, hormones, and antibiotics. Research has shown their importance in such fields as neuroscience, immunology, pharmacology, and cell biology. Some peptides can act as chemical messenger. They bind to receptor on the target cell surface and the biological effect of the ligand is transmitted to the target tissue. Hence, the specific receptor binding property of the ligand can be exploited by labeling the ligand with a radionuclide. Theoretically, the high affinity of the ligand for the receptor facilitates retention of the radio labeled ligand in receptor expressing tissues. However, it is still under investigation which peptides can be efficiently labeled and under which conditions the labeling shall occur. It is well known that receptor specificity of ligand peptide may be altered during chemical reaction. Therefore an optimal peptidic construct has to be determined.

Tumors overexpress various receptor types to which peptides bind specifically. The following publications of Boerman *et al.*, *Seminar in Nuclear Medicine*, 2000, 30(3), 195; Reubi *et al.* *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, (suppl) 67S; Reubi, J.C., *Endocrine Reviews*, 2003, 24(4), 389 provide a non exhaustive list of peptides that specifically bind to cell surface receptors in neoplasms, *i.e.*, somatostatin, vasoactive intestinal peptide (VIP), Bombesin binding to Gastrin-releasing peptide (GRP) receptor, Gastrin, Cholecystokinin (CCK), and Calcitonin.

The potential utility of metal labeled receptor specific peptides for scintigraphic imaging and radiotherapy is exemplified by somatostatin analogs, *e.g.*, ^{111}In -DTPA conjugated Octreotide, an FDA approved diagnostic imaging agent, Octreoscan®, marketed by Covidien in the United States (Lowbartz *et al.*, *Seminars in Oncology*, 1994, 1) and Reubi *et al.* *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, 67S-75S and references therein, respectively. Octreotide and its analogs have been covalently linked to several imaging metal isotopes ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{68}Ga) and to therapeutic metal isotopes (^{105}Rh , $^{186/188}\text{Re}$, ^{153}Sm , ^{90}Y , ^{166}Ho , ^{177}Lu). The metal labeled conjugates specifically bind to the receptor, and upon binding to the receptor, the construct is internalized by the receptor and the metal labeled receptor specific peptides or their metabolites are trapped in the targeted cells.

The foregoing principle is further extended to GRP receptor avid peptides (peptides have high affinity for the receptor) in which metal conjugated Bombesin agonists are used for scintigraphic imaging and radiotherapy. (Smith *et al.*, *Anticancer Res.*, 23 (2003), 63–70; Baidoo *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 9 (1998), 218–225; Gali *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 12 (2001), 354–363; Smith *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 14 (2003), 93–102, *Cancer Res.*, 63 (2003), 4082–4088; Rogers *et al.*, In, M. Nicolini and U. Mazzi, Editors, *Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine*, SGE Editoriali, Italy (1999), 519–525; Zhang *et al.*, *Cancer Res.*, 64 (2004), 6707–6715; Lantry *et al.*, *EANM*, Helsinki (Finland) (2004); Linder *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 45, (2004) (5), 169P [abstract 482]. Chen *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 45 (2004), 1390–1397; Johnson *et al.*, *Cancer Biother Radiopharm.* 2006, 21(2), 155–66, Smith *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 2005, 32 733–40).

In Chen *et al.* (*Appl. Radiat. Isot.*, 2007, (In Press)), Waser *et al.* (*Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2007 34, 95–100) and Lantry *et al.* (*J. Nucl. Med.*, 2006, 47, 1144–52) imaging and radiotherapy of a bombesin agonist, ^{177}Lu -DOTA coupled to $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-[4\text{-aminobenzoyl}]-\text{QWAVGHLM}-\text{NH}_2$)(^{177}Lu -AMBA), has been described.

Several patents and patent applications refer to metal labeled Bombesin agonists. Volkert *et al.* (US 2007/0065362 A) claim metal labeled Bombesin agonists of the general structure Metal labeling moiety-Spacer group-Bombesin agonist for imaging and therapeutic use. Other patents and patent applications by the same inventors include: US 6,921,526 B (2005), US 7,060,247 B, US 7,147,838 B (2006) and WO 2002/087631 A1.

STATE OF THE ART

The underlying principle for the selection of agonists as a radiopharmaceutical in all the above publications is that they produce or elicit a response by the GRP receptors upon interaction wherein the radiopharmaceutical is subsequently internalized inside the cell by endocytosis. GRP antagonists counteract the effect of an agonist and are not internalized into the cell and hence it is assumed that antagonists may not well be suited for radioscintigraphic imaging and radiotherapeutic purposes. Up to now the consensus has been to develop compounds with good radioligand internalization properties, leading to a high *in vivo* accumulation of

16

radioligands in the tumors that appeared to be required for optimal visualization and radionuclide therapy *in vivo*. It is well known from molecular-pharmacologic investigations that efficient internalization is usually provided predominantly by agonists (Bodei *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2006;47, 375-377; Koenig *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.*, 1997;18, 276-287, 5 Cescato *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2006;47, 502-511. Ginj *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103, 16436-16441) and recently, it was demonstrated that, in the case of somatostatin receptors, high-affinity metal labeled somatostatin receptor antagonists poorly internalize into tumor cells and perform equally or even better in terms of *in vivo* uptake into tumor in animal tumor models than the corresponding agonists, which massively internalize. GRP receptors are 10 over expressed in several neoplasms (Cornelio *et al.*, *Ann. Onco.*, 2007, 18, 1457-1466 and references therein) such as prostate cancer and metastasis, breast cancer and metastasis, gastrointestinal stromal tumors, small cell lung carcinomas, renal cell carcinomas, gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, head and neck squamous cell cancers, neuroblastomas and oesophageal squamous cell carcinomas. GRP receptors are also expressed 15 in tumor-associated blood vessels of human ovarian, endometrial and pancreatic cancers. (Fleischmann *et al.*, *Cell Onc.*, 2007, 29, 421-33). Therefore, it is highly desirable to design potent radiopharmaceuticals with antagonist properties for imaging and radiotherapy.

Jensen *et al.* (*Pharma. Reviews*, 2008 (in Press)) recently reviewed the receptor pharmacology 20 of three different Bombesin receptor subtypes of which GRP receptor belong to subtype 2.

In a recent publication Cescato *et al.* (*J. Nucl. Med.*, 2008, 49, 318-26) demonstrated that ^{99m}Tc-N₄-labelled Bombesin antagonist may be preferred over agonists for tumor targeting.

25 Earlier inventions in the field of GRP-receptor targeted compounds are described in WO 2007/109475 A2, WO 2007/095443 A2, US 2008/0008649 A1 and US 7,226,577 B2 with metal chelated-Linker-Bombesin with a general scheme shown below.

Metal-Chelator-Linker-Bombesin Analog

According to WO 2007/095443 A2, L70 sample with the particular sequence ^{177}Lu -DOTA-Gly-4-aminobenzoyl-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂ behaved as an agonist wherein the uptake at 1 and 24 hours was measured. The uptake is not optimal for therapeutic purposes and needs to be improved.

5

Besides these patents and applications, pre-clinical and clinical studies are included in the publications (Waser *et al.*, *Eur. J. Nucl. Medicine*, 2007, 34, 95-100; *J. Nucl. Med.*, 2006, 47, 1144-52).

- 10 By virtue of selecting an antagonist that targets GPR receptor at a different site with high affinity, it is shown in this invention that a combination of spacer strategy results in unexpected high and persistent tumor uptake combined with a low uptake and rapid clearance in non-target organs. In a comparative study, remarkable higher uptake ($> 2 \times$) in the tumor was observed when a similar linker was used. Starting from *in vitro* assays validating the
- 15 antagonistic properties of the Bombesin analogs it was found that even after adding N-terminally a spacer, a chelator and a metal these antagonistic effects were retained and translated into excellent *in vivo* behaviour regarding tumor-to-background ratios.

Therefore it is an object of the present invention, to provide new bombesin peptide antagonist

20 conjugates showing high uptake and high *in vivo* stability (human serum and tissue).

SUMMARY

DESCRIPTION OF THE INVENTION

- 25 In a **first aspect**, the invention relates to bombesin analog peptide antagonist conjugates which selectively bind to bombesin receptors and more particularly to GRP receptor without triggering internalization into the cell and without signaling through calcium mobilization while antagonizing the agonist-induced effects in these two systems, wherein the bombesin analog peptide antagonist conjugate has general Formula (I):

30



wherein

x is an integer from 1 to 3,

n is an integer from 1 to 6,

5 A is a metal chelator comprising at least one radionuclide metal, preferably suitable for diagnostic or therapeutic use, more preferably for imaging or radiotherapy,

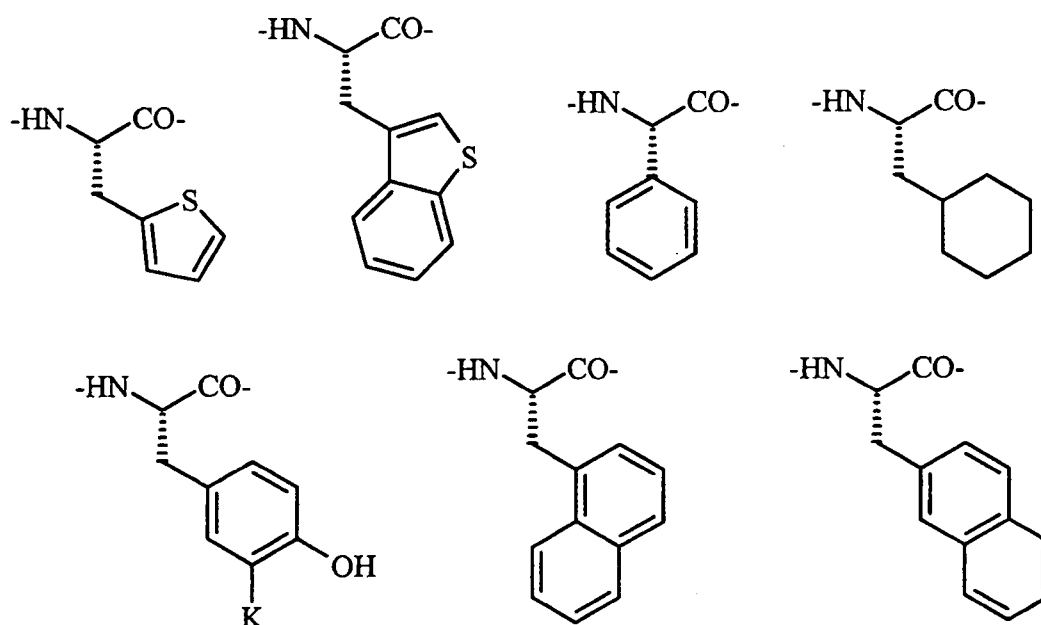
B is a spacer linked to N-terminal of C or a covalent bond ,

C is a bombesin analog peptide antagonist of sequence C-1 to C-4, wherein

10 C-1: $\text{Xaa}_1^6\text{-Gln}^7\text{-Trp}^8\text{-Ala}^9\text{-Val}^{10}\text{-Xaa}_2^{11}\text{-His}^{12}\text{-Xaa}_3^{13}\text{-Xaa}_4^{14}\text{-ZH}$,

wherein

Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described below:



K is F, Cl, I, or NO₂,

Xaa₂ is Gly or β-Ala,

Xaa₃ is Statine, Statine analogs and isomers, 4-Am,5-MeHpA, 4-Am,5-MeHxA or α-

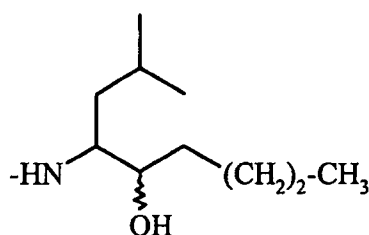
20 substituted aminoacids,

Xaa₄ is Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle, or iso-Bu-Gly, and
Z is NH or O;

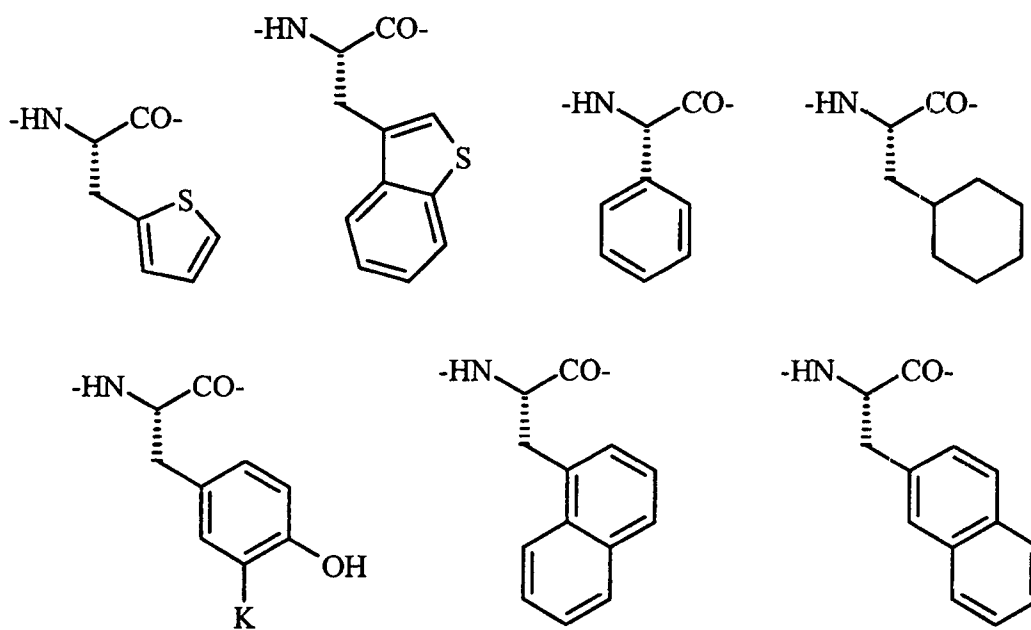
C-2: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

5 wherein

Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃ is



10 Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described below:



15 and

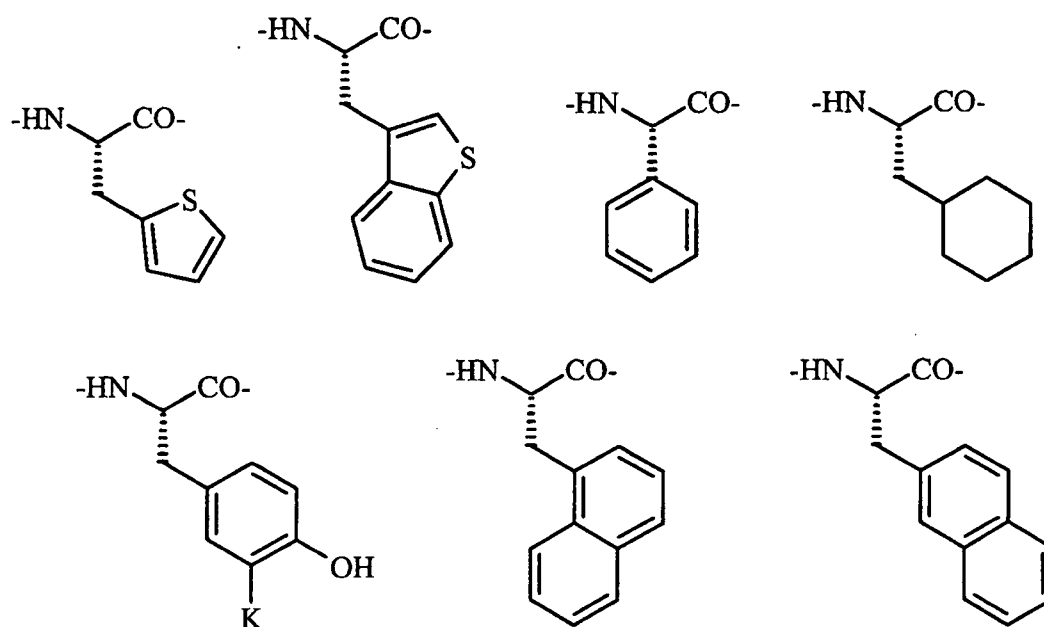
K is F, Cl, I, or NO₂,

Xaa₂ is Gly or β-Ala;

C-3: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₅¹³-Xaa₆¹⁴-ZH,

20 wherein

Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described below:



5

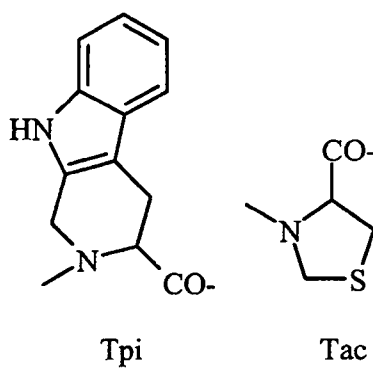
K is F, Cl, I, or NO₂,

Xaa₂ is Gly or β-Ala,

Xaa₅ is Leuψ-CH₂NH-

Xaa₆ is Cys, Phe, Trp, Tpi or Tac,

10 wherein Tpi and Tac have the following meaning:



and

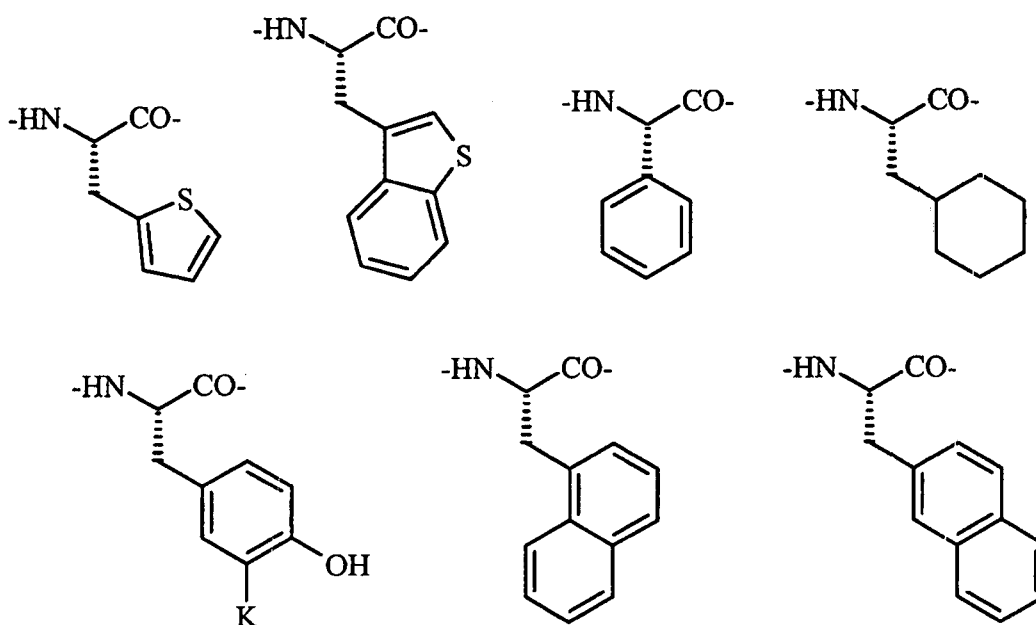
Z is NH, or O;

C-4: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₇,

wherein

Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described below:

5



K is F, Cl, I, or NO₂,

Xaa₂ is Gly or β-Ala,

10 Xaa₇ is Leu-O-Alkyl, or Leu-NH-alkyl.

The invention further refers to pharmaceutically acceptable salts of these bombesin analog peptide antagonist conjugates of an inorganic or organic acid thereof, and further to hydrates, complexes, esters, amides, solvates and prodrugs of these compounds having general chemical

15 Formula (I).

Description A (metal chelator):

In a preferred embodiment of the present invention, the metal chelator (A) is a metal chelator for trivalent metals or for pentavalent metals and their close analogs.

20

Preferably, the metal chelator (A) for trivalent metals is selected from the group comprising: DOTA-, NODASA-, NODAGA-, NOTA-, DTPA-, EDTA-, TETA-, and TRITA- based chelators and their close analogs,

wherein

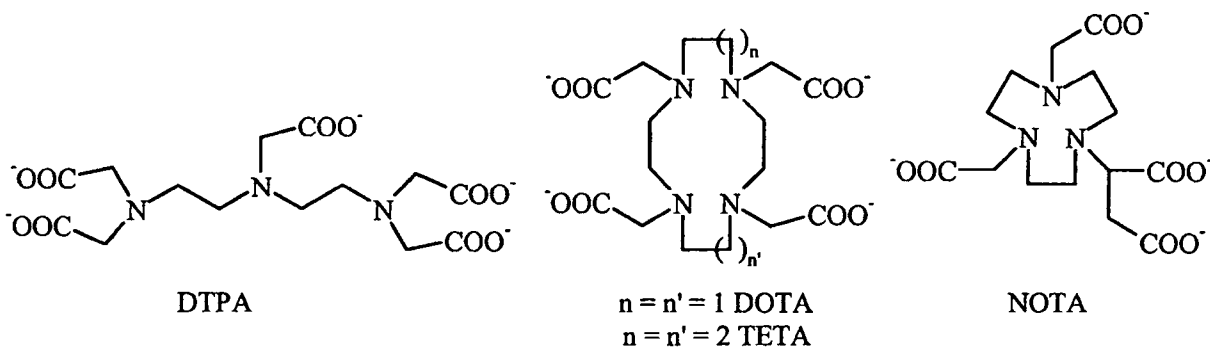
- 5 DOTA stands for 1,4,7,10-tetrazacyclododecane-N, N',N'',N''' tetraacetic acid,
DTPA stands for diethylenetriaminepentaacetic acid,
EDTA stands for ethylenediamine-N,N'-tetraacetic acid,
TETA stands for 1,4,8,11-tetraazacyclododecane-1,4,8,11-tetraacetic acid, and
NOTA stands for 1,4,7-triazacyclononanetriacetic acid.

10

More preferably, the metal chelator (A) for trivalent metals is selected from the group comprising:

DOTA-, NOTA-, DTPA-, and TETA-based chelators and their close analogs.

- 15 The structures of these chelating ligands in their fully deprotonated form are shown below.

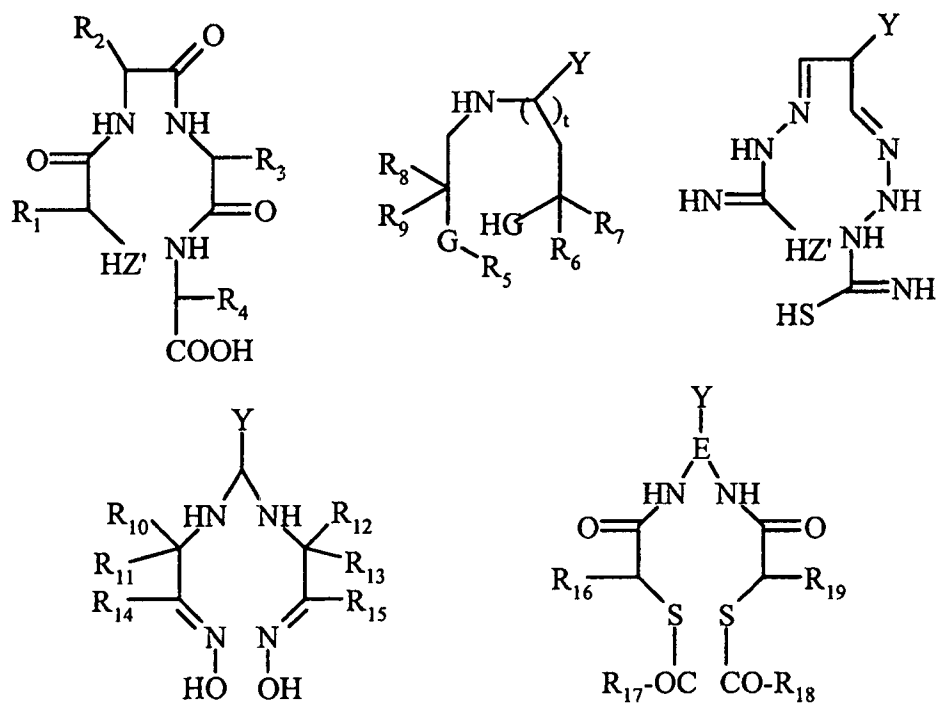


- Even more preferably, the metal chelator (A) for trivalent metals is selected from the group comprising DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) and polyaza-polycarboxylate macrocycles such as DOTA (1,4,7,10-tetrazacyclododecane-N, N',N'',N''' tetraacetic acid) and the close analogs thereof.
- 20

Preferably, the metal chelator (A) for pentavalent metals is selected from the group comprising

2-hydrazino nicotinamide (HYNIC), N₄-chelators, N₄-X (N₄ may be linear or macrocyclic and X may be an azide amine, OH, halogen, o-, m-, p-amino benzyl metaparacarboxybenzyl, and carboxy (Nock, B. *et al.* (2003 [^{99m}Tc]Demobesin 1, a novel bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging. *Eur. J. Nucl. Mol. Imaging*, 30, 247-258)), Desferrioxamin (DFO), and N_rS_(4-r) chelators.

5 and



wherein

10 R₁-R₁₅ are independently from each other hydrogen atoms or (C₁ -C₄) alkyl groups,

wherein, in the  moiety of the above formula, t is 1 or 2 or 3 and at least one of the

carbon atoms in the said  moiety is substituted by Y or is not substituted by Y,
R₁₆ is a hydrogen atom or a CO₂ (C₁ -C₄)alkyl group;
R₁₇ and R₁₈ are independently from each other (C₁-C₄) alkyl groups or phenyl groups;

R_{19} is $\text{CH}_2\text{-COOH}$ or a functional derivative thereof;

E is $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ alkylene, or phenylene;

optionally $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ alkylene is substituted by $\text{CO}_2\text{-alkyl}$, $\text{CH}_2\text{-COalkyl}$, CONH_2 , or $\text{CONHCH}_2\text{-CO}_2\text{-alkyl}$;

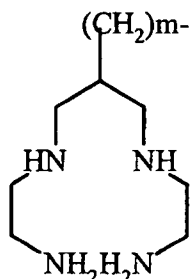
- 5 optionally phenylene is substituted by $\text{CO}_2\text{-alkyl}$,
wherein the alkyl groups have 1 to 4 carbon atoms;

G is NH or S;

Y is a functional group capable of binding with a free amino group of the peptide (N-terminal)
or with the spacer; and

- 10 Z' is S or O.

N_4 -chelators is preferably,



- 15 wherein
m means an integer from 1 to 4.

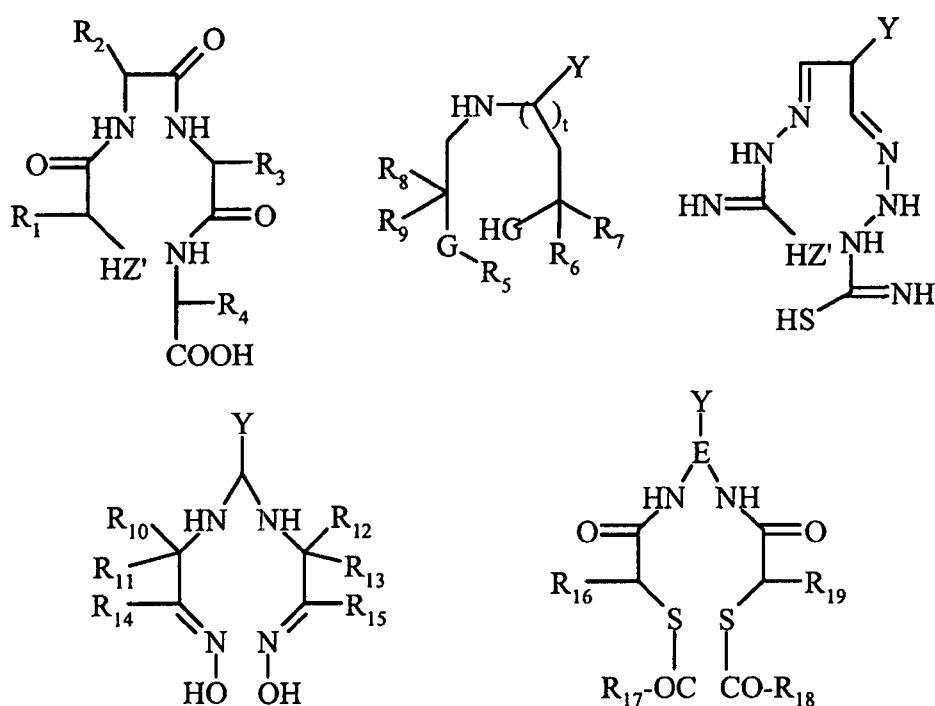
$\text{N}_r\text{S}_{(4-r)}$ chelators is defined wherein r is an integer from 1 to 4.

- 20 Said functional group Y preferably comprises isocyanato, isothiocyanato, formyl,
halonitrophenyl, diazonium, epoxy, trichloro-s-triazinyl, ethyleneimino, chlorosulfonyl,
alkoxycarb-imidoyl, (substituted or unsubstituted) alkylcarbonyloxycarbonyl,
alkylcarbonylimidazolyl, succinimido-oxycarbonyl; said group being attached to a $(\text{C}_1\text{--C}_{10})$
hydrocarbon biradical. Suitable examples of hydrocarbon biradicals are biradicals derived
25 from benzene, $(\text{C}_1\text{--C}_6)$ alkanes, $(\text{C}_2\text{--C}_6)$ alkenes and $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ -alkylbenzenes,
and the close analogs thereof.

Preferably $N_tS_{(4-t)}$ chelators are selected from the group comprising bisamino bithiol (BAT) based chelators for technetium radionuclide metal, mercapto-acetyl-glycyl-glycyl-glycine (MAG3) for technetium radionuclide metal and the close analogs thereof.

5

More preferably, the metal chelator (A) for pentavalent metals is selected from the group comprising



10 and the close analogs thereof,

wherein R_1 - R_{19} , Z' , Y , G and t are defined as above.

Preferably, r is an integer from 2 to 4 and more preferably r is 2 or 3.

15

Preferably, m means an integer from 1 to 2, more preferably m is 1.

Well known metal chelators such as linear, macrocyclic, tetrapyridine and N₃S, N₂S₂ or N₄ chelators are disclosed in US 5,367,080 A, US 5,364,613 A, US 5,021,556 A, US 5,075,099 A, US 5,886,142 A, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entirety.

- 5 Well known metal chelators such as HYNIC, DTPA, EDTA, DOTA, TETA, bisamino bisthiol (BAT) based chelators are disclosed in US 5,720,934 A the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety.

- 10 Well known metal chelators such as Desferrioxamin (DFO) is disclosed in Doulias *et al.* (2003) *Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 35, Issue 7:719-28.

- 15 A wide variety of chelating agents is available and reviewed by Banerjee *et al.*, (*Nucl. Med. and Biology*, 2005, 32, 1-20 and references therein) included herein by reference.

- 20 2-hydrazino nicotinamide (HYNIC) is another class of chelating group (A), in the presence of a coligand which has been widely used for incorporation of ^{99m}Tc and ^{186,188}Re (Schwartz *et al. Bioconj. Chem.*, 1991, 2, 333-6; Babich *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 1993, 34, 1964-70; *Nucl. Med. Biol.*, 1995, 22, 25-30; *Nucl. Med. Biol.*, 1995, 22, pp. 32, pp. 1-10)

- 25 DTPA is used in Octreoscan® (marketed by Covidian) for complexing ¹¹¹In and several modifications are described in the literature (Brechtel *et al.*, *Biocon. Chem.*, 1991, 2, 187-194; Li *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 2001, 28, 145-154).

- DOTA type chelates for radiotherapy applications are described by Tweedle *et al.*, US Pat 48885363. Other polyaza macrocycles for chelating trivalent isotopes metals are described by Maecke *et al* in *Bioconj. Chem.*, 2002, 13, 530 and are included herein by reference.

- 30 N₄-chelators, ^{99m}Tc-N₄-chelator have been used for peptide labeling in the case of minigastrin for targeting CCK-2 receptors (Nock *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, 1727-36).

In a preferred embodiment of the present invention, the radionuclide metal is suitable for being complexed with a metal chelator and leading to radioactive metal chelator for imaging. Preferably, the radionuclide metal is selected from the group comprising $^{133\text{m}}\text{In}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{52}Fe , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{203}Pb , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{51}Cr , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{157}Gd , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{64}Cu and ^{82}Br . More preferably, the radionuclide metal is selected from the group comprising $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , and ^{123}I . Even more preferably the radionuclide metal is ^{68}Ga . Even more preferably the radionuclide metal is $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

10

In a preferred embodiment of the present invention, the radionuclide metal is suitable for complexing with a metal chelator and leading to radioactive metal chelator for radiotherapy. Preferably, the radionuclide metal is selected from the group comprising ^{186}Re , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{69}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{188}Rd , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{172}Tm , ^{90}Y , ^{111}In , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{125}I , ^{123}I , ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{129}I , ^{64}Cu and $^{177\text{m}}\text{Sn}$. More preferably, the radionuclide metal is selected from the group comprising ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{68}Ga , and ^{177}Lu .

15

In a further alternative of the first aspect the suitable radionuclide metal is a radioactive halogen (iodine and bromine isotopes), the radioactive halogen is bonded directly to the peptide, such as by chemical reaction to a Tyr or Trp moiety within the peptide, or optionally A can be Tyr or Trp.

20

Preferred radiodiagnostic agents (^{67}Ga , ^{111}In) and radiotherapeutic agents (^{90}Y , ^{153}Sm , ^{177}Lu) optionally contain a chelated +3 metal ion from the class of elements known as the lanthanides. Typical radioactive metals in this class include the isotopes $^{90}\text{Yttrium}$, $^{111}\text{Indium}$, $^{149}\text{Promethium}$, $^{153}\text{Samarium}$, $^{166}\text{Dysprosium}$, $^{166}\text{Holmium}$, $^{175}\text{Ytterbium}$, and $^{177}\text{Lutetium}$. All of these metals (and others in the lanthanide series) have very similar chemistries, in that they remain in the +3 oxidation state and prefer to chelate to ligands that bear hard (oxygen/nitrogen) donor atoms.

25

30

Description B (spacer):

B is a spacer linked to N-terminal of C or a covalent bond.

In a preferred embodiment of the present invention B is a compound having Formula (II)



wherein

B_1 is a covalent bond, a natural amino acid, an unnatural amino acid, a linear diamine or a cyclic diamine,

B_2 is a covalent bond, a natural amino acid, an unnatural amino acid, a linear carboxylic acid or a cyclic carboxylic acid,

with the proviso that both B_1 and B_2 cannot be covalent bonds at the same time and that, when

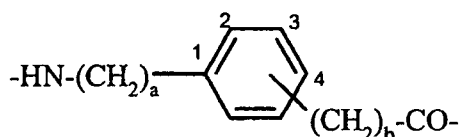
B_1 is a diamine, B_2 is a carboxylic acid (*i.e.*, B_2 cannot be a bond or a natural or unnatural

amino acid in this case).

Preferably the unnatural amino acid is a compound having any one of Formulae (III), (IV), (V) or (VI)

wherein

(III)



wherein

a is an integer from 0 to 3,

b is an integer from 0 to 3,

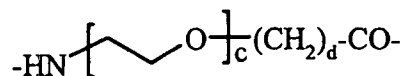
and relative substitution patterns or optionally 1,2-, 1,3- or 1,4-

Preferably,

a is 0 or 1,

b is 0 or 1,

(IV)



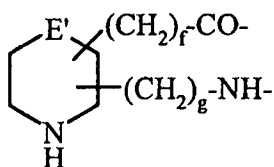
wherein

- 5 c is an integer from 1 to 24,
d is an integer from 1 to 6.

Preferably,

- c is an integer from 1 to 15, more preferably c is from 1 to 8,
10 d is an integer from 1 to 3, more preferably d is 1 .

(V)



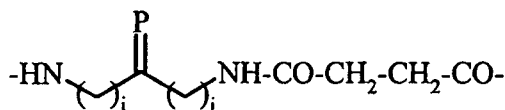
wherein

- 15 E' is NH, or CH₂,
f is an integer from 0 to 6,
g is an integer from 0 to 6;
when E' is CH₂, then the 6-membered ring is optionally substituted at any carbon position of the 6-membered ring on the same carbon of the ring or on different carbons,
20 when E' is NH, then the 6-membered ring is optionally substituted at any carbon position of the 6-membered ring on the same carbon atom of the ring or on different carbon atoms and/or on the nitrogen atom with the proviso that f or g is an integer equal to or higher than 1.

Preferably,

- 25 E' is NH,
f is an integer from 0 to 3,
g is an integer from 0 to 3;

(VI)



wherein

5 i is an integer from 1 to 6,

j is an integer from 1 to 6,

P is O or H₂.

Preferably,

i is an integer from 1 to 3,

10 j is an integer from 1 to 3,

P is O.

More preferably the spacer is selected from the group comprising 4-amino-1-

carboxymethylpiperidine, (R,S)-diaminoacetic acid, PEG₁₋₂₄, Sar₅₋₁₀, 8-amino-octanoic acid, 6-

15 aminocaproic acid, 4-(2-aminoethyl)-1-carboxymethyl piperazine, diaminobutyric acid,

hippuric acid, 4-amino-1-Boc-piperidine-4-carboxylic acid, Gly-aminobenzoic acid, 5-amino-

3-oxa-pentyl-succinamic acid, Peg₁₋₂₄-4-amino-1-carboxymethyl piperidine, Dab(shikimic acid), (D-Gln)_x, (D-Asn)_x.20 Description C (bombesin analog peptide antagonist of sequence)

In a preferred embodiment of the present invention, the bombesin analog peptide antagonist sequence is selected from the group comprising C-1 to C-3, preferably C-1 to C-2.

Preferably, the bombesin analog peptide antagonist sequence is selected from the group

25 comprising:

Compound 1 Seq: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;Compound 9 Seq: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

Compound 12 Seq: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)-Phe-NH₂;

Compound 13 Seq: Dphe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)-Cys-NH₂.

- 5 Preferably, the bombesin analog peptide antagonist conjugate having Formula (I) comprising at least one radionuclide metal is selected from the group comprising

Compound 1: DOTA-Gly-aminobenzoyl-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compound 2: DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

- 10 Compound 3: DOTA-4-amino-1-piperidine-4-carboxylicacid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compound 4: DOTA-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

15

Compound 5: DOTA-(15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid)-(4-amino-1-carboxymethyl-piperidine)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compound 6: DOTA-diaminobutyricacid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

20

Compound 7: DOTA-4-(2-aminoethyl)-1-carboxymethyl-piperazine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compound 8: DOTA-(5-amino-3-oxa-pentyl)-succinamic acid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-

- 25 His-Sta-Leu-NH₂;

Compound 9: DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

- 30 Compound 10: DOTA-(15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

Compound 11: DOTA-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid -D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

5 Compound 12: DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)-Phe-NH₂;

Compound 13: DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)-Cys-NH₂;

10

Compound 14: N₄-triazoles-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂.

Other preferred embodiments:

15 In a preferred embodiment of the present invention, for the compound having Formula (I), x is an integer from 1 to 2, preferably x is 1.

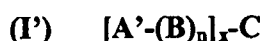
When x is equal to or higher than 2, then (B)_n is a linear spacer or a branched spacer linked to the N-terminal of the bombesin analog peptide antagonist (C).

20 In a preferred embodiment of the present invention, for the compound having Formula (I), n is an integer from 1 to 4, preferably n is 1 or 3, more preferably 1.

25 In a preferred embodiment of the present invention, for the compound having Formula (I), A is additionally a metal chelator comprising at least one cold metal atom corresponding or equivalent to the listed above radionuclide metal. Such compounds are useful for in-vitro in-vivo binding assays and as reference compounds. Listed above preferred embodiments apply here.

30 In a preferred embodiment of the present invention, for the compound having Formula (I), K is additionally H or preferably H.

In a **second aspect**, the invention relates to bombesin analog peptide antagonist conjugate precursors which selectively bind to bombesin receptors and which more particularly bind to GRP receptor without triggering internalization into the cell and without signaling through calcium mobilization while antagonizing the agonist-induced effects in these two systems,
5 wherein the bombesin analog peptide antagonist conjugate has general Formula (I')



wherein

10 x is an integer from 1 to 3,

n is an integer from 1 to 6

A' is a metal chelator,

B is a spacer linked to N-terminal of C or a covalent bond,

C is a bombesin analog peptide antagonist of sequence C-1 to C-4.

15 The metal chelator A' is a metal chelator free of radionuclide metal as defined in the first aspect for A.

The spacer B and the bombesin analog peptide antagonist C are defined as above in the first aspect.

20

The invention further refers to pharmaceutically acceptable salts of the bombesin analog peptide antagonist conjugates of an inorganic or organic acid thereof, and to hydrates, complexes, esters, amides, solvates and prodrugs of these compounds having general chemical Formula (I').

25

In a preferred embodiment of the present invention, x is an integer from 1 to 2, preferably x is 1. When x is equal to or higher than 2, then (B)_n is a linear spacer or a branched spacer linked to the N-terminal of the bombesin analog peptide antagonist (C).

30 In a preferred embodiment of the present invention, in Formula (I'), n is an integer from 1 to 4, preferably n is 1 or 3, more preferably 1.

25

In a **third aspect**, the invention relates to a pharmaceutical composition comprising bombesin analog peptide antagonist conjugates having Formula (I) or (I') and a pharmaceutical acceptable carrier.

5

In a **fourth aspect**, the invention relates to the use of bombesin analog peptide antagonist conjugates having Formula (I) or (I') for binding to bombesin receptors and more particularly gastrin releasing peptide receptor (GRP) and/or for inhibiting bombesin receptors and more particularly gastrin releasing peptide receptor (GRP).

10

In a **fifth aspect**, the invention relates to a method for preparing a bombesin analog peptide antagonist conjugate having general Formula (I)



15

wherein n , x , A , B and C are defined as above,
comprising the step

- Radiochelating the bombesin analog peptide antagonist conjugate having general Formula (I') as defined above with a suitable radionuclide metal or metal atom corresponding to radionuclide metal listed above.

20

Preferably, the method for preparing a bombesin analog peptide antagonist conjugate having general Formula (I) comprises the step of radiochelating with a suitable radionuclide metal.

- 25 In a further embodiment, the method for preparing a bombesin analog peptide antagonist conjugate having general Formula (I)



- 30 wherein n , x , A , A' , B and C are defined as above,
comprises additionally the steps:

a) Coupling a spacer **B** to a bombesin analog peptide antagonist **C** for obtaining a spacer- bombesin analog peptide antagonist of sequence C-1 to C-4, optionally repeating step a); and
b) Coupling a spacer- bombesin analog peptide antagonist with a metal chelator **A'** for obtaining bombesin analog peptide antagonist conjugate having general Formula (I'),

5 optionally repeating step b),

above steps occurring before the radiochelating of the bombesin analog peptide antagonist conjugate having general Formula (I') with a suitable radionuclide metal or metal atom corresponding or equivalent to radionuclide metal listed above.

10

In a preferred embodiment of the present invention, n, x, metal chelator **A**, metal chelator **A'**, spacer **B** and bombesin analog peptide antagonist **C** are defined as above.

15

In a **sixth aspect**, the invention relates to a method for imaging bombesin receptors and more particularly GRP Receptor expressing tumor cells and/or tumoral and peritumoral vessels in a patient, comprising the steps:

- Administering to a patient a radiopharmaceutical effective amount of a bombesin analog peptide antagonist conjugate having Formula (I); and
- Imaging the radionuclide metal in the patient.

20

A preferred embodiment of the sixth aspect concerns the use of a radiopharmaceutically effective amount of a bombesin analog peptide antagonist conjugate having Formula (I) for the manufacture of an imaging agent for imaging bombesin receptors and more particularly GRP Receptor expressing tumor cells and/or tumoral and peritumoral vessels.

25

In a preferred embodiment the tumor cells refer to cancers that are selected from the group comprising:

30

- prostate cancer, including metastases,
- breast cancer, including metastases,
- gastrointestinal stromal tumors,
- small cell lung carcinomas,

26

- renal cell carcinomas,
- gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors,
- head and neck squamous cell cancers,
- neuroblastomas, and
- 5 - oesophageal squamous cell carcinomas.

Even more preferably, tumor cells refer to cancers that are selected from

- prostate cancer, including metastases, and
- 10 - breast cancer, including metastases.

In a further preferred embodiment tumoral and peritumoral vessels refer to cancers that are selected from

- Ovarian cancers,
- Endometrial cancers, and
- 15 - Pancreatic cancers.

Preferably, the tumoral and peritumoral vessels refers to Ovarian cancers.

In a **seventh aspect**, the invention relates to a method for treating or preventing tumor cell
20 and/or tumoral and peritumoral vessel related diseases comprising the step:

- Administering a therapeutically effective amount of a bombesin analog peptide antagonist conjugate having Formula (I).

A preferred embodiment of the seventh aspect concerns the use of a therapeutically effective
25 amount of a bombesin analog peptide antagonist conjugate having Formula (I) for the manufacture of a medicament for treating or preventing tumor cell and/or tumoral and peritumoral vessel related diseases.

In a preferred embodiment the tumor cell related diseases refer to cancers that are selected
30 from the group comprising:

- prostate cancer, including metastases,

- breast cancer, including metastases,
- gastrointestinal stromal tumors,
- small cell lung carcinomas,
- renal cell carcinomas,
- 5 - gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors,
- head and neck squamous cell cancers,
- neuroblastomas, and
- oesophageal squamous cell carcinomas.

10 Even more preferably, the tumor cell related diseases refer to cancers that are selected from the group comprising:

- prostate cancer, including metastases, and
- breast cancer, including metastases.

15 In a further preferred embodiment tumoral and peritumoral vessel related diseases refer to cancers that are selected from the group comprising:

- ovarian cancers,
- endometrial cancers, and
- pancreatic cancers.

20

Preferably, the tumoral and peritumoral vessel related diseases refers to Ovarian cancers.

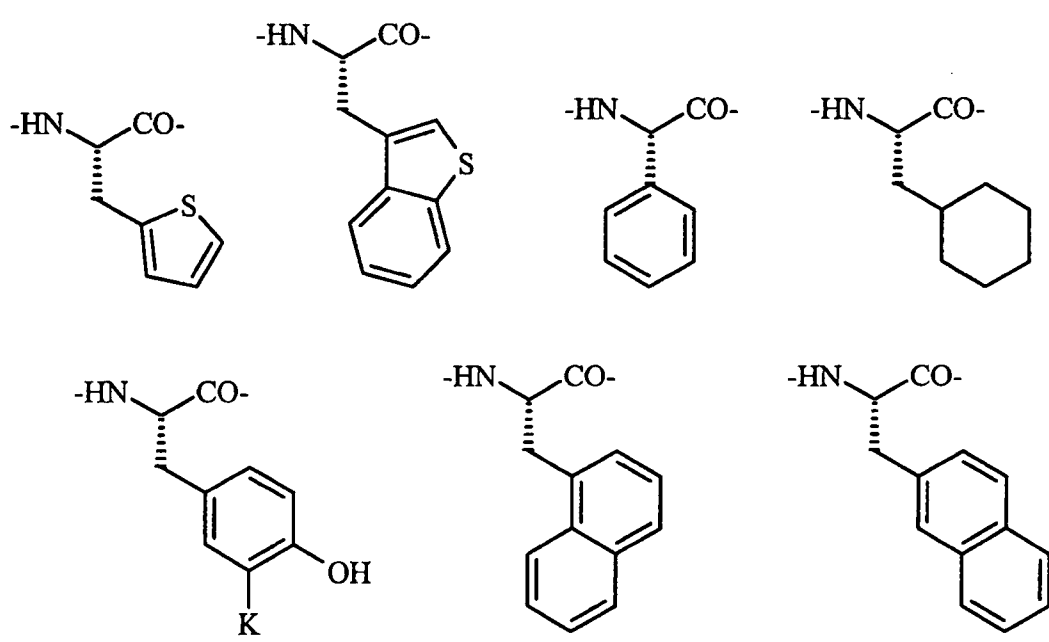
In an **eighth aspect**, the invention relates to a kit for the preparation of a radiotherapeutical agent or radiopharmaceutical imaging agent having Formula (I), which kit comprises a vial
25 containing a predetermined quantity of bombesin analog peptide antagonist conjugate of formula (I') and an acceptable carrier, diluent, excipient or adjuvant for the radiolabeling a metal chelator.

In an **ninth aspect**, the invention relates to bombesin analog peptide antagonist of sequence
30 C-1 to C-4, wherein

27

C-1: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-Z^H,
 wherein
 Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described
 below:

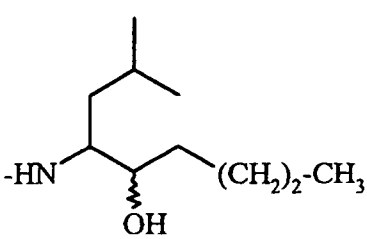
5



K is F, Cl, I, or NO₂,
 Xaa₂ is Gly or β-Ala,
 Xaa₃ is Statine, Statine analogs and isomers, 4-Am,5-MeHpA, 4-Am,5-MeHxA or α-substituted aminoacids,
 Xaa₄ is Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle, or iso-Bu-Gly, and
 Z is NH or O;

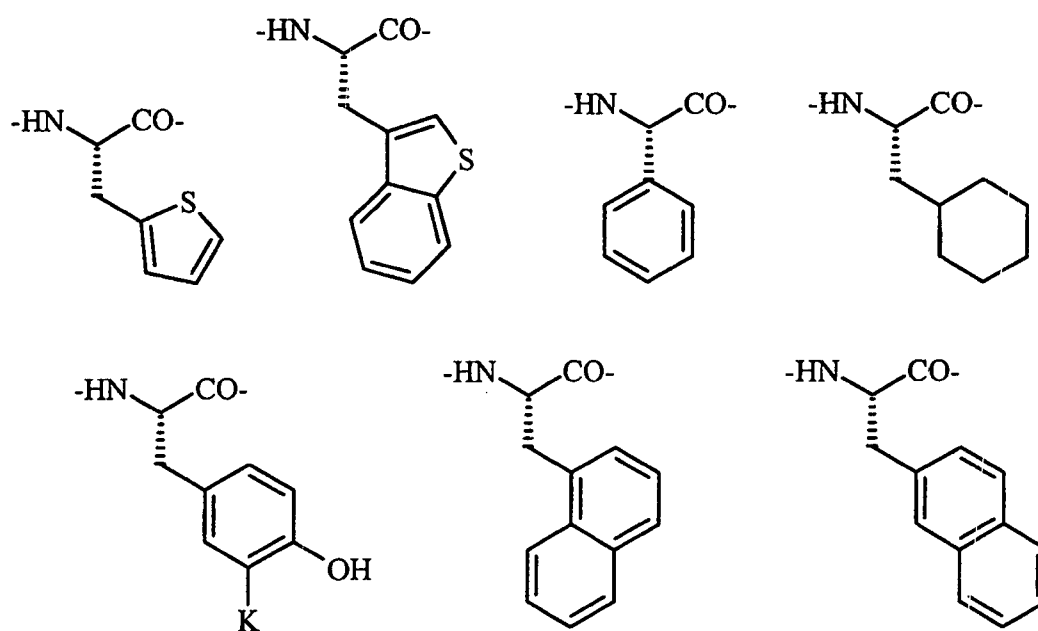
10

C-2: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,
 wherein
 Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃ is



20

Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described below:



5

and

K is F, Cl, I, or NO₂,

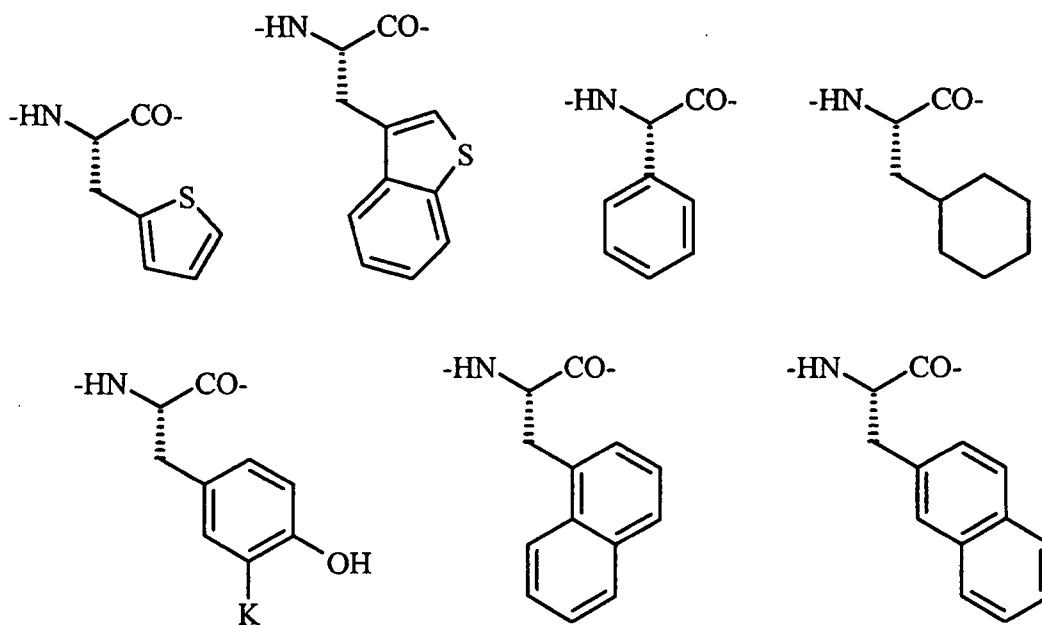
Xaa₂ is Gly or β-Ala;

10 **C-3:** Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₅¹³-Xaa₆¹⁴-ZH,

wherein

Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described below:

28



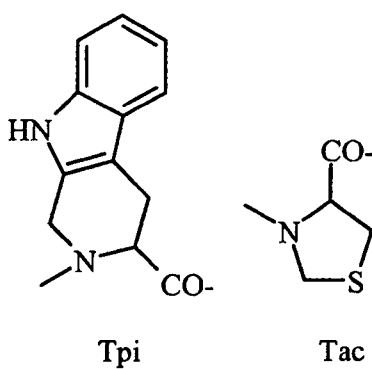
K is F, Cl, I, or NO₂,

Xaa₂ is Gly or β-Ala,

5 Xaa₅ is Leuψ-CH₂NH-,

Xaa₆ is Cys, Phe, Trp, Tpi or Tac,

wherein Tpi and Tac have the following meaning:



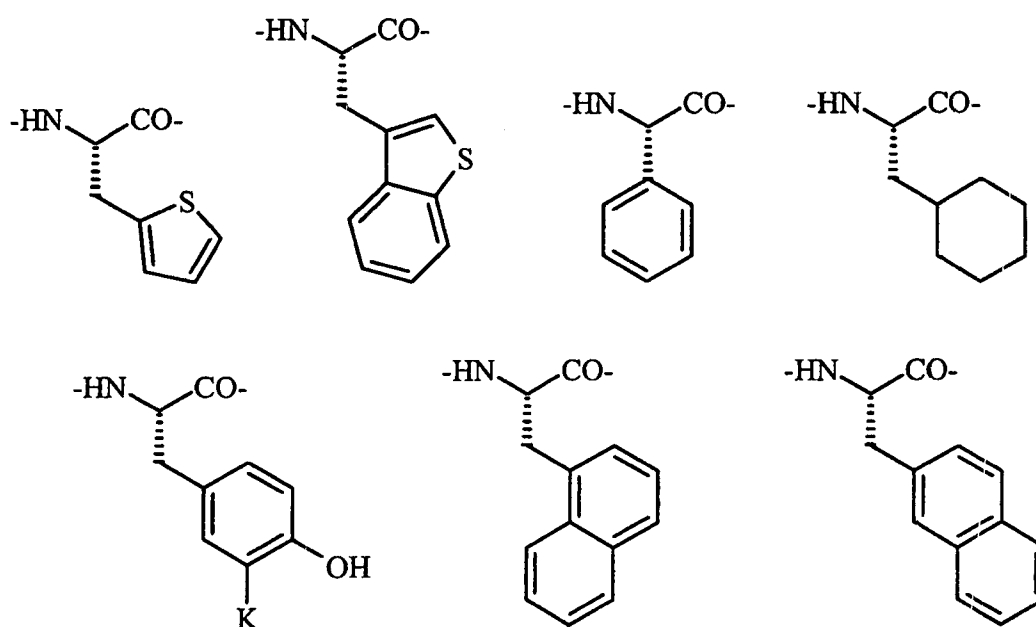
and

10 Z is NH, or O;

C-4: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₇,

wherein

Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described below:



5

K is F, Cl, I, or NO₂,

Xaa₂ is Gly or β-Ala,

Xaa₇ is Leu-O-Alkyl, or Leu-NH-alkyl.

10

DEFINITIONS

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term “alkyl”, by itself or as part of another group, refers to a straight chain or branched chain alkyl group with 1 to 20 carbon atoms, such as, for example, methyl, ethyl, propyl, *iso*-propyl, butyl, *iso*-butyl, *tert*-butyl, pentyl, *iso*-pentyl, *neo*-pentyl, heptyl, hexyl, decyl. Alkyl groups can also be substituted, such as by halogen atoms, hydroxyl groups, C₁-C₄-alkoxy groups or C₆-C₁₂-aryl groups. More preferably alkyl is C₁-C₁₀-alkyl, C₁-C₆-alkyl or C₁-C₄-alkyl.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term “lower unbranched or branched alkyl(en)” shall have the following meaning: a substituted or

20

29

unsubstituted, straight or branched chain monovalent, divalent or trivalent radical consisting of carbon and hydrogen, containing no unsaturation and having from one to eight carbon atoms, *e.g.*, but not limited to methyl, ethyl, *n*-propyl, *n*-pentyl, 1,1-dimethylethyl (*t*-butyl), *n*-heptyl and the like. This moiety may be unsubstituted or substituted, such as by halogen atoms,
5 hydroxyl atoms, C₁-C₄-alkoxy groups or C₆-C₁₂-aryl groups.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "phenylene" group is based on a di- or optionally tri-substituted benzene ring. For example, poly(*p*-phenylene) is a polymer built up from *para*-phenylene repeating units. Phenylene may be
10 substituted or unsubstituted. It may be substituted with halogen, OH, alkoxy, preferably C₁-C₄-alkoxy, carboxy, ester, preferably C₁-C₄-ester, amide, nitro.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "alkene" shall have the following meaning: an unsaturated aliphatic or alicyclic chemical compound
15 containing at least one carbon-to-carbon double bond. The simplest acyclic alkenes, with only one double bond and no other functional groups, form a homologous series of hydrocarbons with the general formula C_nH_{2n}, *e.g.*, ethylene (C₂H₄), propylene (C₃H₆). The alkenes may be substituted or unsubstituted. If the alkene are substituted, they may be substituted by halogen atoms, hydroxyl groups, C₁-C₄-alkoxy groups, C₆-C₁₂-aryl groups or the like.

20

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "aryl" shall have the meaning of an unsaturated ring system, preferably an aromatic ring system, more preferably having 6 to 12 carbon atoms in the ring skeleton. Examples thereof are phenyl and naphthalenyl. The aryl moieties may be unsubstituted or substituted, such as by halogen atoms,
25 hydroxyl groups, C₁-C₄-alkoxy groups or C₆-C₁₂-aryl groups.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "benzene" shall have the following meaning: an organic chemical compound with the formula C₆H₆. Benzene is an aromatic hydrocarbon and the second [*n*]-annulene ([6]-annulene), a cyclic
30 hydrocarbon with a continuous pi bond. Benzene may be unsubstituted or substituted, such as by halogen atoms, hydroxyl groups, C₁-C₄-alkoxy groups or C₆-C₁₂-aryl groups.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the terms "alkenyl" and "alkynyl" are similarly defined as for alkyl, but contain at least one carbon-carbon double or triple bond, respectively. Alkenyl may more preferably be C₂-C₆-alkenyl and alkynyl may
5 more preferably be C₂-C₆-alkynyl.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "halogen" shall have the meaning of F, Cl, Br or I.

10 As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the terms "salts of inorganic or organic acids", "inorganic acid" and "organic acid" refer to mineral acids, including, but not being limited to acids such as: carbonic, nitric, phosphoric, hydrochloric, perchloric or sulphuric acid or the acidic salts thereof such as the potassium, sodium, calcium, magnesium salts, for example potassium hydrogen sulfate, or to appropriate organic acids
15 which include, but are not limited to: acids such as aliphatic, cycloaliphatic, aromatic, araliphatic, heterocyclic, carboxylic and sulphonc acids, examples of which are formic, acetic, trifluoroacetic, propionic, succinic, glycolic, gluconic, lactic, malic, fumaric, pyruvic, benzoic, anthranilic, mesylic, fumaric, salicylic, phenylacetic, mandelic, embonic, methansulfonic, ethanesulfonic, benzenesulfonic, phantothenic, toluenesulfonic, trifluormethansulfonic and
20 sulfanilic acid, respectively. Likewise, the organic acids may also be present as the salts thereof, such as the potassium, sodium, calcium, magnesium salts.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "pharmaceutically acceptable salt" relates to salts of inorganic and organic acids, such as
25 mineral acids, including, but not limited to, acids such as carbonic, nitric or sulfuric acid, or organic acids, including, but not limited to, acids such as aliphatic, cycloaliphatic, aromatic, araliphatic, heterocyclic, carboxylic and sulphonc acids, examples of which are formic, acetic, trifluoroacetic, propionic, succinic, glycolic, gluconic, lactic, malic, fumaric, pyruvic, benzoic, anthranilic, mesylic, salicylic, phenylacetic, mandelic, embonic, methansulfonic,
30 ethanesulfonic, benzenesulfonic, phantothenic, toluenesulfonic and sulfanilic acid.

30

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "prodrug" means any covalently bonded compound, which releases the active parent pharmaceutical according to formula (I).

- 5 The term "prodrug" as used throughout this application also comprises pharmacologically acceptable derivatives such as esters, amides and phosphates, such that the resulting *in vivo* biotransformation product of the derivative is the active drug as defined in Formula (I). The reference by Goodman and Gilman (*The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8 ed, McGraw-HiM, Int. Ed. 1992, "*Biotransformation of Drugs*", 13-15) describes prodrugs, the
- 10 disclosure of which is herein incorporated by reference. Prodrugs of a compound of the present invention are prepared by modifying functional groups present in the compound in such a way that the modifications are cleaved, either in routine manipulation or *in vivo*, to the parent compound. Prodrugs of the compounds of the present invention include those compounds wherein for instance a hydroxy group, such as the hydroxy group on the
- 15 asymmetric carbon atom, or an amino group is bonded to any group that, when the prodrug is administered to a patient, cleaves to form a free hydroxyl or free amino, respectively.

- Typical examples of prodrugs are described for instance in WO 99/33795 A, WO 99/33815 A, WO 99/33793 A and WO 99/33792 A, the disclosures of which are incorporated herein by
- 20 reference in their entirety.

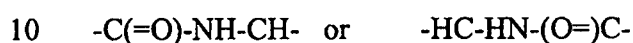
Prodrugs are characterized by excellent aqueous solubility, increased bioavailability and are readily metabolized into the active inhibitors *in vivo*.

- 25 As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the terms "amino acid sequence" and "peptide" are defined herein as a polyamide obtainable by (poly)condensation of at least two amino acids.

- As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "amino acid"
- 30 means any molecule comprising at least one amino group and at least one carboxyl group, but no peptide bond within the molecule. In other words, an amino acid is a molecule that has a

carboxylic acid functionality and an amine nitrogen having at least one free hydrogen, preferably in alpha position thereto, but no amide bond in the molecule structure. Thus, a dipeptide having a free amino group at the N-terminus and a free carboxyl group at the C-terminus is not to be considered as a single "amino acid" within the above definition. The
5 amide bond between two adjacent amino acid residues which is obtained from such a condensation is defined as a "peptide bond".

An amide bond as used herein means any covalent bond having the structure



wherein the carbonyl group is provided by one molecule and the NH-group is provided by the other molecule to be joined. An amide bond between two adjacent amino acid residues which is obtained from such a polycondensation is defined as a "peptide bond". Optionally, the
15 nitrogen atoms of the polyamide backbone (indicated as NH above) may be independently alkylated, *e.g.*, with $\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-alkyl}$, preferably with -CH_3 .

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, an amino acid residue is derived from the corresponding amino acid by forming a peptide bond with another amino
20 acid.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, an amino acid is a naturally occurring or unnatural amino acid wherein unnatural amino acid is a synthetic / artificial amino acid residue, proteinogenic and/or non-proteinogenic amino acid residue. The
25 non-proteinogenic amino acid residues may be further classified as (a) homo analogues of proteinogenic amino acids, (b) β -homo analogues of proteinogenic amino acid residues and (c) further non-proteinogenic amino acid residues.

Accordingly, the amino acid residues are derived from the corresponding amino acids, *e.g.*,
30 from

31

proteinogenic amino acids, namely Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr and Val; or

non-proteinogenic amino acids, such as homo analogues of proteinogenic amino acids wherein the side chain has been extended by a methylene group, *e.g.*, homoalanine (Hal), homoarginine (Har), homocysteine (Hcy), homoglutamine (Hgl), homohistidine (Hhi), homoisoleucine (Hil), homoleucine (Hle), homolysine (Hly), homomethionine (Hme), homophenylalanine (Hph), homoproline (Hpr), homoserine (Hse), homothreonine (Hth), homotryptophane (Htr), homotyrosine (Hty) and homovaline (Hva);

10

β -homoanalogues of proteinogenic amino acids wherein a methylene group has been inserted between the α -carbon and the carboxyl group yielding β -amino acids, *e.g.*, β -homoalanine (β Hal), β -homoarginine (β Har), β -homoasparagine (β Has), β -homocysteine (β Hcy), β -homoglutamine (β Hgl), β -homohistidine (β Hhi), β -homoisoleucine (β Hil), β -homoleucine (β Hle), β -homolysine (β Hly), β -homomethionine (β Hme), β -homophenylalanine (β Hph), β -homoproline (β Hpr), β -homoserine (β Hse), β -homothreonine (β Hth), β -homotryptophane (β Htr), β -homotyrosine (β Hty) and β -homovaline (β Hva);

15

further non-proteinogenic amino acids, *e.g.*, α -aminoadipic acid (Aad), β -aminoadipic acid (β Aad), α -aminobutyric acid (Abu), α -aminoisobutyric acid (Aib), β alanine (β Ala), 4-aminobutyric acid (4-Abu), 5-aminovaleric acid (5-Ava), 6-aminohexanoic acid (6-Ahx), 8-aminooctanoic acid (8-Aoc), 9-aminononanoic acid (9-Anc), 10-aminodecanoic acid (10-Adc), 12-aminododecanoic acid (12-Ado), α -aminosuberic acid (Asu), azetidine-2-carboxylic acid (Aze), β -cyclohexylalanine (Cha), citrulline (Cit), dehydroalanine (Dha), γ -carboxyglutamic acid (Gla), α -cyclohexylglycine (Chg), propargylglycine (Pra), pyroglutamic acid (Glp), α -tert-butylglycine (Tle), 4-benzoylphenylalanine (Bpa), δ -hydroxylysine (Hyl), 4-hydroxyproline (Hyp), allo-isoleucine (alle), lanthionine (Lan), (1-naphthyl)alanine (1-Nal), (2-naphthyl)alanine (2-Nal), norleucine (Nle), norvaline (Nva), ornithine (Orn), phenylglycin (Phg), pipecolic acid (Pip), sarcosine (Sar), selenocysteine (Sec), statine (Sta), β -thienylalanine (Thi), 1,2,3,4-tetrahydroisochinoline-3-carboxylic acid (Tic), allo-threonine (aThr), thiazolidine-4-carboxylic acid (Thz), γ -aminobutyric acid (GABA), iso-cysteine (iso-

20

25

30

Cys), diaminopropionic acid (Dpr), 2,4-diaminobutyric acid (Dab), 3,4-diaminobutyric acid ($\gamma\beta$ Dab), biphenylalanine (Bip), phenylalanine substituted in para-position with -C₁-C₅-alkyl, -halide, -NH₂, -CO₂H or Phe(4-R) (wherein R = -C₁-C₆-alkyl, -halide, -NH₂, or -CO₂H); peptide nucleic acids (PNA, *cf.*, P.E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.*, 32, 624-30); or their N-alkylated analogues, such as their N-methylated analogues.

Cyclic amino acids may be proteinogenic or non-proteinogenic, such as Pro, Aze, Glp, Hyp, Pip, Tic and Thz.

- 10 For further examples and details reference can be made to, *e.g.*, J.H. Jones, *J. Peptide Sci.*, 2003, 9, 1-8 the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the terms "non-proteinogenic amino acid" and "non-proteinogenic amino acid residue" also encompass derivatives of proteinogenic amino acids. For example, the side chain of a proteinogenic amino acid residue may be derivatized thereby rendering the proteinogenic amino acid residue "non-proteinogenic". The same applies to derivatives of the C-terminus and/or the N-terminus of a proteinogenic amino acid residue terminating the amino acid sequence.

- 20 As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, a proteinogenic amino acid residue is derived from a proteinogenic amino acid selected from the group consisting of Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr and Val either in L- or D-configuration; the second chiral center in Thr and Ile may have either R- or S-configuration. Therefore, for example, any posttranslational modification of an amino acid sequence, such as N-alkylation, which might naturally occur renders the corresponding modified amino acid residue "non-proteinogenic", although in nature said amino acid residue is incorporated in a protein. Preferably modified amino acids are selected from N-alkylated amino acids, β -amino acids, γ -amino acids, lanthionines, dehydro amino acids, and amino acids with alkylated guanidine moieties.

32

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "carboxylic acid" or "dicarboxylic acid" means organic compounds having one COOH moiety or two COOH moieties, respectively, such as for example, formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid, cyclohexane carboxylic acid, benzoic acid, salicyl acid, lactic acid (carboxylic acids) or oxalic acid, malonic acid, succinic acid, adipic acid, fumaric acid, maleic acid, malic acid, phthalic acid (dicarboxylic acids), respectively.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "diamine" means organic compounds having two NR'R" moieties, wherein R' and R" may independently from each other be alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl. Diamines may for example be ethylenediamine, 1,4-cyclohexane diamine, piperazine.

As far as hereinbefore amino acids, carboxylic acids, dicarboxylic acids or diamines are referred to, this also specifically includes the respective radicals obtained when such amino acids, carboxylic acids, dicarboxylic acids or diamines, respectively, are comprised in the compounds of the invention, *i.e.*, -HN-...-CO- (amino acid), -OC-... (carboxylic acid), -OC-...-CO- (dicarboxylic acid), -HN-...-NH- (diamine), for example.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "metal chelator" is defined as a molecule that complexes a radionuclide metal to form a metal complex that is stable under physiological conditions and which may also be conjugated with a targeting group through a spacer. The metal chelator is complexed or not complexed with a metal radionuclide.

As used hereinafter in the description of the invention and in the claims; the wording "radionuclide metal" is defined as a radionuclide which is an atom with an unstable nucleus, the nucleus being characterized by excess energy which is available to be imparted either to a newly-created radiation particle within the nucleus, or else to an atomic electron (see internal conversion). The radionuclide metals used herein are especially suitable for diagnostic or therapeutic use, more preferably for imaging or radiotherapy. The radionuclide, in this process, undergoes radioactive decay, and emits (a) gamma ray(s) and/or subatomic particles.

These particles constitute ionizing radiation. Radionuclides may occur naturally, but can also be artificially produced.

These radionuclide metals include, but are not limited to gallium (e.g., ^{67}Ga , ^{68}Ga) copper (e.g., ^{67}Cu and ^{64}Cu); technetium (e.g., $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and $^{94\text{m}}\text{Tc}$); rhenium (e.g., ^{186}Re and ^{188}Re); lead (e.g., ^{212}Pb); bismuth (e.g., ^{212}Bi); and palladium (e.g., ^{109}Pd). Methods for preparing these isotopes are known. Molybdenum/technetium generators for producing $^{99\text{m}}\text{Tc}$ are commercially available. Procedures for producing ^{186}Re include the procedures described by Deutsch *et al.*, (*Nucl. Med. Biol.*, Vol. 13:4:465-477, 1986) and Vanderheyden *et al.* (10 *Inorganic Chemistry*, Vol. 24:1666-1673, 1985), and methods for the production of ^{188}Re have been described by Blachot *et al.* (*Intl. J. of Applied Radiation and Isotopes*, Vol. 20:467-470, 1969) and by Klofutar *et al.* (*J. of Radioanalytical Chem*, Vol. 5:3-10, 1970). Production of ^{212}Pd is described in Fawwaz *et al.*, *J. Nucl. Med.*, (1984), 25:796. Production of ^{212}Pb and ^{212}Bi is described in Gansow *et al.*, *Amer. Chem. Soc. Symp.*, Ser. (1984), 241:215-217, and 15 Kozah *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, (January 1986), 83:474-478. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ is preferred for diagnostic use, and the other radionuclides listed above have therapeutic use.

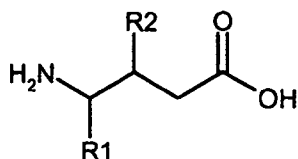
As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "spacer" is defined as a linking group between the metal chelator and the bombesin peptide antagonists.

20 As used hereinafter in the description of the invention and in the claims; the wording "agonist" means a substance (ligand) which binds to a specific site at a receptor molecule of a cell and thus activates signal transduction in the cell. This leads to a measurable effect.

25 As used hereinafter in the description of the invention and in the claims; the wording "antagonist" means a substance (ligand) which binds to a site at receptor cell which is specific to an agonist substance, thus blocking this site to the agonist, without actuating an effect. Thus the antagonist inhibits the effect of the agonist.

30 As used hereinafter in the description of the invention and in the claims, the term "statine analog" is defined as a di-peptidic mimetic with the following generic structure

39

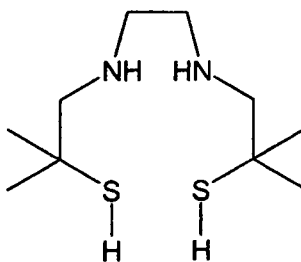
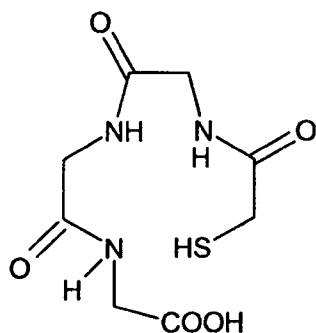
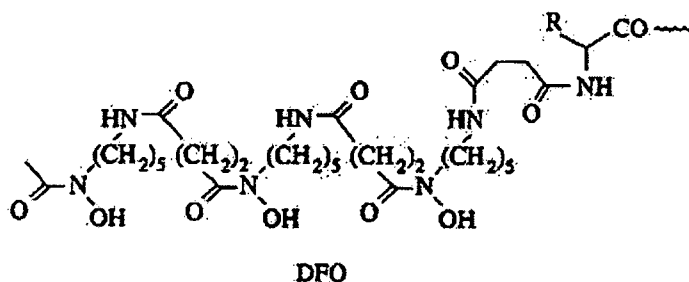


Statine R2 = OH, R1 can be varied significantly but typically are the same as amino acid side chains

Statine Analogs R2 = H, R1 can be varied significantly but typically are the same as amino acid side chains

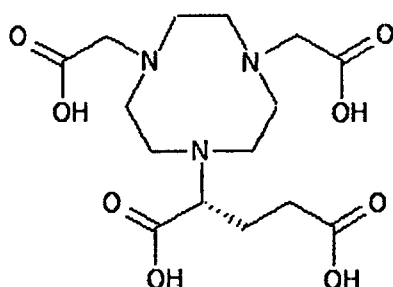
Abbreviations:

- 5 NODASA = 1,4,7-TRIAZACYCLONONANE-1-SUCCINIC ACID-4,7-DIACETIC ACID
 NODAGA = 1,4,7-triazacyclononane-N-glutaric acid-N',N''-diacetic acid
 TRITA = 1,4,7,10 tetraazacyclotridecane-1,4,7,10 N, N', N'', N'''-tetraacetic acid
 Cpa = (S)-4-carboxamidophenylalanine
 4-Am-5-MeHpA = 4-amino-5-methylheptanoic acid
 10 4-Am-5-MeHxA = 4-amino-5-methylhexanoic acid
 DFO = N'-[5-(acetyl-hydroxy-amino)pentyl]-N-[5-[3-(5-aminopentyl-hydroxy-carbamoyl)propanoylamino]pentyl]-N-hydroxy-butanediamide



triamide monothiol (MAG3)

bisamine bis thiol (BAT)



NODAGA

5

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent. The following preferred specific embodiments are, therefore, to be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure in any way whatsoever.

10

FIGURES

Fig. 1: Dose-response curves of bombesin analogues determined by the calcium release assay. The calcium release assay was performed as described in Materials and Methods. PC3 cells were treated either with bombesin at concentrations ranging between 0.01 nmol/L and 10 μ mol/L (•) alone, or in the presence of 10 μ mol/L of the bombesin analogues Compound 1 (▲), or In-Compound 1 (◆), or bombesin analogues Compound 1a (■). Compound 1, Tested alone at 1 μ mol/L and 10 μ mol/L Compound 1 (△), In-Compound 1 (×) and compound 1a (□) have no effect on calcium release in PC3 cells. Compound 1a refers to binding sequence of 1, without the linker and chelate (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂).

15

20

Compound 1 refers to chelate (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂). In-Compound 1 refers to In-chelated (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂).

Fig. 2: HEK-GRPR cells immunofluorescence microscopy

Immunofluorescence microscopy of Compound 1, In-Compound 1, Compound 1b and GRPR-ANTAG using the mouse monoclonal HA-epitope antibody and HEK-GRPR cells. (a) no peptide, (b) 10 nmol/L bombesin, (c) Compound 1b, (d) Compound 1b + 10 nmol/L bombesin,

25

34

(d, f, h, j) cells treated with 10 nmol/L bombesin in the presence of 1 μ mol/L of the analogues Compound 1b, GRPR-ANTAG, Compound 1, and In-Compound 1, (c, e, g, i) cells treated with Compound 1b, GRPR-ANTAG, and Compound 1.

- 5 Fig. 3a, 3b, 4a, 4b: PET-imaging in PC-3 (3) and LNCaP (4)-tumor bearing mice of Ga-68-DOTA Compound 2. a) 1h after injection of 10 MBq radiotracer, b) blocked with 100 μ g bombesin

10 Fig. 6: SPECT/CT image of ^{99m}Tc -ARN4-06 (15 MBq/200 pmol) in PC-3-tumor bearing mice

Fig. 8: SPECT/CT image of ^{99m}Tc -ARN4-05 (15 MBq/200 pmol) in PC-3-tumor bearing mice.

Fig. 9: HPLC analysis of Ga-68-DOTA Compound 2 on a reversed phase column.

- 15 Fig. 10a, b, c, d, e: Stability assay of Ga-68-DOTA Compound 2 in mouse plasma and urine analysed by HPLC.

Fig. 11: Human serum stability of Lu-177-DOTA Compound 2.

- 20 Fig. 12: Comparison of tumor /tissue Ga-68 RM2 with F18 FDG and F18 choline

The entire disclosure[s] of all applications, patents and publications, cited herein are incorporated herein by reference in their entirety.

- 25 The following examples can be repeated with similar success by substituting the generically or specifically described reactants and/or operating conditions of this invention for those used in the preceding examples.

- 30 From the foregoing description, one skilled in the art can easily ascertain the essential characteristics of this invention and, without departing from the spirit and scope thereof, can

make various changes and modifications of the invention to adapt it to various usages and conditions.

EXAMPLES

- 5 wherein A has the meaning of A but also A' as appropriate for all examples disclosed below.

Example 1 (A-B-C)

wherein A has the meaning of A but also A' as appropriate for all examples disclosed below.

- 10 a) Synthesis of bombesin peptide antagonist conjugates with general sequence
(A = DOTA, B = Spacer B₁ – B₂, C = Peptide with N-terminal amide Z [Z = NH])

DOTA-Spacer-Xaa⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

- Peptides were synthesized manually on solid phase using Fmoc-strategy. To obtain N-terminal
15 amides, Rink amide MBHA resin LL (100-200 mesh) (4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxyacetamido-norleucyl-4-Methylbenzhydrylamine resin) was used. In general, Rink amide MBHA resin with a theoretical loading of 0.34 mmole/g resin was given to the reactor. N,N-Dimethylformamide (DMF) was added to the reactor and was shaken for 30 minutes to allow swelling of the resin. After removing the solvent, a solution of 20%
20 piperidine in DMF was added and the resin was shaken for 15 minutes to remove the 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) protecting group. This step was repeated twice. After this procedure, the resin was washed three times for 5 min with DMF. The piperidine solution and the DMF solution of the last three washings were collected and filled with ethanol to 100 mL. From this solution an aliquot was taken to determine the amount of removed Fmoc-protecting
25 groups spectrophotometrically.

- Before coupling the Fmoc-aminoacid derivative the resin was washed twice for 2 min with DMF. 2 equivalents of Fmoc-aminoacids, preactivated with 2 equivalents of N,N-Diisopropylcarbodiimide (DIC) / N-Hydroxybenzotriazole (HOBt) were added to the resin and
30 the pH was adjusted to a value of 8-9 by adding about 4 equivalents of N-Ethyldiisopropylamine (DIPEA). The reaction was incubated for 2h under gentle shaking.

After the reaction, the solution was removed and the solid phase was washed twice for 5 min with DMF. The reaction was monitored by Kaiser-test. A certain amount of beads of the resin were washed 3 times with ethanol, 50 μ L of the solution 1 (20 g phenol in 10 mL ethanol were mixed with 1 mL of a solution of 0.01 M KCN in 49 mL pyridine) and 50 μ L of solution 2 (500 g ninhydrine in 10 mL ethanol) were added and the beads were heated for 10 min at 95°C. Blue beads indicated uncoupled free amino functions.

All amino acids were used as *N*-terminal Fmoc-protected derivatives and they were coupled in a similar manner. Tryptophan was used with *tert*-butoxycarbonyl (Boc) protecting group on the side chain while histidine and glutamine were Trt protected. If Kaiser test performed after coupling of each amino acids, indicated incomplete coupling of amino functions, the coupling was repeated.

After building of the whole desired peptide sequence, the resin was washed 5 times with DCM followed by 5 times washing with diethyl ether, each for 2 minutes and dried under vacuum.

b) Coupling with SPACER and prochelator DOTA(^tBu)₃

The prochelator DOTA(^tBu)₃ was purchased from Macrocyclics Inc., Dallas, USA. Prior to coupling the SPACER, the *N*-terminal Fmoc-protection was removed from the resin bound peptides. The resin was swelled for 15 min in DMF, treated twice with a solution of 20% piperidine in DMF (15 min) and washed three times with DMF. The solution from the piperidine treatments and the following DMF washings were collected to determine the amount of cleaved Fmoc groups.

2 equivalents of the SPACER, preactivated with 2-(1H-9-Azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-aminium hexafluorophosphate (HATU) for 20 min in DMF, were added to the resin. The pH was adjusted to 8-9 by adding DIPEA. The reaction mixture was shaken for 2 h and the coupling was monitored by Kaiser test. The prochelator DOTA(^tBu)₃ was coupled in the same manner after removal of Fmoc as previously described. The DOTA(^tBu)₃ coupling

was shaken overnight. After removing the solution, the resin was washed 3 times with DMF, 5 times with DCM followed by 5 times washing with diethyl ether, each for 2 minutes and dried under vacuum.

5 c) Deprotection, cleavage and purification

The peptide-resin was taken in a syringe equipped with a frit. A solution of trifluoroacetic acid (TFA)/Thioanisol (TA)/Triisopropylsilane (TIS)/H₂O (94/2/2/1) was added and the syringe was agitated for 2h. The solution was added to a mixture of 50% diisopropylether and 50% diethylether on ice to allow the precipitation of the peptide. The peptide was collected by centrifugation at 3000 rpm for 5 min and the supernatant was decanted. The precipitate was washed several times with diethylether and dried under vacuum. The crude product was dissolved in water and purified by semi-preparative RP-HPLC on a Metrohm HPLC system LC-CaDI 22-14 (Herisau, Switzerland) with a Macherey-Nagel VP 250/21 Nucleosil 100-5 C₁₈ column (eluent 1 = 0.1% TFA in water and eluent 2 = acetonitrile; gradient: 0-20 min, 90%-50% eluent 1; flow: 15 mL/min).

The conjugates were analyzed by analytical RP-HPLC and characterized by mass spectroscopy (ESI-MS).

20 A-B-C-1

DOTA-Spacer-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-ZH (Z = NH)

Compound 1: A = DOTA, B₁ = Gly, B₂ = 4-aminobenzoyl; Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu,

25 DOTA-Gly-aminobenzoyl-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₈₀H₁₁₄N₂₀O₂₀, calculated (m/z): 1675.8, found [M+K]⁺: 1715.1.

Compound 2: A = DOTA, B₁ = 4-amino-1-carboxymethyl-piperidinyl; B₂ = none, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

30 DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₉H₁₁₈N₂₀O₁₉; calculated (m/z): 1639.9, found [M+K]⁺: 1678.1

Compound 3: **A** = DOTA, **B**₁ = 4-amino-1-piperidine-4-carboxy; **B**₂ = none, Xaa₁ = DPhe;

Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-4-amino-1-piperidine-4-carboxylic acid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

5 C₇₇H₁₁₆N₂₀O₁₉, calculated (m/z): 1624.9, found [M+K]⁺: 1663.7

Compound 4: **A** = DOTA, **B**₁ = 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl; **B**₂ = none, Xaa₁ =

DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-

10 Leu-NH₂; C₈₂H₁₂₇N₁₉O₂₃, calculated (m/z): 1747.8, found [M+K]⁺: 1785.1

Compound 5: **A** = DOTA, **B**₁ = 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl; **B**₂ = 4-amino-1-piperidine-4-carboxy, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-(15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid)-(4-amino-1-carboxymethyl-

15 piperidine)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₈₉H₁₃₉N₂₁O₂₄, calculated (m/z): 1886.0, found [M+K]⁺: 1924.9

Compound 6: **A** = DOTA, **B**₁ = diaminobutyric acid; **B**₂ = none, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly;

Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

20 DOTA-diaminobutyric acid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₅H₁₁₄N₂₀O₁₉, calculated (m/z): 1598.9, found [M+K]⁺: 1638.4

Compound 7: **A** = DOTA, **B**₁ = 4-(2-aminoethyl)-1-carboxymethyl-piperazinyl; **B**₂ = none,

Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

25 DOTA-4-(2-aminoethyl)-1-carboxymethyl-piperazine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₉H₁₂₁N₂₁O₁₉, calculated (m/z): 1667.9, found [M+Na]⁺: 1691.2

Compound 8: **A** = DOTA, **B**₁ = (5-amino-3-oxa-pentyl)-succinamic acid; **B**₂ = none, Xaa₁ =

DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

30 DOTA-(5-amino-3-oxa-pentyl)-succinamic acid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

37

Example 2 (A-B-C)

a) Synthesis of bombesin peptide antagonist conjugates with general sequence

(A = N₄-azido, B = Spacer B₁ – B₂, C = Peptide with N-terminal amide Z [Z = NH₂])

5

N₄-triazoles-dPEG₁-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

a) Synthesis of the peptides: Fmoc-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

10 Peptides were synthesized manually on solid phase using Fmoc-strategy. To obtain *N*-terminal amides, Rink amide MBHA resin LL (100-200 mesh) was used. The synthesis was performed as described in the Example 1.

b) Coupling with the alkyl group propargyl-dPEG₁-NHS-ester

15

Prior to coupling with the alkyl group, the *N*-terminal Fmoc-protection was removed from the resin bound peptides. The resin was swelled for 15 min in DMF, treated twice with a solution of 20% piperidine in DMF (15 min) and washed three times with DMF. The solution from the piperidine treatment and the following DMF washings were collected for Fmoc determination.

20

2 equivalents of the propargyl-dPEG₁-NHS-ester were added to the resin. The pH was adjusted to 8-9 by adding DIPEA. The reaction mixture was shaken for 24 h and the coupling was monitored by Kaiser test.

25 c) Deprotection, cleavage and purification

The peptide-resin was taken in a syringe equipped with a frit. A solution of TFA/TIS/H₂O (94/2.5/2.5) was added and the syringe was agitated for 2h. The solution was added to a mixture of 50% diisopropylether and 50% diethylether on ice to allow the precipitation of the peptide. The peptide was collected by centrifugation at 3000 rpm for 5 min and the supernatant was decanted. The precipitate was washed several times with diethylether and

30

dried under vacuum. The crude product was dissolved in water and purified by semi-preparative RP-HPLC as described before.

The conjugates were analyzed by analytical RP-HPLC and characterized by mass spectroscopy (ESI-MS).

d) Synthesis of N₄-azido chelator. The synthesis involves 3 steps.

i) Synthesis of *N,N',N'',N'''*-tetrakis(*tert*-butoxycabonyl)-6-(azido)-1,4,8,11-tetraazaundecane (N₄(Boc)₄-N₃) [3]:

a) *N,N',N'',N'''*-tetrakis(*tert*-butoxycabonyl)-6-(hydroxy)-1,4,8,11-tetraazaundecane (N₄(Boc)₄-OH) [1]: A solution of 6-(hydroxy)-1,4,8,11-tetraazaundecane (1 g, 3.1 mmol) in DMF (10 mL) was cooled to 0 °C. To this was added a solution of Di-*tert*-butyldicarbonate (3.32 mL, 15.5 mmol) in DMF (5 mL) followed by DIPEA (2.7 mL, 15.5 mmol). The reaction mixture was then stirred at room temperature for 18h. After this reaction time, the reaction mixture was partitioned between water and ethyl acetate. The aqueous layer was extracted thrice with ethyl acetate and the combined ethyl acetate phase was washed with sodium chloride solution and dried over anhydrous sodium sulfate. Filtration and evaporation of the solvent under reduced pressure yielded the title compound in 86% yield.

ii) *N,N',N'',N'''*-tetrakis(*tert*-butoxycabonyl)-6-(*O*-methyl sulfonyl)-1,4,8,11-tetraazaundecane (N₄(Boc)₄-O-SO₂CH₃) [2]:

To a solution of 1 (300 mg, 0.54 mmol) in pyridine (3 mL) was added methylsulfonyl chloride (84 µL, 1.08 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature till it was completed as monitored by TLC. The solvent was evaporated under reduced pressure, the residue was taken into ethyl acetate. The ethyl acetate was washed thrice with 10% NaHCO₃ and water and dried over anhydrous sodium sulfate. Filtration and evaporation of the solvent under reduced pressure yielded the crude product, which was further purified by silica gel column chromatography to yield title compound in 84%.

iii) *N,N',N'',N'''*-tetrakis(*tert*-butyloxycabonyl)-6-(azido)-1,4,8,11-tetraazaundecane ($N_4(\text{Boc})_4\text{-N}_3$) [3]:

5 A suspension of **2** (250 mg, 0.38 mmol) and sodium azide (100 mg, 1.52 mmol) in DMF (3 mL) was stirred at 75 °C for 5h. Later the reaction mixture was stirred at room temperature for 18h. The reaction mixture was then portioned between water and ethyl acetate. The aqueous layer was extracted thrice with ethyl acetate and the combined ethyl acetate was washed with sodium chloride solution and dried over anhydrous sodium sulfate. Filtration and evaporation
10 of the solvent under reduced pressure yielded crude product, which was then purified by column chromatography. (yield 88%).

d) Coupling in solution

15 The peptide (6.2 mg, 5 μM) with terminal alkyl group and **3** (3 mg, 5 μM) were dissolved in a 1:1 mixture of water and *tert*-butyl alcohol (1 mL). Copper powder (10 mg) was added followed by 0.1 M aqueous copper(II) sulfate pentahydrate (60 μL , 6 μM , 1.2 equiv) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The copper powder was filtered off, the solvent removed under reduced pressure. The crude peptide was purified by semi-
20 preparative RP-HPLC.

The chelator-peptide conjugate was treated with TFA:TIS:H₂O (95:2:3) for 2h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was titrated with diethyl ether and purified by semi-preparative RP-HPLC as described before.

25

The conjugates were analyzed by analytical RP-HPLC and characterized by mass spectroscopy (ESI-MS).

Compound 14: **A** = N_4 -azido, **B**₁ = propargyl-dPEG₁-NHS-ester; **B**₂ = none, Xaa₁ = DPhe;

30 Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

N₄-triazoles-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₆₈H₁₀₅N₂₁O₁₃, calculated (m/z): 1424.7, found [M+H]⁺: 1425.5

Example 3 (A-B-C2)

5

DOTA-Spacer-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₂-CH₃

All the pseudopeptides were synthesized in solution phase by condensation of the heptapeptide Fmoc-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Xaa₂-His-OH with the modified aminoacid H-Leuψ(CHOH)-
10 (CH₂)₃-CH₃.

a) Synthesis of the heptapeptide Fmoc-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Xaa₂-His-OH

Peptides were synthesized manually on 2-chlorotrityl chloride resin using Fmoc strategy. In
15 general, 2-chlorotrityl chloride resin with a theoretical loading of 1.4 mmole/g resin was given to the reactor. The resin was swelled in DCM for 30 min and the first amino acid was coupled by adding 1 equivalent of amino acid, mixed with 4-fold molar excess of DIPEA in DCM. The coupling reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h and then the resin was washed twice with a mixture of DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1), twice with DCM and finally
20 swelled in DMF. The Fmoc was deprotected using 20% of piperidine in DMF and the amount of removed Fmoc-protecting group was determined spectrophotometrically at 300 nm. The next amino acid was coupled by adding 2-fold molar excess of amino acid, mixed with equimolar amounts of DIC/HOBt, and 4-fold molar excess of DIPEA in DMF. The resin was agitated at room temperature for 2h and the coupling was monitored by Kaiser ninhydrin test.
25 Each amino acid was coupled using the same strategy.

b) Coupling with SPACER and prochelator DOTA (tBu)₃

The couplings were performed as described above.

c) Cleavage and purification

The fully protected peptides were cleaved from the solid support by suspending the resin in a mixture of TFA/TIS/DCM (1/5/94). Several times were drawn up a volume of 5 mL of the
5 cleaving solution with the syringe, incubated 10 min and the cleaved fractions were collected in a 50 mL flask. After all the fractions were collected 3X10 mL of toluene were added into the flask, the solvents were evaporated and the product was dried afterwards for 1 h at the oil pump vacuum.

10 d) Synthesis of Boc-Leu ψ -(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃. The synthesis involves three steps.i) Synthesis of Boc-Leu-N(OCH₃)CH₃

Boc-Leu-OH (1 g, 4.3 mmol) was dissolved in DCM (30 mL) and 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-
15 1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU)(1.380 g, 4.3 mmol), HOBt (0.581 g, 4.3 mmol) and DIPEA (743 μ L, 4.3 mmol) were added at 0°C. After 5 min of stirring, O,N-dimethylhydroxylamine hydrochloride (0.461 g, 4.73 mmol) and DIPEA (817 μ L, 4.73 mmol) were added. All solid material dissolved within 10 min and the mixture was stirred overnight at RT. The solvent was evaporated, the reaction mixture redissolved in AcOEt and washed
20 with H₂O, 5% citric acid, H₂O, 5% aqueous NaHCO₃ solution, saturated NaCl solution several times. The solution was dried over MgSO₄ and the solvent removed *in vacuo*. The desired compound was purified by silica gel column chromatography. ESI-MS: calcd. 269; found 292 [M + Na]⁺.

25 ii) Synthesis of Boc-Leu-(CH₂)₃-CH₃

Magnesium (0.330 g, 13.6 mmol) was activated by suspending in toluene for 30 min under N₂. The toluene was removed and the Mg was dried under N₂. To the suspension of Mg in THF
(20 mL) was added bromobutane (1.46 mL, 13.6 mmol) dropwise and the mixture was heated
30 at reflux. When all the magnesium was dissolved, Boc-Leu-N(OCH₃)CH₃ in THF was added dropwise and the reaction was stirred for 2h at 0°C. 1M HCl (150 mL) was added followed by

ethylacetate (100 mL). The organic layer was washed with 1M potassium hydrogen sulfate, water, dried (Na_2SO_4) and concentrated in vacuum. The expected product was purified by silica gel column chromatography. The product was characterized by ^1H -NMR and ^{13}C -NMR. ESI-MS: calcd. 271; found 293.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

5

iii) Synthesis of Boc-Leu ψ -(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃

To a solution of Boc-Leu-(CH₂)₃-CH₃ (0.190 g, 0.7 mmol) in methanol (5 mL) NaBH₄ (0.104 g, 2.8 mmol) was added. The reaction mixture was further stirred for 1h, then neutralized with acetic acid and the solvent was removed under reduced pressure. The expected product was precipitated with a saturated bicarbonate solution. The peptide was collected by filtration, washed with water, hexane and dried. The product was characterized by ^1H -NMR and ^{13}C -NMR. ESI-MS: calcd. 272; found 273 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 547.7 $[2\text{M} + \text{H}]^+$.

15 iv) Coupling in solution

Boc-Leu ψ -(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃ was deprotected using a solution of 80% TFA in DCM. After 1h the solution was concentrated, washed several time with DCM and dried.

The chelator-spacer-peptide was dissolved in DMF, HATU (1.2 equivalents) was added and the mixture was stirred for 1h. H-Leu ψ -(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃ was dissolved in DMF and added to the peptide. The pH was adjusted to 8 using DIPEA and the reaction was stirred for 4h at RT.

The solvent was concentrated and the peptide, fully protected, was obtained by precipitation with H₂O on ice. The crude peptide was precipitated, cooled, centrifuged and separated from the solvent by decantation. In order to get the peptide fully deprotected it was solubilized in a mixture of DCM/TFA/TIS/H₂O 10/85/2.5/2.5. After 4h the solution was concentrated and the peptide was precipitated using a mixture of 50% diethyl ether and 50% diisopropylether on ice. The peptide was then collected by centrifugation at 3000 rpm for 5 min and the supernatant was decanted. The precipitate was washed several times with diethylether and the crude

40

product was kept then at a vacuum overnight to remove the remaining solvents. The crude product was dissolved in water and purified by preparative as describe earlier.

The conjugates were analyzed by analytical RP-HPLC and characterized by mass
5 spectroscopy (ESI-MS).

Compound 9: A = DOTA, B₁ = 4-amino-1-carboxymethyl-piperidine; B₂ = none, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly;

DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-
10 (CH₂)₂-CH₃, C₇₄H₁₁₂N₁₈O₁₇, calculated (m/z): 1524.8, found [M+K]⁺: 1564.3

Compound 10: A = DOTA, B₁ = 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl; B₂ = 4-amino-1-carboxymethyl-piperidine, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly;

DOTA-PEG₄-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-
15 Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃; C₈₆H₁₃₅N₁₉O₂₂, calculated (m/z): 1786.9, found [M+K]⁺: 1811.1

Compound 11: A = DOTA, B₁ = 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl; B₂ = none, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly;

20 DOTA-PEG₄-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃
C₇₈H₁₂₁N₁₇O₂₁, calculated (m/z): 1632.8, found [M+K]⁺: 1672.2

Example 4 (A-B-C-3)

25 DOTA-Spacer-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-NH₂

Synthesis of bombesin conjugates with general sequence: DOTA-Spacer-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

30 a) Synthesis of the peptide: Fmoc-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

Peptides were synthesized manually on MBHA resin LL (100-200 mesh) HCl using Boc strategy. In general, MBHA resin with a theoretical loading of 0.59 mmol/g was given to the reactor and it was swelled in DCM for 30 min. The resin was treated 3 times (10 min) with a solution of 10% DIPEA in DCM. The first coupling of the Boc-Leuψ(CH₂NH)-Phe-OH was achieved using 2 equivalent of Boc-amino acid activated with 2 equivalents of HOEt and 2 equivalents of DIC. The coupling reaction mixture was stirred at room temperature for 2h and the reaction was monitored with the Kaiser ninhydrin test. The Boc was deprotected using 30% of TFA in DCM and this step was repeated twice. The resin was, then, treated with a solution of 10% DIPEA in DCM and the couplings were performed as described above.

(H-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂: C₅₆H₇₆N₁₄O₉, calculated (m/z): 1089.3, found [M+H]⁺: 1089.8

b) Coupling with SPACER and prochelator DOTA (tBu)₃

The couplings were performed as described above.

c) Deprotection, cleavage and purification

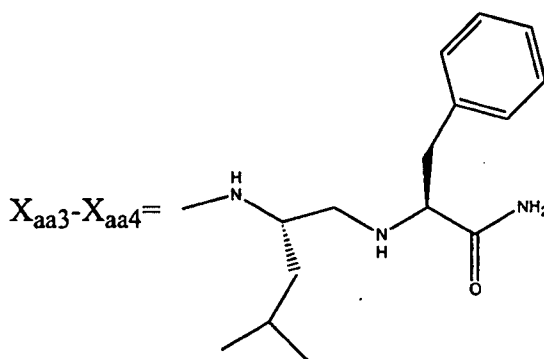
20

The peptide was treated with TFA (1 mL) and TIS (30 μL) and the mixture stirred at room temperature for 5 min. The mixture was then cooled in ice bath and trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA) (100 μL) added dropwise with stirring. The flask was sealed with a stopper and the mixture stirred at room temperature for 2 h. The volume was reduced under vacuum and the peptide was precipitated adding cold diethyl ether. The precipitate was washed several times with diethylether and the crude product was dried under vacuum. The crude product was dissolved in water and purified by HPLC preparative as describe above.

The conjugates were analyzed by analytical RP-HPLC and characterized by mass spectroscopy (ESI-MS).

d/1

Compound 12: A = DOTA, B₁ = 4-amino-1-carboxymethyl-piperidine; B₂ = none, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Leuψ(CH₂NH); Xaa₄ = Phe



5

DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

C₇₉H₁₁₄N₂₀O₁₇, calculated (m/z): 1615.9, found [M+K]⁺: 1654.9

- 10 Synthesis of bombesin conjugates with general sequence: DOTA-Spacer-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂

a) Synthesis of the peptide: Fmoc-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂

15

Peptides were synthesized manually by solid phase on MBHA resin (0.59 mmol/g) using Boc-strategy. Boc-Cys(4-MeOBzl)-OH (2.5 eq.) was coupled to the resin using DIC (2.5 eq.) and HOBt (2.5 eq.) as activating reagent. The pH was adjusted to 8 with DIPEA (5 eq.).

- 20 Introduction of reduced bond ¹³ψ¹⁴(CH₂-NH) was carried out using Boc-Leu-aldehyde (2.5 eq.) dissolved in acidified dimethylformamide. NaBH₃CN (2.5 eq.) in DMF was added slowly, in 20 min, and the reaction was stirred for 1h at RT. After the formation of a reduced peptide bond, all of the coupling reactions were performed using *N*-Boc-protected aminoacids.

b) Coupling with SPACER and prochelator DOTA (^tBu)₃

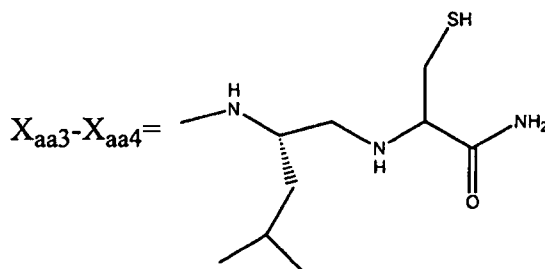
The couplings were performed as described above.

5 c) Deprotection, cleavage and purification

The deprotection, cleavage and purification were performed as described previously. The conjugates were analyzed by analytical RP-HPLC and characterized by mass spectroscopy (ESI-MS).

10

Compound 13: A = DOTA, B₁ = 4-amino-1-carboxymethyl-piperidine; B₂ = none, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Leuψ(CH₂NH)-; Xaa₄ = Cys



15

DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂; C₇₃H₁₁₀N₂₀O₁₇S, calculated (m/z): 1571.8, found [M+Na]⁺: 1593.6

Example 4

20

Radiolabeling of the synthesized conjugates (Compounds 1-13)

General procedure

To 10 μg aliquot of the chelator-bombesin peptide antagonist conjugate in water was added 1-
25 2 mCi of an aqueous solution of (¹¹¹InCl₃, ¹⁷⁷LuCl₃ or ^{67/68}GaCl₃) and 250-500 μL of 0.4M sodium acetate buffer (pH=5). This solution was heated for 30 min at 95°C and cooled to room temperature for 10 min. An aliquot of 5 μl of the reaction mixture was added to 25 μl of

d/2

Ca-DTPA solution (0.1 M, pH 5.2) and analyzed by HPLC for determining the amount of unlabeled radionuclide.

Example 5

5

Labeling of the synthesized conjugates with ^{115}In .

The complexation of the bombesin analogs with ^{nat}In was performed following the same protocol. The ^{nat}In was used in the form of $^{nat}\text{InCl}_3$ solution and in a molar ratio of 1:1.

10

Example 6 (*In vitro* assays)

Materials and Methods for the *in vitro* characterization of GRP receptor antagonists

15 Reagents and peptides

All reagents were of the best grade available and were purchased from common suppliers. The mouse monoclonal hemagglutinin (HA) epitope antibody was purchased from Covance (Berkeley, CA). The secondary antibodies Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) was from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Bombesin and the antagonist [D-Phe⁶, Leu-NHEt¹³, *des*-Met¹⁴]-bombesin(6-14) (GRPR-ANTAG) were purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). RM26, RM1b, In-RM1b, and ^{175}Lu -AMBA were provided by H.R. Mäcke (Basel, Switzerland). The Fluo-4NW Calcium Assay kit was from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR).

25 Cell lines

Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells stably expressing the HA-epitope tagged human GRP receptor (HEK-GRPR), were generated as previously described (Cescato et al., 2008) and cultured at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium with GlutaMAXTM-I (DMEM) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 750 µg/ml G418. Human prostate cancer cells (PC3 cells) were obtained from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;

30

DSMZ No: ACC465) and cultured at 37°C and 5% CO₂ in Ham's F12K containing 2 mM L-glutamine and supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. All culture reagents were from Gibco BRL (Grand Island, NY).

5 Binding-affinity measurements

The GRP receptor binding affinity of the various compounds was determined by *in vitro* receptor autoradiography on cryostat sections of either well characterized prostate carcinomas, or on sections from HEK-GRPR or PC3 cell pellets as described previously (Markwalder *et al.*, *Can. Res.*, 1999; 59, 1152-1159; Reubi *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med.*, 2000;27: 273-282; Reubi *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2002;8 1139-1146). The radioligands used were ¹²⁵I-[Tyr⁴]-bombesin, known to preferentially label GRP receptors (Vigna *et al.*, *Gastroenterology*. 1987;93: 1287-1295) and ¹²⁵I-[D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]-bombesin(6-14) as universal bombesin receptor ligand (*Gastroenterology*. 1987;93: 1287-1295).

See results in table 1.

15

Immunofluorescence microscopy

Immunofluorescence microscopy based internalization assays with HEK-GRPR cells were performed as previously described (Cescato *et al.*, 2006; Cescato *et al.*, 2008). Briefly, HEK-GRPR cells were grown on poly-D-lysine (20 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) coated 20 35 mm four-well plates (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). For the experiment, cells were treated either with 10 nM bombesin, or with 1 µM of the various bombesin analogs, or, to evaluate potential antagonism, with 10 nM bombesin in the presence of a 100-fold excess of these various analogs for 30 min at 37°C and 5% CO₂ in growth medium, and then processed for immunofluorescence microscopy using the mouse 25 monoclonal HA-epitope antibody at a dilution of 1:1,000 as first antibody and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) at a dilution of 1:600 as secondary antibody. The cells were imaged using a Leica DM RB immunofluorescence microscope and an Olympus DP10 camera.

30 GRP receptor internalization induced by bombesin is efficiently antagonized by the bombesin analogues Compound 1, In-Compound 1, Compound 1b and GRPR-ANTAG. HEK-GRPR

UB

cells were treated for 30 min either with vehicle (no peptide, a), or with 10 nmol/L bombesin (b), a concentration inducing a sub-maximal internalization effect. Panels (d, f, h, j) show cells treated with 10 nmol/L bombesin in the presence of 1 μ mol/L of the analogues Compound 1b, GRPR-ANTAG, Compound 1, and In-Compound 1. The effect of Compound 1b, GRPR-ANTAG, Compound 1, and In-Compound 1 alone at a concentration of 1 μ mol/L is shown in panels (c, e, g, i, k). Following incubation with the peptides, the cells were processed for immunocytochemistry as described in above. A clear punctate perinuclear staining is detectable for bombesin treated cells. This punctate staining is efficiently abolished by an excess of the analogues Compound 1, In-Compound 1, Compound 1b and GRPR-ANTAG. Compound-1, In-Compound 1, Compound 1b and GRPR-ANTAG given alone have no effect on GRP receptor internalization. See results in Table 1 and Fig. 2.

Calcium release assay.

Intracellular calcium release was measured in PC3 cells using the Fluo-4NW Calcium Assay kit as described previously (Magrys *et al.*, *J. Clin. Immunol.* 2007, 27, 181-192; Michel *et al.*,; Cescato *et al.*, *J. Nucl. Med.* 2008; 49: 318-326). In brief, PC3 cells were seeded (10,000 cells per well) in 96 well plates and cultured for 2 day at 37°C and 5% CO₂ in culture medium. At the day of the experiment, the cells were washed with assay buffer (1 x HBSS, 20 mM HEPES) containing 2.5 mM probenecid, and then loaded with 100 μ L/well Fluo-4NW dye in assay buffer containing 2.5 mM probenecid for 30 min at 37°C and 5% CO₂ and then for further 30 min at room temperature. To measure the intracellular calcium mobilization after stimulation with the bombesin analogues to be tested, the dye-loaded cells were transferred to a SpectraMax M2^e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Intracellular calcium mobilization was recorded in a kinetic for 60 sec at room temperature monitoring fluorescence emission at 520 nm (with λ_{ex} = 485 nm) in the presence of the analogues at the concentrations indicated. Maximum fluorescence (F-max) was measured after the addition of 25 μ M ionomycin. Baseline (F-baseline) measurements were taken for dye-loaded, untreated cells. Data are shown as percentage of maximum calcium response (F-max – F-baseline = 100 % of maximum calcium response) as reported previously (Magrys *et al.*, *J. Clin. Immunol.* 2007, 27,

181-192; Michel *et al.*, Cescato *et al.*, *J. Nucl. Med.* 2008; 49: 318-326).). All experiments were repeated at least three times in triplicate.

Fig. 1 shows that In- Compound 1 and compound 1a behave like antagonists shifting the dose-response curve of bombesin to the right in presence of bombesin (BB).

See results in Table 1 and Fig. 1.

Compound 1: DOTA-Gly-aminobenzoyl-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compound 2: DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compound 3: DOTA-4-amino-1-piperidine-4-carboxylic acid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compound 4: DOTA-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compound 5: DOTA-(15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid)-(4-amino-1-carboxymethyl-piperidine)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compound 6: DOTA-diaminobutyric acid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compound 7: DOTA-4-(2-aminoethyl)-1-carboxymethyl-piperazine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compound 8: DOTA-(5-amino-3-oxa-pentyl)-succinamic acid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compound 9: DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Compound 10: DOTA-(15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid-4-amino-1-

carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Compound 11: DOTA-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid -D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Compound 12: DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

Compound 13: DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂

44

Compound 14: N₄-triazoles-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂.

TABLE 1. *In vitro* GRP receptor binding, signaling and internalization properties of BN analogs

5

Compound	BINDING IC ₅₀ (nM) mean ± SEM	Signaling Ca ⁺⁺ mobilization	Receptor internalization
1	30 ± 4,5	ANTAG / no agonist effect	Antag / no agonist effect
¹¹⁵ In-1	16 ± 5,3	ANTAG / no agonist effect	Antag / no agonist effect
2	9,7 ± 3,8	ANTAG / no agonist effect	Antag / no agonist effect
¹¹⁵ In-2	9,3 ± 1,9	ANTAG / no agonist effect	Antag / no agonist effect
3	43 ± 14	ANTAG / no agonist effect	Antag / no agonist effect
4	21 ± 6,5	ANTAG / no agonist effect	Antag / no agonist effect
5	7,3 ± 0,6	ANTAG / no agonist effect	Antag / no agonist effect
6	7,4 ± 2,2	ANTAG / no agonist effect	Antag / no agonist effect
7	11 ± 0	NA	NA
8	19 ± 3,0	NA	NA
9	3,2 ± 1,3	ANTAG / no agonist effect	Antag / no agonist effect
¹¹⁵ In-9	2,5 ± 0,2	ANTAG / no agonist effect	Antag / no agonist effect
10	6,9 ± 0,5	ANTAG / no agonist effect	NA

Binding affinities of Compounds 1, 2 and 9 were measured after complexation with ¹¹⁵In non-radioactive isotope. The data reveals that complexation with isotope does not affect the binding affinity to the receptor as well as antagonist properties.

10

Standard methods in relevant publications:

Cescato R, Schulz S, Waser B, *et al.* Internalization of sst2, sst3 and sst5 receptors: Effects of somatostatin agonists and antagonists. *J. Nucl. Med.*, 2006;47:502-511.

Cescato R, Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, Charalambidis D, Piccand V, Reubi JC. *Bombesin Receptor Antagonists May Be Preferable to Agonists for Tumor Targeting. J. Nucl. Med.* 2008; 49:318-326.

5

Magrys, A.; Anekonda, T.; Ren, G.; Adamus, G. *The role of anti-alpha-enolase autoantibodies in pathogenicity of autoimmune-mediated retinopathy. J. Clin. Immunol.* 2007, 27, 181-192.

10 Markwalder R, Reubi JC. *Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. Cancer Res.* 1999;59:1152-1159.

Michel, N.; Ganter, K.; Venzke, S.; Bitzegeio, J.; Fackler, O. T.; Kepplet, O. T. *The Nef protein of human immunodeficiency virus is a broad-spectrum modulator of chemokine receptor cell surface levels that acts independently of classical motifs for receptor endocytosis and Galpha signaling. Mol. Biol. Cell.* 2006, 17, 3578-3590

Reubi JC, Schaer JC, Waser B, et al. *Affinity profiles for human somatostatin receptor sst1-sst5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. Eur. J. Nucl. Med.*, 2000;27:273-282.

20

Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, et al. *Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers: Detection with the Universal Radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] Bombesin(6-14). Clin. Cancer Res.*, 2002;8:1139-1146.

25

Vigna SR, Mantyh CR, Giraud AS, et al. *Localization of specific binding sites for bombesin in the canine gastrointestinal tract. Gastroenterology.* 1987;93:1287-1295.

Example 7

30

Biodistribution Experiments in PC-3 Tumor Bearing nude mice

Female nude mice were implanted subcutaneously with 10 millions PC-3 tumor cells, which were freshly expanded in a sterilized solution phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Eleven days after inoculation the mice were injected into the tail vein with 10 pmol of radiolabeled peptides (about 0.18 MBq), diluted in NaCl (0.1% bovine serum albumin, pH 7.4, total injected volume =100 μ L). For the determination of the nonspecific uptake in tumor or in receptor positive organs, a group of 4 animals was pre-injected with 0.02 μ mol of unlabeled peptide in 0.9% NaCl solution and after 5 min radiolabeled peptide was injected. At 1, 4, 24, 48, and 72 h intervals, the mice (in groups of 3-4) were sacrificed and the organs of interest were collected, rinsed of excess blood, weighed and counted in a γ -counter.

10

¹¹¹In-COMPOUND 1
¹¹¹In- DOTA-Gly-aminobenzoyl-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Injection amount:	5 μ Cl / 10 pmol / 100 μ l/mice
Blocking compound	2000 fold
Animal:	nude mice bearing PC3 tumor; 3 mice/group
Time point:	1h, 4h, 4h blocking, 24h,48h, 72 h

Organ	1h	4h	4h blocking	24 h	48 h	72 h
blood	0.86 $\pm$ 0.17	0.04 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
heart	0.28 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Liver	1.93 $\pm$ 0.29	0.38 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.08	0.19 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.02
spleen	0.57 $\pm$ 0.21	0.12 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00
lung	0.82 $\pm$ 0.13	0.12 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00
kidney	3.99 $\pm$ 0.33	1.93 $\pm$ 0.18	2.67 $\pm$ 0.10	1.01 $\pm$ 0.06	0.50 $\pm$ 0.09	0.28 $\pm$ 0.02
stomach	3.31 $\pm$ 0.63	0.76 $\pm$ 0.14	0.07 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.01
intestine	1.73 $\pm$ 0.48	0.20 $\pm$ 0.10	0.07 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
adrenal	4.14 $\pm$ 1.46	1.20 $\pm$ 0.12	0.10 $\pm$ 0.06	1.24 $\pm$ 0.16	0.38 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.04
pancreas	21.92 $\pm$ 1.34	1.32 $\pm$ 0.31	0.07 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
pituitary	7.80 $\pm$ 1.90	0.85 $\pm$ 0.45	0.11 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.19	0.03 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.07
muscle	0.19 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
bone	0.40 $\pm$ 0.10	0.18 $\pm$ 0.07	0.04 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01
tumor	14.24 $\pm$ 1.75	13.46 $\pm$ 0.80	0.46 $\pm$ 0.00	6.58 $\pm$ 1.14	2.08 $\pm$ 0.12	1.31 $\pm$ 0.23

Tumor to tissue	1 h	4h	24 h	48 h	72 h
tumor:kidney	3.6	7.0	6.5	4.2	4.7
tumor:liver	7.4	35.4	34.6	20.8	14.5
tumor:blood	16.5	336.5	658.0	1600.0	1871.4
tumor:muscle	75.0	448.7	219.3	693.3	1091.7

⁶⁸Ga-COMPOUND 1

⁶⁸Ga-DOTA-Gly-aminobenzoyl-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Animal: nude mice bearing PC3 tumor; 3 mice/group
Injection amount: 1.27 µCi / 10 pmol / 100 µl/mice
Blocking compound 3000 fold Compound 1
Time point: 1h, 1h blocking, 2h,

5

Organ	1h	1h blocking	2 h
blood	0.86±0.09	0.55±0.30	0.39±0.15
heart	0.33±0.21	0.30±0.18	0.14±0.02
Liver	1.14±0.37	1.05±0.60	0.98±0.32
spleen	1.29±0.53	0.08±0.05	0.08±0.01
lung	0.80±0.33	0.71±0.23	0.21±0.09
kidney	2.79±0.39	3.18±1.79	1.21±0.12
stomach	3.09±0.51	0.41±0.31	1.68±0.02
intestine	2.09±0.17	1.06±0.55	5.39±0.52
adrenal	3.31±0.78	0.07±0.06	0.89±0.62
pancreas	27.84±4.88	0.96±0.45	10.73±2.76
pituitary	13.35±1.32	0.28±0.08	0.22±0.00
muscle	0.26±0.08	0.07±0.05	0.20±0.02
bone	0.03±0.01	0.18±0.11	0.03±0.01
tumor	8.71±0.67	2.04±1.04	10.45±1.61

	1 h	2 h
tumor:kidney	3.13	8.64
tumor:liver	7.66	10.68
tumor:pancreas	0.31	0.97
tumor:blood	10.18	27.08
tumor:muscle	33.74	53.51

46

¹¹¹In-COMPOUND 2
¹¹¹In-DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Injection amount:	5 µCi / 10 pmol / 100 µl/mice
Blocking compound	2000 fold
Animal:	nude mice bearing PC3 tumor; 3 mice/group
Time point:	1h, 4h, 4h blocking, 24h,48h, 72 h

Organ	1h	4h	4h blocking	24 h	48 h	72 h
blood	0.77±0.28	0.05±0.04	0.13±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
heart	0.32±0.09	0.04±0.03	0.09±0.01	0.02±0.01	0.01±0.00	0.02±0.02
Liver	0.49±0.12	0.18±0.06	0.34±0.03	0.09±0.01	0.07±0.01	0.06±0.02
spleen	0.53±0.20	0.12±0.06	0.16±0.02	0.06±0.02	0.05±0.01	0.06±0.03
lung	0.70±0.30	0.10±0.07	0.19±0.01	0.04±0.03	0.11±0.24	0.04±0.02
kidney	4.78±1.11	2.14±0.73	2.98±0.20	1.25±0.16	0.91±0.09	0.74±0.18
stomach	3.15±0.78	1.07±0.15	0.12±0.02	0.06±0.02	0.03±0.01	0.05±0.01
intestine	2.11±0.47	0.25±0.15	0.11±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
adrenal	3.46±2.07	1.17±0.54	1.10±0.60	0.71±0.29	0.54±0.29	1.01±0.74
pancreas	22.64±4.71	1.55±0.48	0.10±0.00	0.32±0.09	0.19±0.04	0.19±0.02
pituitary	7.00±5.68	0.59±0.55	0.58±0.49	0.07±0.33	0.21±0.33	0.51±0.24
muscle	0.29±0.17	0.05±0.04	0.06±0.02	0.02±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01
bone	0.91±0.68	0.35±0.57	0.35±0.11	0.20±0.18	0.12±0.11	0.15±0.05
tumor	15.23±4.78	11.75±2.43	0.45±0.04	6.84±1.02	4.67±0.39	4.07±0.34

Tumor to tissue	1 h	4h	24 h	48 h	72 h
tumor:kidney	3.2	5.5	5.5	5.1	5.5
tumor:liver	30.9	64.6	74.1	67.2	63.0
tumor:blood	19.9	243.9	2744.6	3823.7	3391.2
tumor:pancreas	0.7	7.6	21.4	24.6	21.4
tumor:muscle	52.0	260.2	436.6	354.5	165.4

⁶⁸Ga-COMPOUND 2

⁶⁸Ga-DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Radioligand:
Animal:
Injection amount:
Time point:

⁶⁸Ga-COMPOUND 2
nude mice bearing PC3 tumor; 3 mice/group
1.27 µCi / 10 pmol / 100 µl/mice
1h

5

Organ	1h
blood	0.45±0.01
heart	0.19±0.02
Liver	0.41±0.04
spleen	0.36±0.01
lung	0.34±0.03
kidney	1.87±0.08
stomach	2.13±0.34
intestine	1.54±0.22
adrenal	2.48±0.48
pancreas	11.63±0.19
pituitary	0.36±0.19
muscle	0.13±0.00
bone	0.23±0.03
tumor	9.31±1.58

	1 h
tumor: kidney	4.98
tumor: liver	22.60
tumor: pancreas	0.80
tumor: blood	20.85
tumor: muscle	74.02

¹¹¹In-Compound 4

¹¹¹In-DOTA-(15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

5

Injection amount:	5 µCi / 10 pmol / 100 µl/mice
Blocking compound	2000 fold
Animal:	nude mice bearing PC3 tumor; 3 mice/group
Time point:	1h, 4h, 4h blocking, 24h,48h, 72 h

Organ	1h	4h	4h blocking	24 h
blood	0.21±0.02	0.02±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00
heart	0.08±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.00±0.00
Liver	0.22±0.01	0.09±0.01	0.09±0.01	0.03±0.01
spleen	0.18±0.10	0.07±0.02	0.04±0.01	0.01±0.00
lung	0.24±0.01	0.07±0.01	0.04±0.01	0.01±0.01
kidney	1.85±0.15	1.38±0.37	1.40±0.29	0.24±0.01
stomach	2.01±0.36	0.56±0.18	0.03±0.01	0.01±0.01
intestine	1.16±0.24	0.10±0.04	0.05±0.04	0.02±0.00
adrenal	2.18±0.93	0.86±0.17	0.07±0.06	0.59±0.16
pancreas	10.96±0.57	0.52±0.05	0.02±0.00	0.01±0.01
pituitary	4.23±1.46	0.55±0.20	0.17±0.10	0.00±0.00
muscle	0.08±0.02	0.02±0.01	0.01±0.00	0.00±0.00
bone	0.16±0.06	0.12±0.04	0.02±0.01	0.04±0.02
tumor	10.56±0.70	8.63±1.13	0.45±0.06	3.23±0.52

Tumor to tissue	1 h	4h	24 h
tumor:kidney	5.71	6.27	13.40
tumor:pancreas	0.96	16.71	345.16
tumor:blood	49.67	552.10	3457.24
tumor:muscle	140.10	349.48	808.55
tumor:bone	64.16	71.75	86.62

¹¹¹In-Compound 5

¹¹¹In-DOTA-(15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid)-(4-amino-1-carboxy-methyl-piperidine)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

5

Animal:	nude mice bearing PC3 tumor; 3~4 mice/group
Injection amount:	5 µCi / 10 pmol / 100 µl/mice
Blocking compound	2000 fold
Time point:	1h, 4h, 4h blocking, 24h

Organ	1 h	4h blocking	4 h	24 h
blood	0.75 ± 0.21	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00
heart	0.28 ± 0.06	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Liver	0.40 ± 0.09	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.05	0.11 ± 0.02
spleen	0.80 ± 0.28	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.01
lung	0.62 ± 0.15	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.19	0.51 ± 0.73
kidney	5.08 ± 0.72	1.76 ± 0.36	2.04 ± 0.15	1.37 ± 0.22
stomach	3.92 ± 1.26	0.06 ± 0.01	0.87 ± 0.58	0.05 ± 0.01
intestine	2.39 ± 0.42	0.03 ± 0.01	0.17 ± 0.10	0.05 ± 0.02
adrenal	3.63 ± 0.53	0.07 ± 0.02	0.68 ± 0.31	0.62 ± 0.16
pancreas	26.83 ± 4.34	0.06 ± 0.02	1.36 ± 0.81	0.33 ± 0.05
pituitary	9.02 ± 0.99	0.23 ± 0.14	0.38 ± 0.16	0.46 ± 0.52
muscle	0.19 ± 0.07	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
bone	0.34 ± 0.04	0.03 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02
tumor	10.27 ± 0.36	0.61 ± 0.07	9.35 ± 0.73	6.33 ± 0.76

Tumor to tissue	1 h	4h	24 h
tumor: blood	13.73	319.66	1155.51
tumor: kidney	2.02	4.59	4.62
tumor: pancreas	0.38	6.90	19.16
tumor: muscle	53.65	475.17	364.92
tumor: bone	29.93	124.55	76.65

48

¹¹¹In-Compound 9

¹¹¹In-DOTA- DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Injection amount:	5 µCi / 10 pmol / 100 µl/mice
Blocking compound	2000 fold
Animal:	nude mice bearing PC3 tumor; 3 mice/group
Time point:	1h, 4h, 4h blocking, 24h,48h, 72 h

5

Organ	1h	4h	4h blocking	24 h	48 h	72 h
blood	0.43±0.10	0.12±0.03	0.04±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
heart	0.17±0.03	0.09±0.02	0.15±0.05	0.03±0.01	0.02±0.00	0.08±0.03
Liver	0.73±0.12	0.49±0.14	0.40±0.02	0.20±0.02	0.11±0.01	0.10±0.02
spleen	1.13±0.41	0.57±0.24	0.23±0.03	0.21±0.06	0.15±0.04	0.15±0.04
lung	0.45±0.05	0.21±0.06	0.38±0.06	0.08±0.04	0.05±0.02	0.18±0.07
kidney	5.23±3.01	2.43±0.47	2.88±1.52	1.41±0.22	0.97±0.06	0.55±0.15
stomach	4.43±2.48	5.72±4.04	0.16±0.03	1.08±0.15	0.43±0.10	0.28±0.09
intestine	3.61±0.61	3.31±1.61	0.14±0.02	0.35±0.05	0.16±0.07	0.10±0.01
adrenal	10.66±2.64	5.16±1.55	1.36±0.56	2.31±0.96	2.24±1.43	1.84±0.36
pancreas	65.69±8.14	39.80±9.25	0.18±0.04	4.52±0.53	2.30±0.19	1.06±0.19
pituitary	12.63±3.26	5.54±2.07	3.72±1.62	0.71±0.37	0.56±0.24	2.56±0.28
muscle	0.22±0.06	0.14±0.04	0.13±0.07	0.05±0.01	0.03±0.01	0.08±0.04
bone	1.31±1.29	0.71±0.25	1.61±0.52	0.29±0.14	0.23±0.13	1.08±0.83
tumor	9.18±1.16	13.17±5.01	0.38±0.08	8.39±0.88	5.89±0.351	3.04±1.44

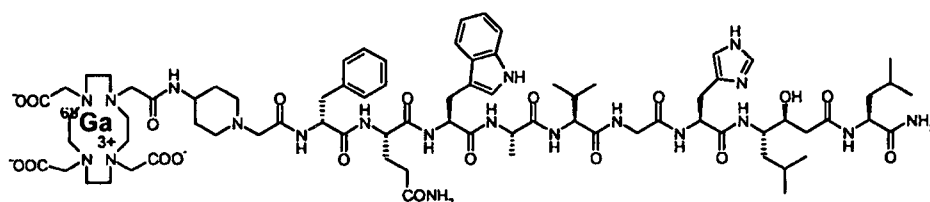
Tumor to tissue	1 h	4h	24 h	48 h	72 h
tumor:kidney	1.8	5.4	6.0	6.1	6.2
tumor:liver	12.7	26.7	42.4	53.0	35.0
tumor:blood	21.1	109.7	631.4	803.8	304.0
tumor:pancreas	0.2	0.3	1.9	2.6	2.9
tumor:muscle	42.6	94.7	169.2	191.9	42.9

Example 8

PET/CT-imaging, biodistribution experiment in PC-3 and LNCaP-tumor bearing mice of Ga-68-DOTA Compound 2, binding affinity and stability

Imaging + Biodistribution

Compound 2: DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂



Empirical Formula: C₇₈H₁₁₅N₂₀O₁₉Ga; Molecular Weight: 1704.89

Ga-68-DOTA- Compound 2 was imaged on a microPET/ CT (Inveon, Siemens) in PC-3 and LNCaP tumor-bearing mice 1h after injection of 10 MBq radiotracer. Due to the rapid renal clearance of this bombesin antagonist very low background activity was observed with only some kidney and bladder uptake. High tumor-contrast visible in both xenografts was effectively blocked by either 100 µg bombesin or non-radioactive Compound 2 itself. Bombesin receptors were successfully blocked with Bombesin leading to a critical lost of signal in tumor Fig. 3a and 3b in PC-3 tumor bearing mice + Fig. 4a and 4b LNCaP-tumor bearing mice).

Binding affinity

The binding affinity of Ga-68-DOTA- Compound 2 to the GRPr was determined via two different methods comprising receptor autoradiography on human tissues and a cellular assay using PC-3 cells. Both methods yielded high binding affinity of Compound 2 with an IC₅₀ of ~8 nM based on the non-radioactive DOTA-Compound 2 peptide.

Stability in Mouse Plasma and Microsomes

Ga-68-DOTA- Compound 2 shows good metabolic stability measured by different *in vitro* and *in vivo* methods. *In vivo* plasma stability of Ga-68-DOTA- Compound 2 was investigated in non-tumor bearing mice Mouse plasma and urine was analysed by HPLC at 1, 3, 5, 10 and 15

UP

min after intravenous injection of approx. 20 MBq of Ga-68-DOTA- Compound 2 (Fig. 10a, b, c, d, e). After some minutes, minor plasma degradation of the radiotracer was found showing two very small/ polar metabolites at 1.3 min and 1.5 min retention time which also occurred as main metabolites in the urine. The compound itself appeared with a retention time
5 of 11.6-11.7 showing a double peak starting 5 min p.i..

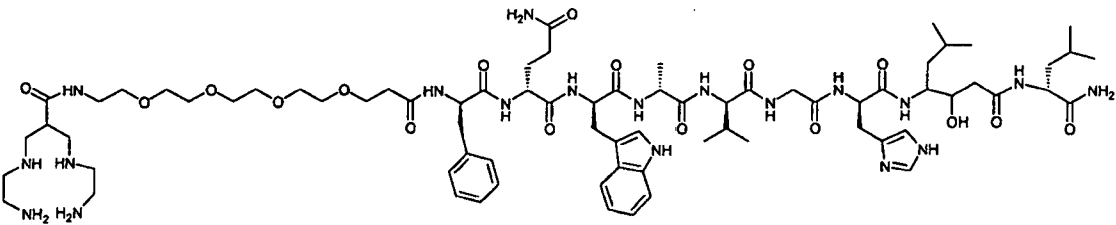
Microsomal stability of Ga-68-DOTA- Compound 2 was determined using mouse and human microsomes incubated with the radiotracer and analysed by HPLC. No degradation by mouse or human microsomes of Ga-68-DOTA- Compound 2 was found. Minor impurities detected
10 on the chromatograms also occurred without the microsomal co-factor.

Example 9

SPECT/CT-imaging and biodistribution experiment in PC-3-tumor bearing mice of ^{99m}Tc-ARN4-06

15 See experiment protocol above

Radioligand:	^{99m} Tc-ARN4-06
Animal:	nude mice bearing PC-3 tumor; 3 mice/group
Injection amount:	10 µCi / 10 pmol / 100 µl/mice
Time point:	1h, 4h and 24 h



organ	1 h	Std Dev	4 h	Std Dev	24 h	Std Dev
blood	1.32	0.07	0.33	0.05	0.04	0.01
heart	0.64	0.15	0.22	0.03	0.10	0.04
liver	6.31	1.16	3.62	1.16	1.19	0.36
spleen	3.91	0.66	1.29	0.53	0.87	0.18
lung	5.11	1.00	3.17	1.51	1.69	0.84
left kidney	6.55	0.59	2.73	0.42	1.28	0.30
stomach	8.09	1.45	5.44	1.26	0.61	0.19
intestine	8.41	2.39	2.02	0.80	0.16	0.08

adrenal	11.99	1.62	6.31	0.27	1.41	0.45
pancreas	72.50	8.98	11.18	2.89	0.41	0.20
pituitary	6.86	2.85	2.12	0.59	0.83	0.31
muscle	0.27	0.03	0.07	0.00	0.18	0.12

Radioligand: ^{99m}Tc-ARN4-05

bone	0.78	0.13	0.45	0.18	0.35	0.20
tumor	28.66	1.75	34.68	3.71	18.40	2.58
Kidney	6.26	0.48	2.84	0.49	1.24	0.32

Tumor:Organ Ratio	1 h	4 h	24 h
tumor:blood	20.79	85.11	455.94
tumor:heart	36.75	150.38	176.45
tumor:liver	4.37	9.50	15.47
tumor:spleen	7.50	20.51	21.05
tumor:lung	5.64	11.78	10.88
tumor:kidney	4.26	12.92	14.35
tumor:stomach	3.32	5.83	30.02
tumor:intestine	3.20	16.51	117.53
tumor:adrenal	2.31	2.62	13.07
tumor:pancreas	0.38	3.28	44.93
tumor:pituitary	4.43	4.40	22.14
tumor:muscle	116.82	283.06	99.65
tumor:bone	34.10	35.16	52.06
tumor:kidney	4.25	12.25	14.87

5

Figure 6 shows a SPECT/CT image of ^{99m}Tc-ARN4-06 (15 MBq/200 pmol)

Example 10

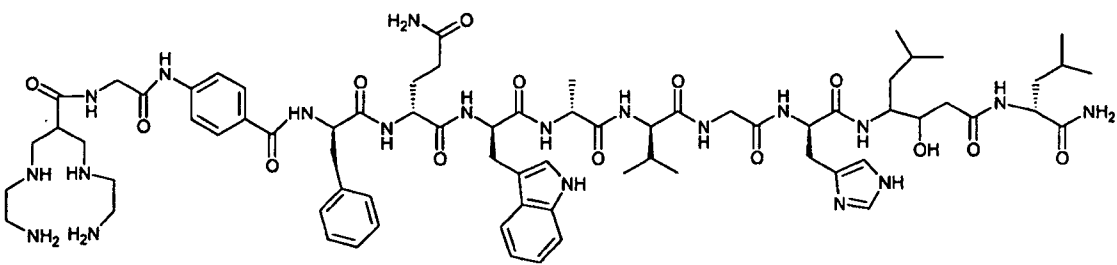
SPECT/CT-imaging and biodistribution experiment in PC-3-tumor bearing mice of ^{99m}Tc-ARN4-05

10

See experiment protocol above

30

Radioligand: ^{99m}Tc-ARN4-05
Animal: nude mice bearing PC-3 tumor; 6-9 mice/group
Injection amount: 10 µCi /10 pmol / 100 µl/mice
Time point: 1h, 4h, 24h



5

organ	1 h	Std Dev	4 h	Std Dev	24 h	Std Dev
blood	1.69	0.14	0.40	0.05	0.09	0.02
heart	0.68	0.02	0.20	0.03	0.14	0.07
liver	12.32	1.01	7.75	0.62	3.88	0.40
spleen	4.00	0.60	1.72	0.34	0.83	0.22
lung	3.11	0.47	1.24	0.41	1.15	1.47
left kidney	10.50	1.20	6.12	1.17	1.42	0.13
stomach	5.68	0.01	4.86	1.04	0.42	0.15
intestine	6.97	1.57	2.12	0.37	0.12	0.01
adrenal	19.05	3.06	7.91	2.70	2.08	0.31
pancreas	64.86	6.72	19.86	2.35	0.57	0.21
pituitary	3.67	2.03	1.15	0.11	1.53	1.33
muscle	0.43	0.16	0.08	0.02	0.11	0.04
bone	1.34	0.26	0.57	0.11	0.41	0.19
tumor	22.50	2.62	29.91	4.00	15.16	0.45

Tumor:Organ Ratio	1 h	4 h	24 h
tumor: blood	13.30	74.77	167.74
tumor: heart	33.19	149.55	105.06
tumor: liver	1.83	3.86	3.91
tumor: spleen	5.62	17.41	18.21
tumor: lung	7.24	24.11	13.21

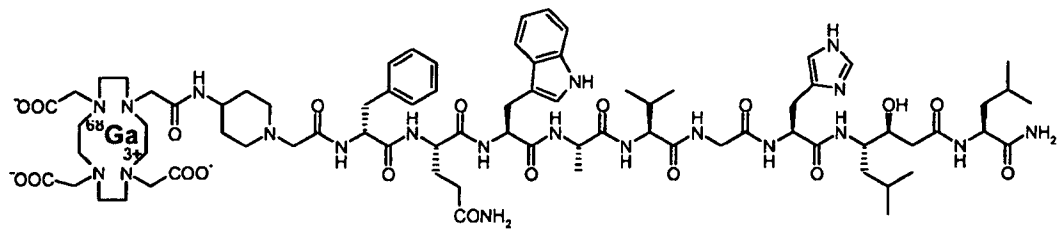
5

10

(20-40 µg)

[⁶⁸Ga]GaCl₃ , 95°C, 0.25M HEPES
Microwave, 3 X 30 sec

15



20

Radiochemical Yield (Not optimized)	79 -231 MBq (32 – 60% d.c.)
Starting Activity	189 - 593 MBq
No of labelings	10
Failures	0
Radiochemical Purity	>98% (by HPLC and ITLC)
Specific Activity	3,2 – 11.8 GBq/µmol

Figure 9 shows HPLC analysis of Ga-68-DOTA Compound 2 on a reversed phase column.

Product Purity

Column: ACE 5 μ C18 50 x 4,6mm

Solvent: Solvent A: H₂O + 0.1%TFA

5 Solvent B: MeCN + 0.1%TFA

Gradient: 5 – 95% in 7 min

Flow. 2ml/min

Example 12

10 Serum stability of Lu-177-DOTA Compound 2

Compound 2: DOTA-4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Serum stability of Lu-177-DOTA Compound 2 radiolabeled with Lu-177 was also
15 investigated in human serum. After 96h incubation of Lu-177-DOTA Compound 2
in human serum still 70% of the compound was intact as analysed by HPLC methods (Fig. 11).
To 1 mL of freshly prepared human serum, previously equilibrated in a 5% CO₂ environment
at 37°C, was added 0.03 nmol ¹⁷⁷Lu-labeled peptide standard solution. The mixture was
incubated in a 5% CO₂, 37°C environment. At different time points, 100- μ L aliquots (in
20 triplicate) were removed and treated with 200 μ L of EtOH to precipitate serum proteins.
Samples were then centrifuged for 15 min at 5000 rpm. 50 μ L of supernatant were removed
for activity counting in a γ -well counter, the sediment was washed twice with 1 mL of EtOH
and counted, and the activity in the supernatant was compared with the activity in the pellet to
give the percentage of peptides not bound to proteins or radiometal transferred to serum
25 proteins. The supernatant was analyzed with HPLC (eluent: A = 0.1% trifluoroacetic acid in
water and B = acetonitrile; gradient: 0 min 95% A; 20 minutes 50% A) to determine the
stability of the peptide in serum.

Fig. 11 shows stability of Lu-177-DOTA Compound 2 in Human serum.

30

Example 13

52

Comparison with F18-Choline and F18-FDG

Biodistribution of Ga-68 RM2 see table below

Ga-68-	DOTA-	4-amino-1-carboxymethyl-piperidine-	D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH2
--------	-------	-------------------------------------	---

at 1 h p.i. in PC-3 tumor bearing mice was compared with the F-18 tracer

- 5
- [¹⁸F]Fluoroethylcholine (FEC) used for prostate cancer imaging, and FDG the gold standard F18 tracer in oncology. High tumor-to-tissue ratios underline the diagnostic usefulness of the Ga-68 compound RM2 for PET imaging

See figure 12.

Claims

1. A bombesin analog peptide antagonist conjugate having general formula (I)

5 (II) $[A-(B)_n]_x-C$

wherein

x is an integer from 1 to 3,

n is an integer from 1 to 6,

10 A is a metal chelator comprising at least one radionuclide metal,

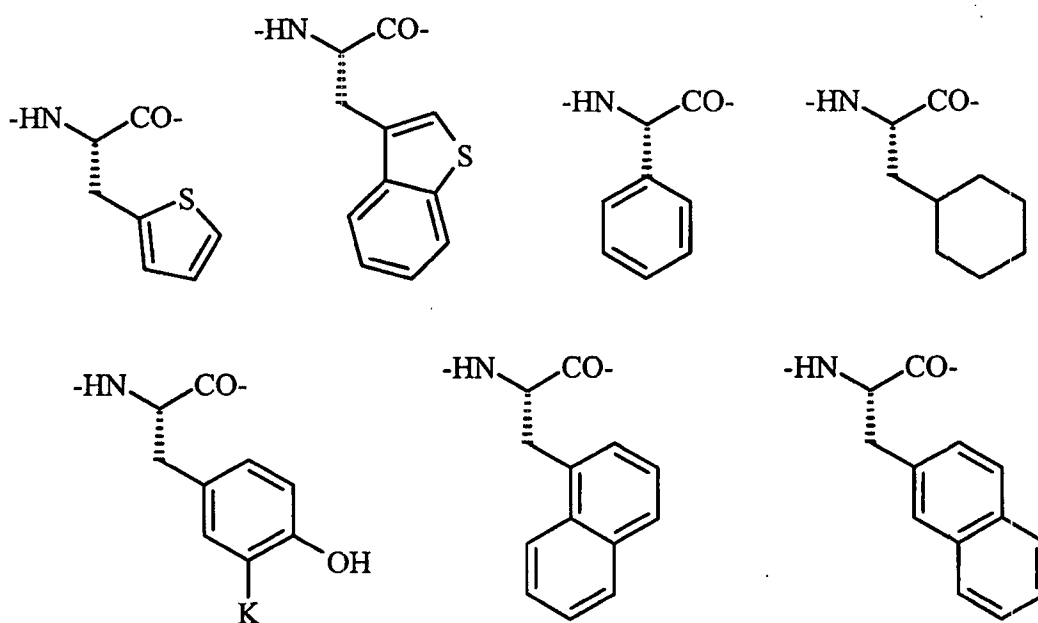
B is a spacer linked to N-terminal of C or a covalent bond ,

C is a bombesin analog peptide antagonist of sequence C-1 to C-4, wherein:

C-1: $Xaa_1^6-Gln^7-Trp^8-Ala^9-Val^{10}-Xaa_2^{11}-His^{12}-Xaa_3^{13}-Xaa_4^{14}-ZH$,

15 wherein:

Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described below

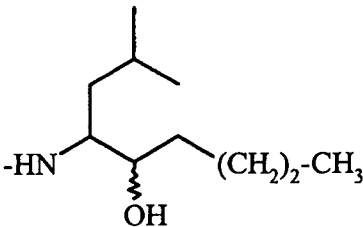


53

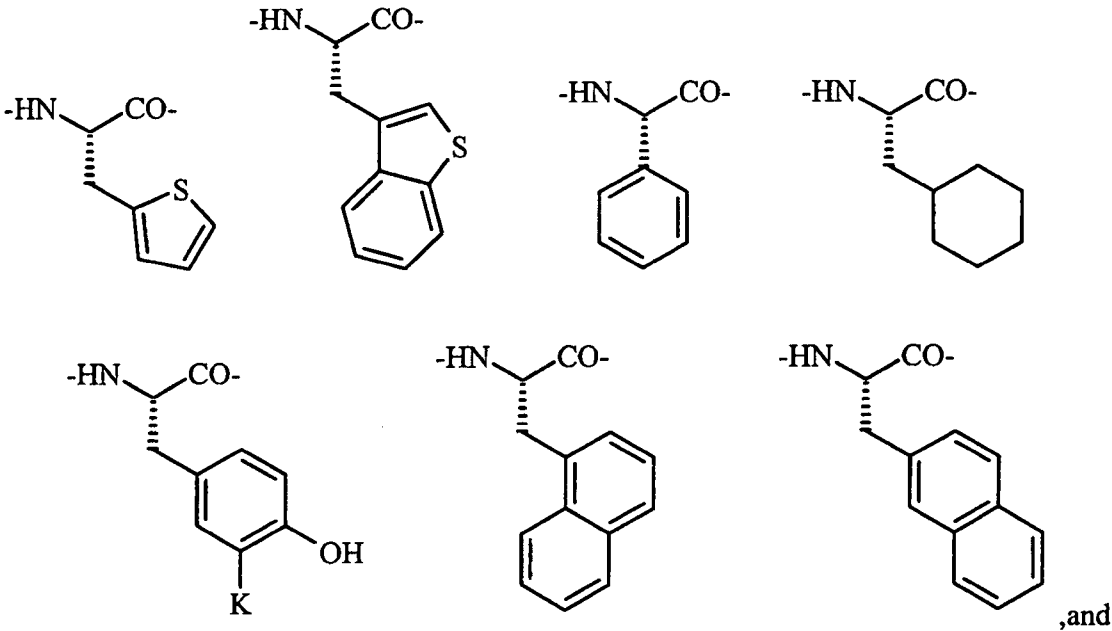
K is F, Cl, I, or NO₂,
Xaa₂ is Gly or β-Ala,
Xaa₃ is Statine, Statine analogs and isomers, 4-Am,5-MeHpA, 4-Am,5-MeHxA or α-substituted aminoacids,
5 Xaa₄ is Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle, or iso-Bu-Gly, and
Z is NH, O;

C-2: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,
wherein:

10 Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃ is



Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described
15 below



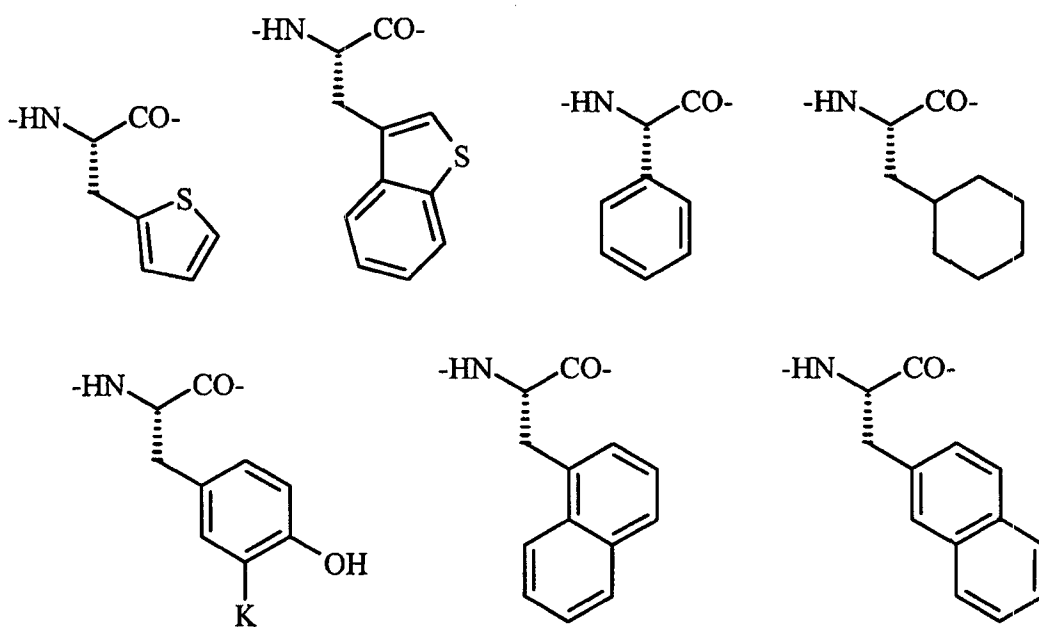
K is F, Cl, I, or NO₂,
20 Xaa₂ is Gly or β-Ala;

C-3: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₅¹³-Xaa₆¹⁴-ZH,

wherein:

Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described

5 below



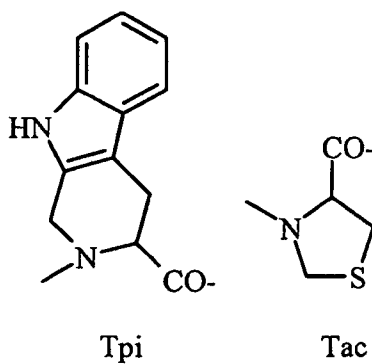
K is F, Cl, I, or NO₂,

10 Xaa₂ is Gly or β-Ala,

Xaa₅ is Leuψ-CH₂NH-,

Xaa₆ is Cys, Phe, Trp, Tpi or Tac,

wherein Tpi and Tac have the following meaning:

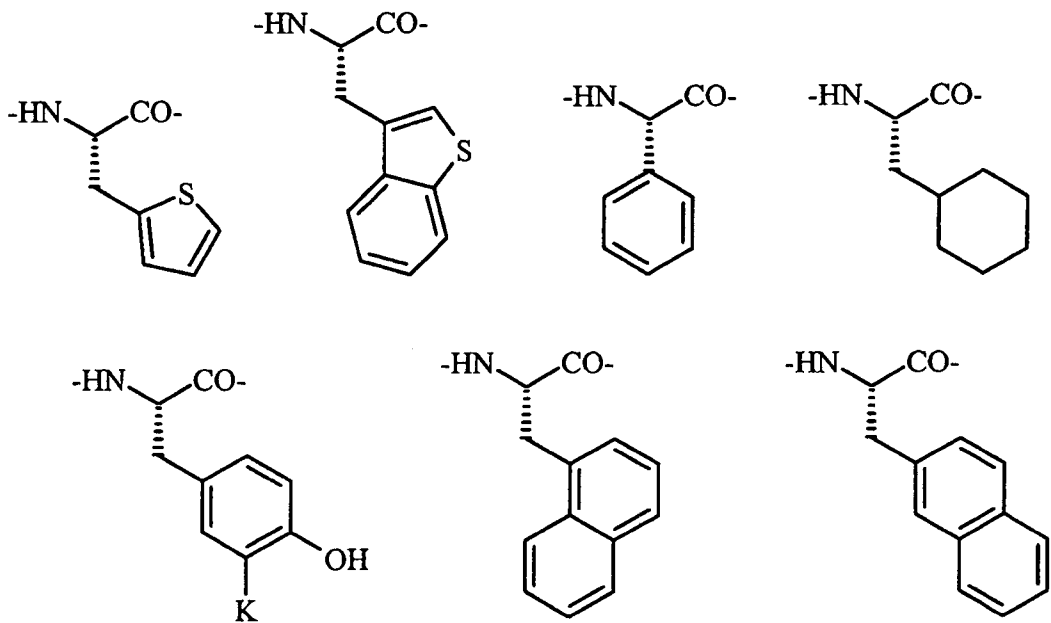


and
Z is NH, or O;

C-4: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₇,

5 wherein:

Xaa₁ is D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp or a residue having any one of the formulae described below

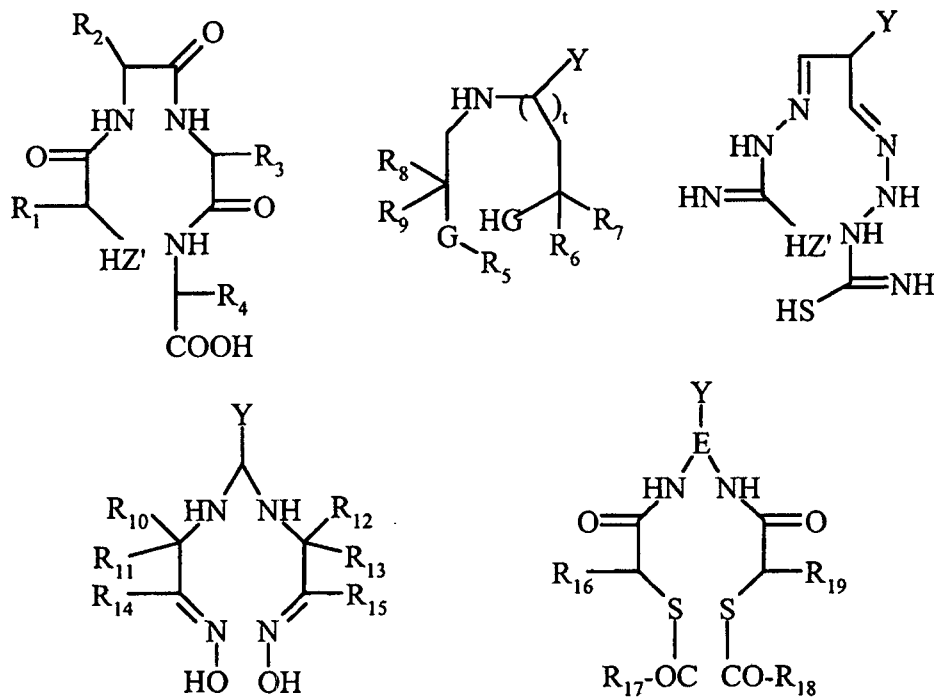


10 K is F, Cl, I, or NO₂
Xaa₂ is Gly or β-Ala,
Xaa₇ is Leu-O-Alkyl, or Leu-NH-alkyl,

15 and pharmaceutically acceptable salts of an inorganic or organic acid thereof, hydrates, complexes, esters, amides, solvates and prodrugs thereof.

2. The bombesin analog peptide antagonist conjugate according to claim 1 wherein the metal chelator (A) is a metal chelator for trivalent metals or for pentavalent metals and the
20 close analogs thereof.

3. The bombesin analog peptide antagonist conjugate according to claim 2 wherein the metal chelator for trivalent metals is selected from the group comprising DOTA-, NODASA-, NODAGA-, NOTA-, DTPA-, EDTA-, TETA-, and TRITA- based chelators and the close analogs thereof.
4. The bombesin analog peptide antagonist conjugate according to claim 2 wherein the metal chelator for pentavalent metals is selected from the group comprising:



10

wherein

R₁-R₁₅ are independently from each other hydrogen atoms or (C₁ -C₄) alkyl groups, wherein,

in the  moiety of the above formula, t is 1 or 2 or 3 and at least one of the carbon atoms in the said  moiety is substituted by Y or is not substituted by Y,

55

R₁₆ is a hydrogen atom or a CO₂ (C₁-C₄)-alkyl group;

R₁₇ and R₁₈ are independently from each other (C₁-C₄)-alkyl groups or phenyl groups;

R₁₉ is CH₂-COOH or a functional derivative thereof;

E is (C₁-C₄)-alkylene, or phenylene

5 optionally (C₁-C₄)-alkylene is substituted by CO₂-alkyl, CH₂-CO-alkyl, CONH₂, or CONHCH₂-CO₂-alkyl,

optionally phenylene is substituted by CO₂-alkyl,

wherein the alkyl groups have 1 to 4 carbon atoms;

G is NH or S;

10 Y is a functional group capable of binding with a free amino group of the peptide (N-terminal) or with the spacer, and

Z' is S or O.

5. The bombesin analog peptide antagonist conjugate according to claim 1 wherein the
15 radionuclide metal for imaging is selected from the group comprising ^{133m}In,
^{99m}Tc, ⁶⁷Ga, ⁵²Fe, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ¹¹¹In, ⁹⁷Ru, ²⁰³Pb, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁵¹Cr, ^{52m}Mn, ¹⁵⁷Gd, ¹²³I, ¹²⁴I,
¹³¹I, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, and ⁸²Br.

6. The bombesin analog peptide antagonist conjugate according to claim 1 wherein the
20 radionuclide metal for radiotherapy is selected from the group comprising ¹⁸⁶Re, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ⁶⁹Er,
¹²¹Sn, ¹²⁷Te, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ¹⁶¹Tb, ¹⁰⁹Pd, ¹⁸⁸Rd, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁷⁷As, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁶Ho,
¹⁴⁹Pm, ¹⁵¹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁹Gd, ¹⁷²Tm, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹²⁵I, ¹²³I, ²¹³Bi,
²²⁵Ac, ¹²⁹I and ^{177m}Sn.

25 7. The bombesin analog peptide antagonist conjugate according to claim 1 wherein the spacer B linked to the N-terminal of C has general Formula II:

II B₁-B₂

30 wherein

B₁ is a covalent bond or a natural amino acid or an unnatural amino acid or a linear diamine or a cyclic diamine,

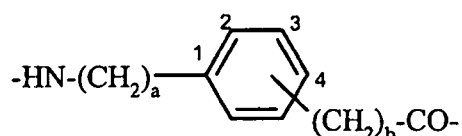
B₂ is a covalent bond or a natural amino acid or an unnatural amino acid or a linear carboxylic acid or a cyclic carboxylic acid,

- 5 with the proviso that both B₁ and B₂ cannot be covalent bonds at the same time and that, when B₁ is a diamine, B₂ is a carboxylic acid.

8. The bombesin analog peptide antagonist conjugate according to claim 7 wherein the unnatural amino acid is a compound having any one of general Formulae III, IV, V or VI

10 wherein

III



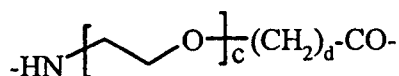
wherein

15 a is an integer from 0 to 3,

b is an integer from 0 to 3,

and relative substitution patterns or optionally 1,2-, 1,3- or 1,4-;

IV



20

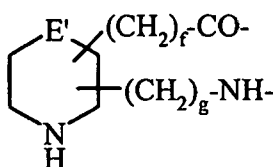
wherein

c is an integer from 1 to 24,

d is an integer from 1 to 6;

25

V



wherein

E' is NH, or CH₂,

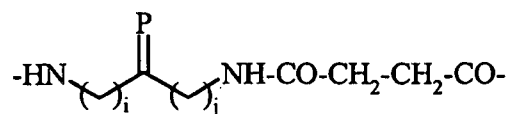
5 f is an integer from 0 to 6,

g is an integer from 0 to 6;

when E' is CH₂, then the 6-membered ring is optionally substituted at any carbon position of the 6-membered ring on the same carbon of the ring or on different carbons,

10 when E' is NH, then the 6-membered ring is optionally substituted at any carbon position of the 6-membered ring on the same carbon atom of the ring or on different carbon atoms and/or on the nitrogen atom with the proviso that f or g is an integer equal to or higher than 1;

VI



wherein

5 i is an integer from 1 to 6,

j is an integer from 1 to 6,

P is O or H₂.

preferably,

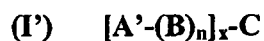
i is an integer from 1 to 3,

10 j is an integer from 1 to 3,

P is O, and the close analogs thereof.

9. The bombesin analog peptide antagonist conjugate according to any one of claims 1 – 8, with the proviso that the bombesin analog peptide antagonist conjugate has general Formula

15 (I')



wherein

20 A' is included instead of A and has the same meaning as A except that it is a metal chelator free of radionuclide metal.

10. A pharmaceutical composition comprising any one of the bombesin analog peptide antagonist conjugates according to any one of claims 1 – 9.

25

11. Use of any one of the bombesin analog peptide antagonist conjugates according to any one of claims 1 – 9 for binding to bombesin receptors, preferably to gastrin releasing peptide receptor (GRP) and/or for inhibiting bombesin receptors, preferably gastrin releasing peptide receptor (GRP).

30

12. A method for preparing any one of the bombesin analog peptide antagonist conjugates according to claim 1,

comprising the step

- 5 - Radiochelating the bombesin analog peptide antagonist conjugate having general Formula (I') as defined above with a suitable radionuclide metal or metal atom.

13. A method for ^{Diagn}imaging bombesin receptors, preferably a GRP Receptor expressing tumor cells and/or tumoral and peritumoral vessels, in a patient, comprising the steps:

- 10 - Administering to a patient a radiopharmaceutical effective amount of a bombesin analog peptide antagonist conjugate according to any one of claims 1 – 8;
- Imaging the radionuclide metal in the patient.

14. Use of a radiopharmaceutically effective amount of a bombesin analog peptide antagonist conjugate according to any one of claims 1 – 8 for the manufacture of an imaging agent for imaging bombesin receptors, preferably GRP Receptor expressing tumor cells and/or tumoral and peritumoral vessels.

15. The use according to claim 14, wherein said tumor cells refer to cancers that are selected from the group comprising:

- 20 - prostate cancer, including metastases
- breast cancer, including metastases
- gastrointestinal stromal tumors
- small cell lung carcinomas
25 - renal cell carcinomas,
- gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors,
- head and neck squamous cell cancers,
- neuroblastomas, and
- oesophageal squamous cell carcinomas

30 and wherein

said tumoral and peritumoral vessels refer to cancers that are selected from the group comprising:

- ovarian cancers,
- endometrial cancers, and
- 5 - pancreatic cancers.

16. A method for treating or preventing tumor cell and/or tumoral and peritumoral vessel related diseases, comprising the step of:

- Administering a therapeutically effective amount of a bombesin analog peptide antagonist
- 10 conjugate according to any one of claims 1 – 8.

17. Use of a therapeutically effective amount of a bombesin analog peptide antagonist conjugate according to any one of claims 1 – 8 for the manufacture of a medicament for treating or preventing tumor cell and/or tumoral and peritumoral vessel related diseases.

15

18. The use according to claim 17, wherein said tumor cell related diseases are selected from the group comprising:

- prostate cancer, including metastases,
 - breast cancer, including metastases,
 - 20 - gastrointestinal stromal tumors,
 - small cell lung carcinomas,
 - renal cell carcinomas,
 - gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors,
 - head and neck squamous cell cancers,
 - 25 - neuroblastomas, and
 - oesophageal squamous cell carcinomas
- and wherein

said tumoral and peritumoral vessel related diseases are selected from the group

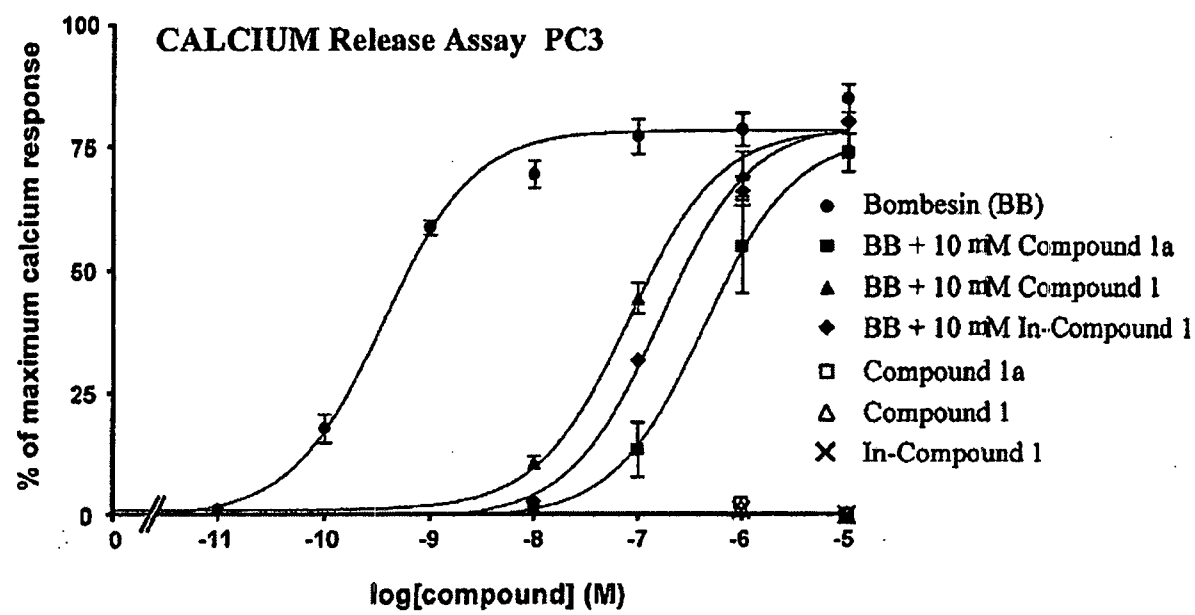
30 comprising:

- prostate cancer, including metastases, and

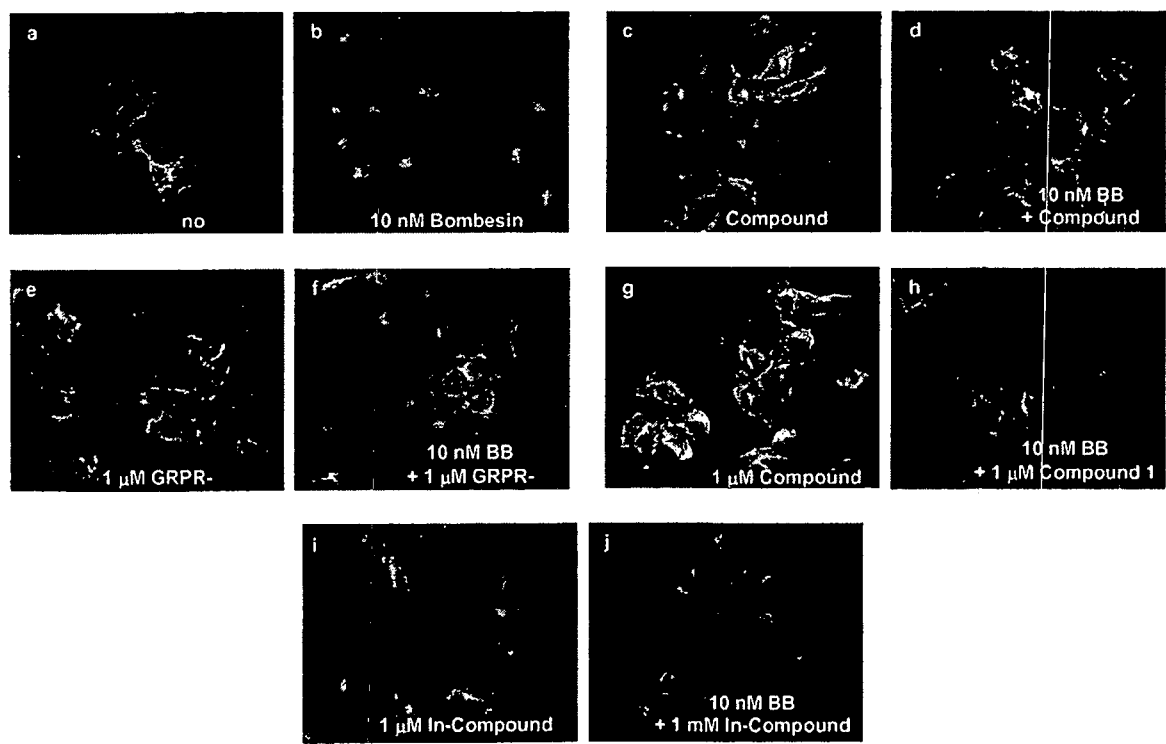


- breast cancer, including metastases.

19. A kit for the preparation of radiotherapeutical agent or of a radiopharmaceutical imaging
agent comprising a vial containing a predetermined quantity of the bombesin analog peptide
5 antagonist conjugate according to claim 9 and an acceptable carrier, diluent, excipient or
adjuvant for the radiolabeling a metal chelator.



5 Fig.1



10 Fig. 2

89

5

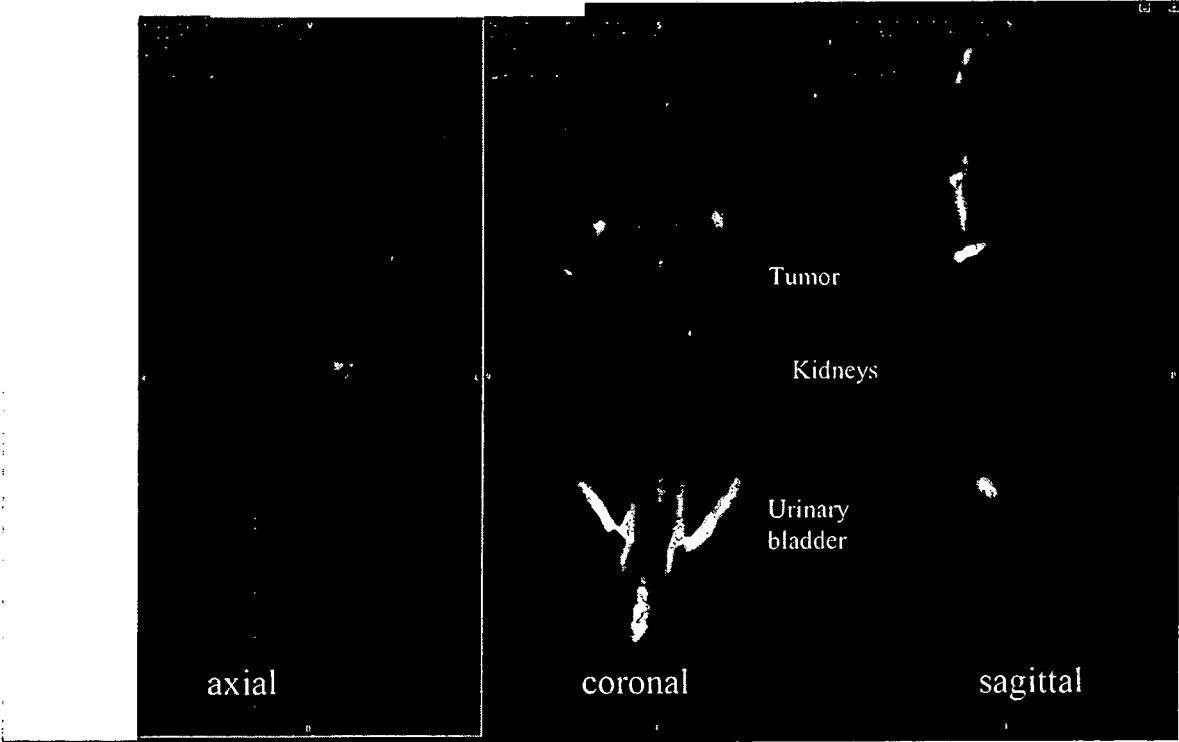
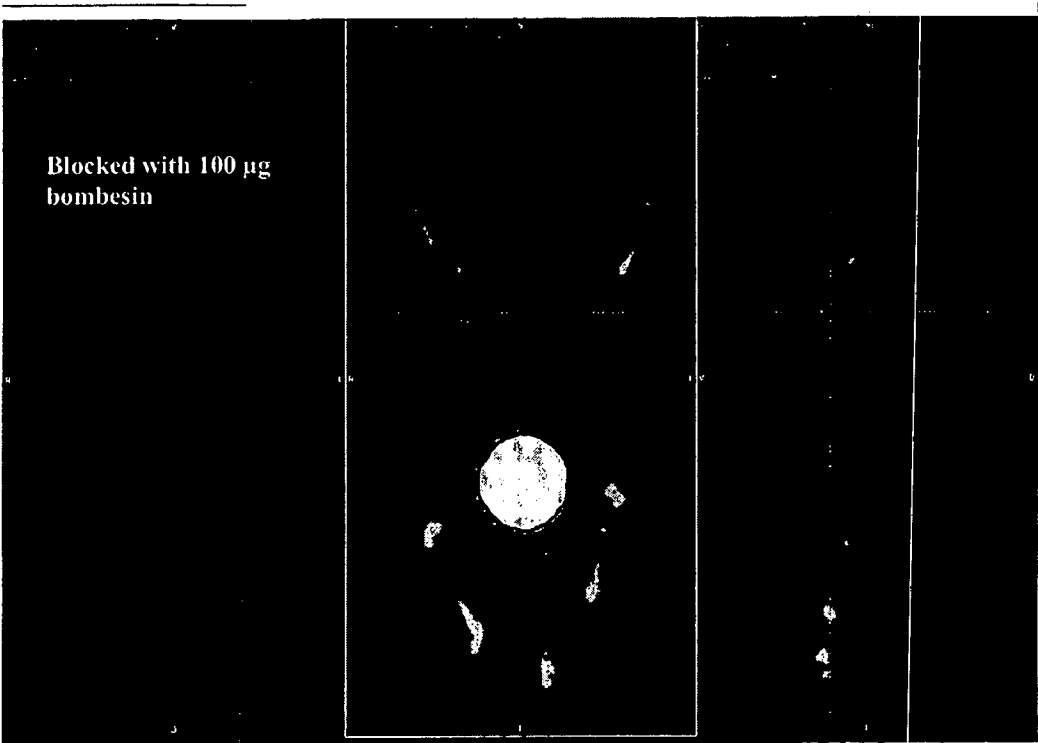


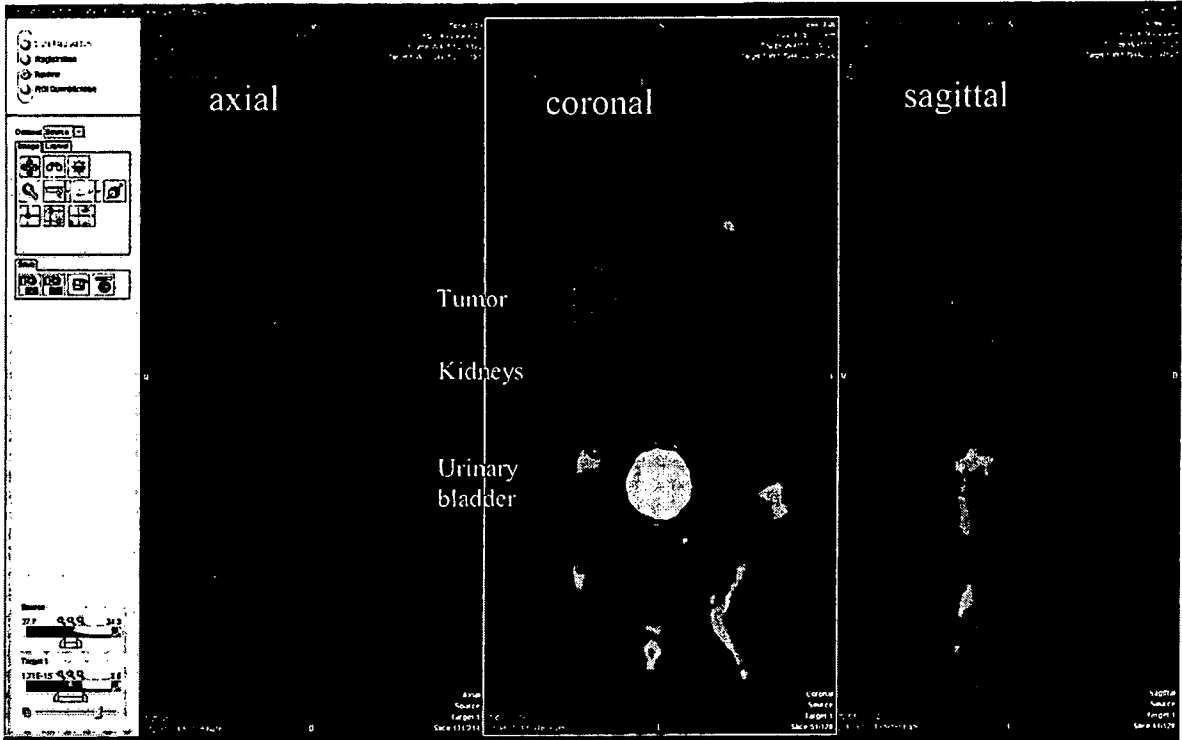
Fig. 3a



5

Fig. 3b

62



5

Fig. 4a

5

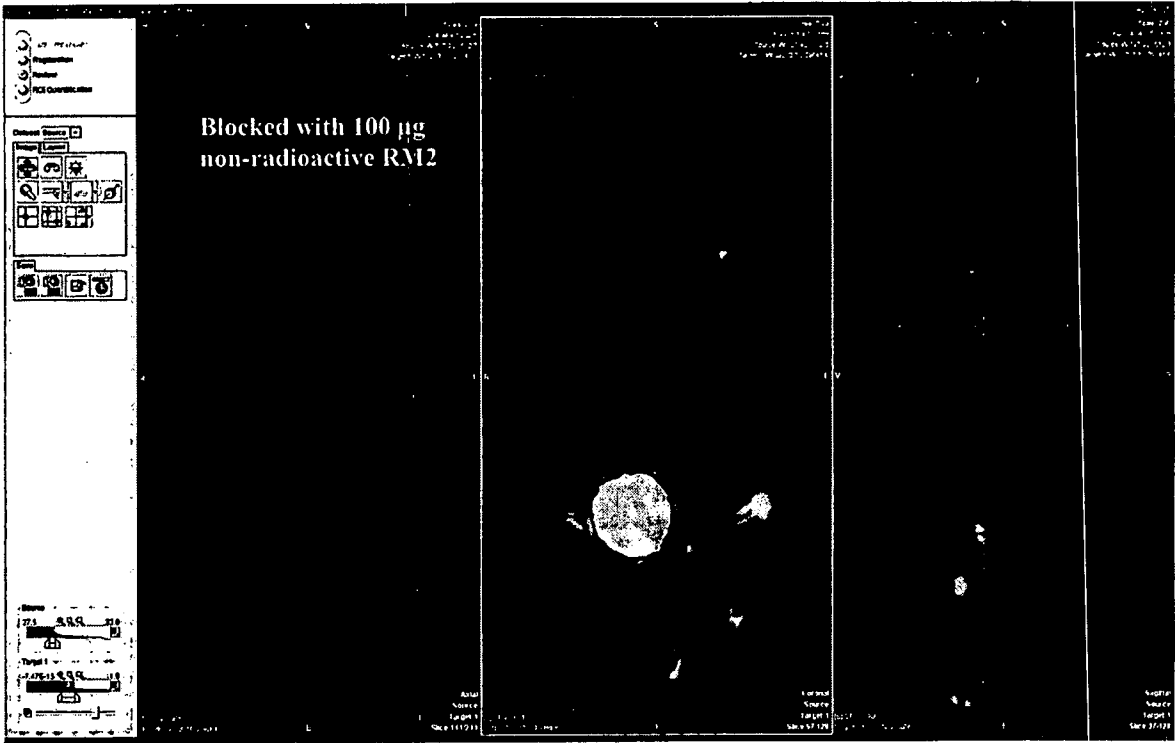


Fig. 4b

61

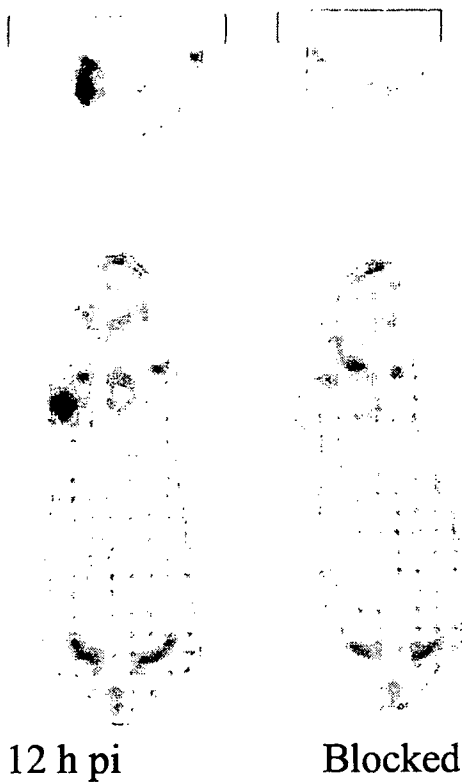


Fig. 6

62

5

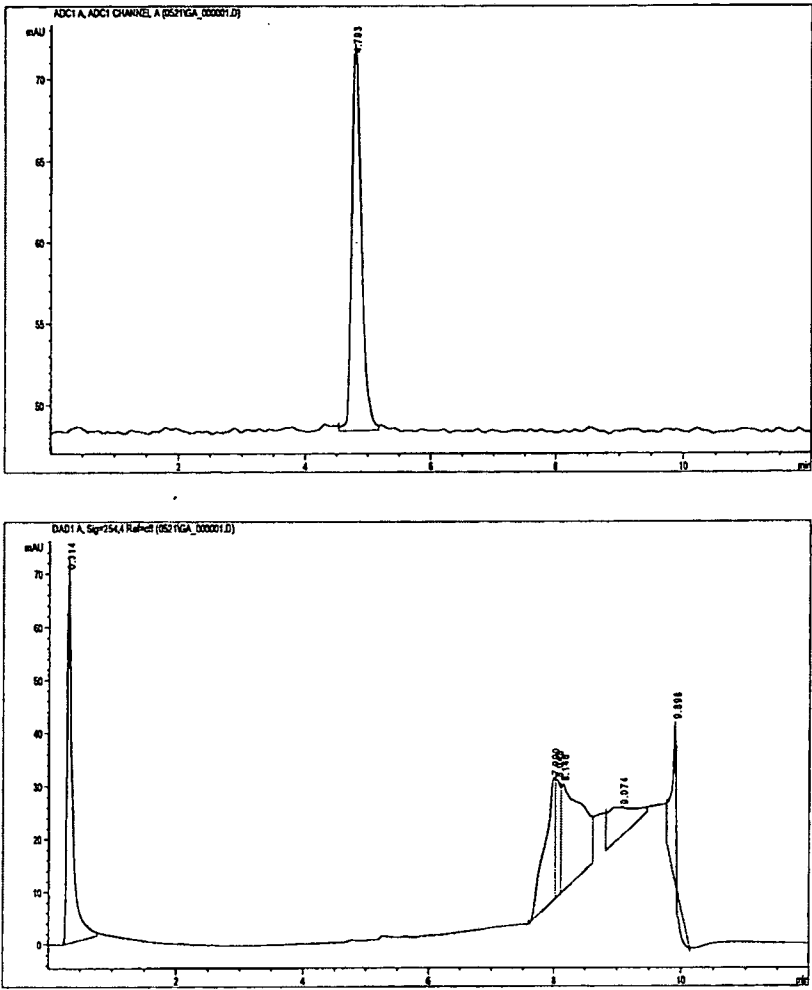


Fig. 9

63

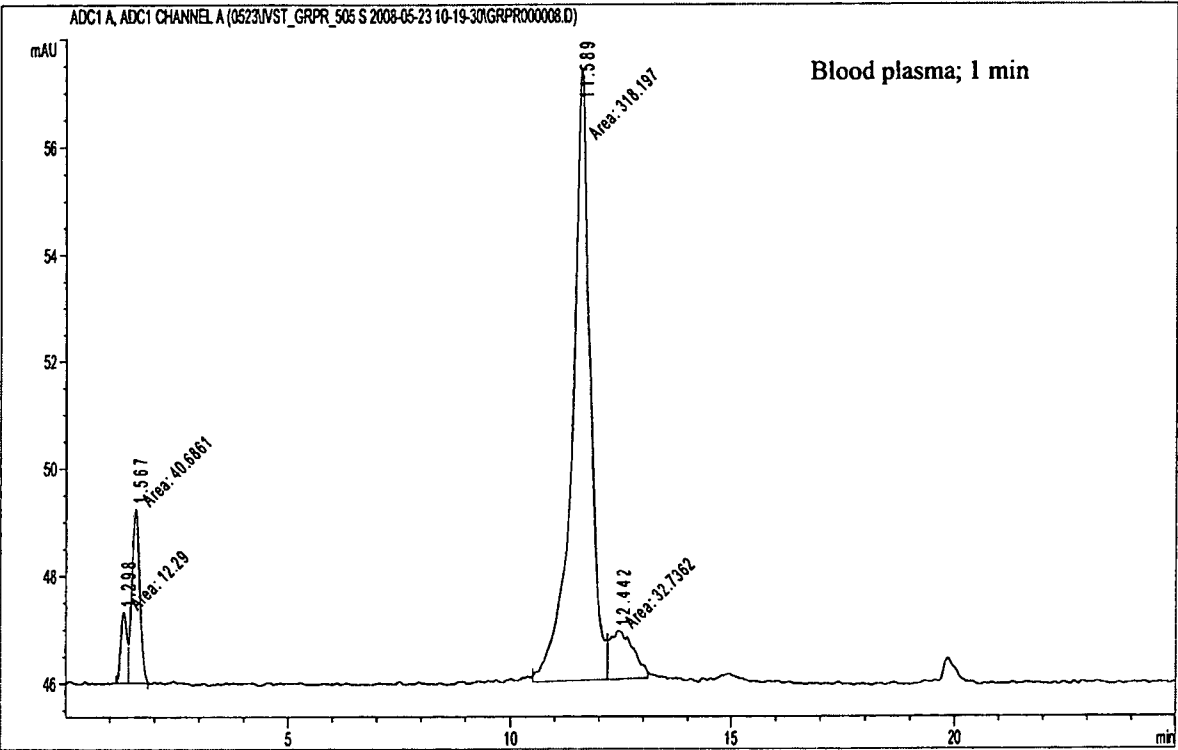


Fig. 10b

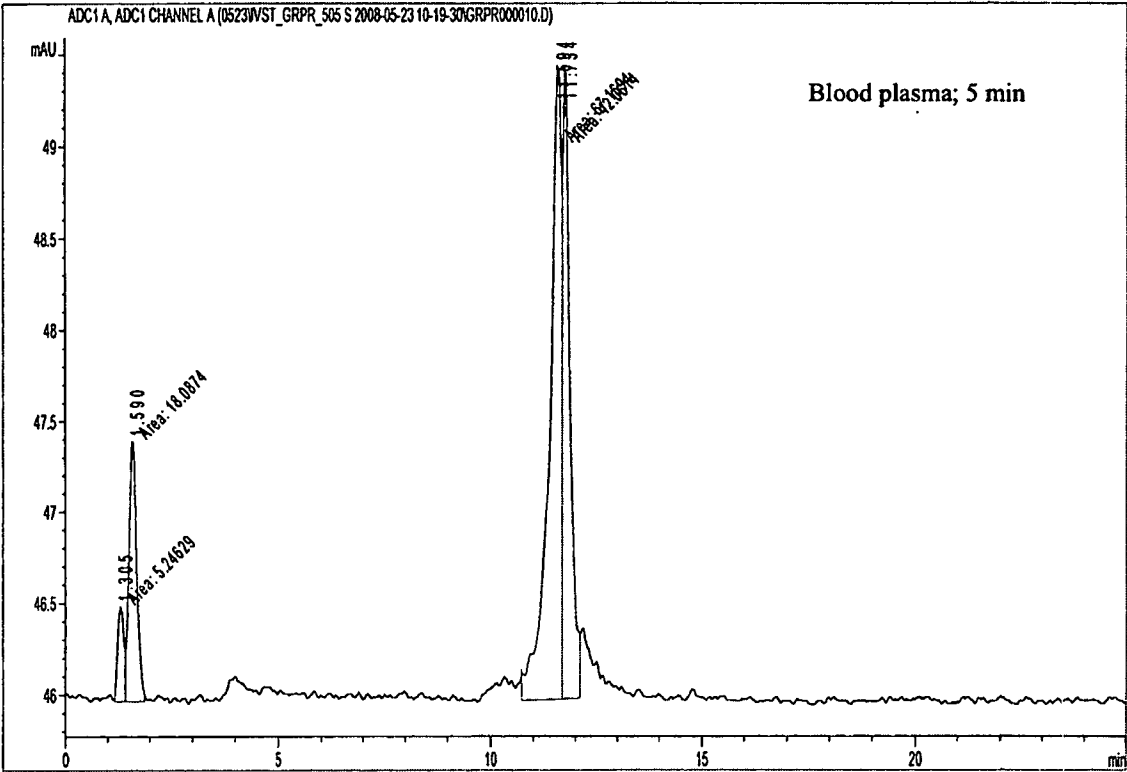
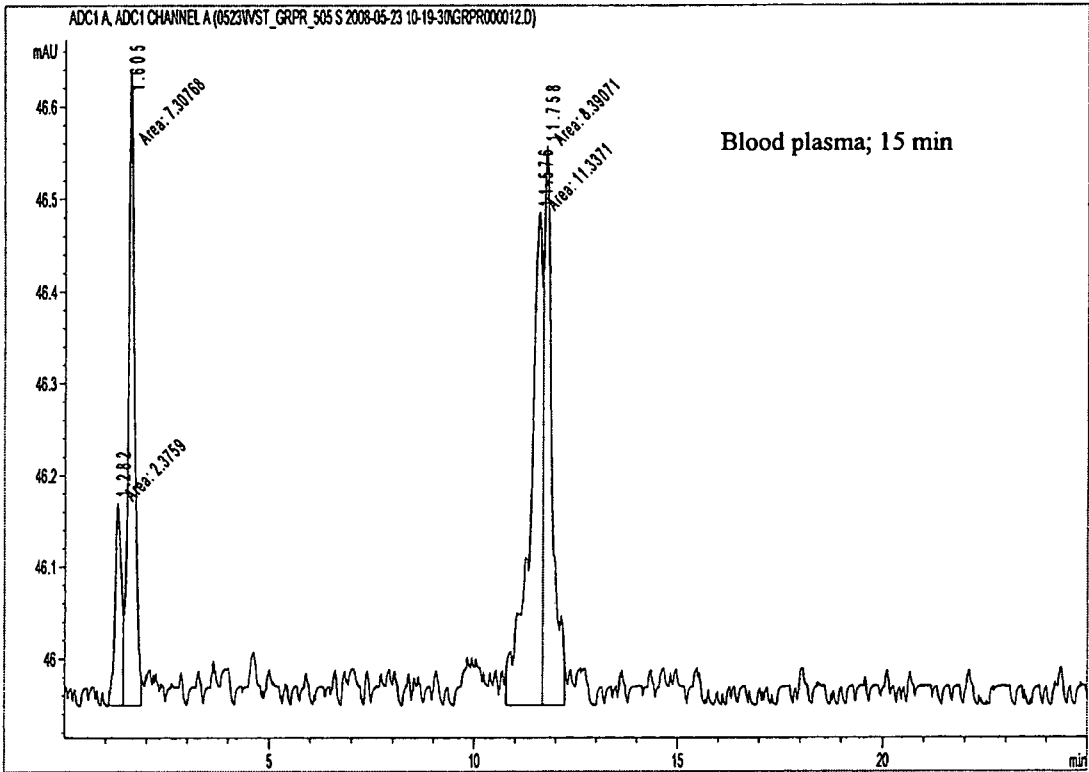


Fig. 10c

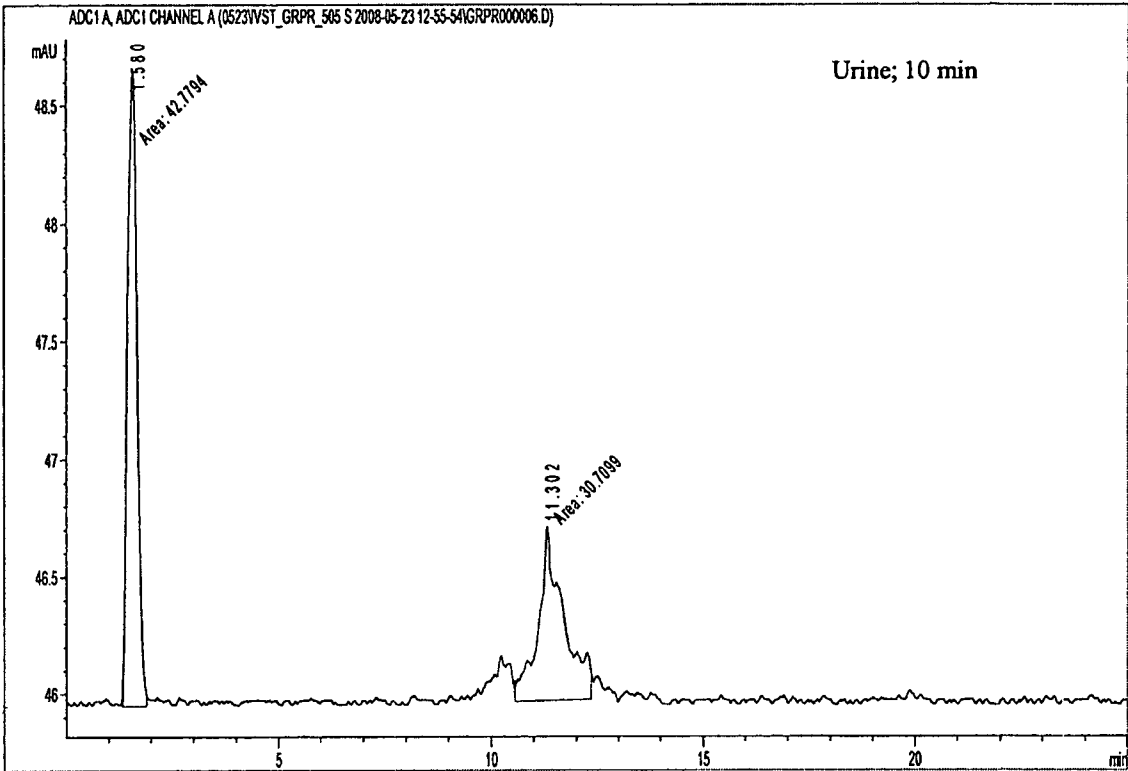
64



5

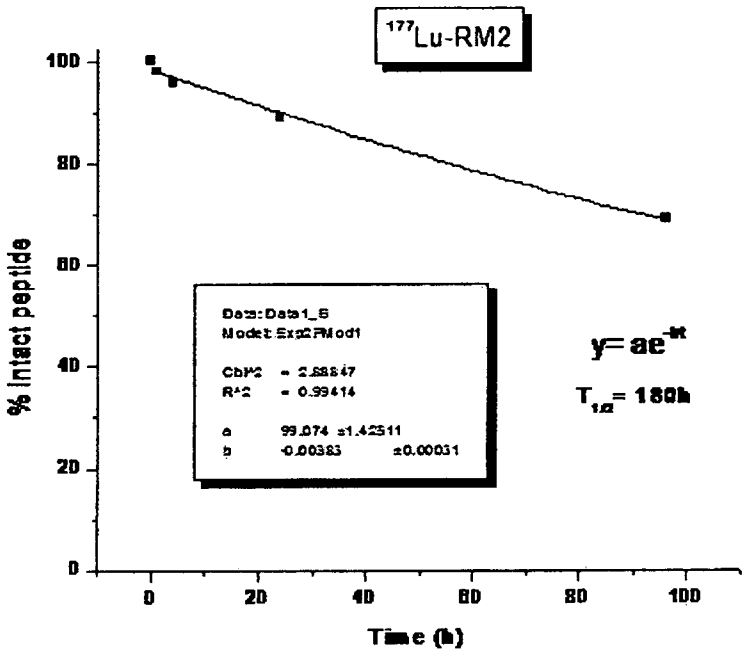
Fig. 10d

]



5

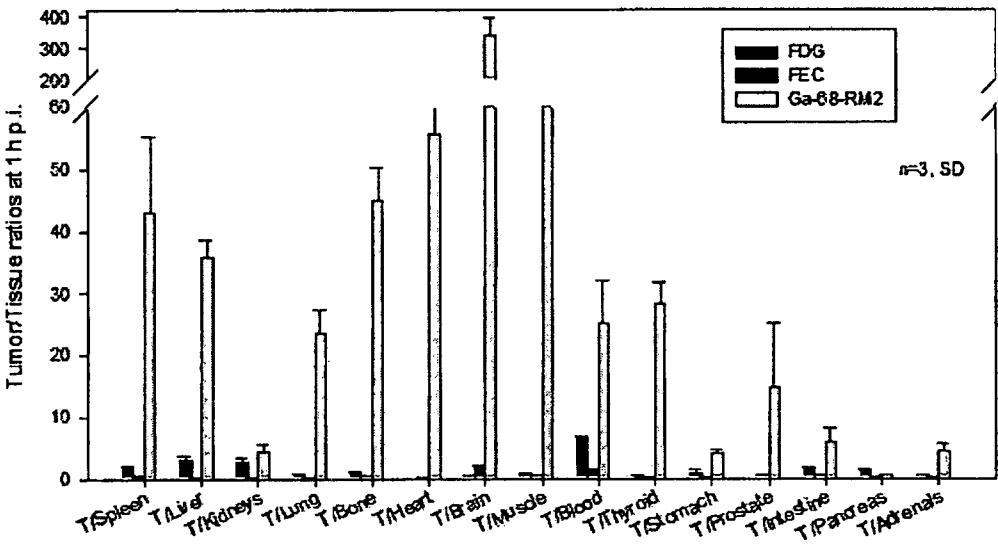
Fig. 10e



5

Fig. 11

1



5

Fig 12

- (12) **Publicación de la solicitud internacional bajo PCT**
 (19) **Organización Mundial de Propiedad Intelectual**
Oficina Internacional
 (43) **Fecha de publicación internacional : 11 de septiembre de 2009 (11.09.2009)**
 (10) **Número de publicación internacional: WO 2009/109332 A1**
-

- (51) **Clasificación internacional de patentes:**
C07K 7/08 (2006.01) A61K 51/08 (2006.01)
 (21) **Número de solicitud internacional: PCT/EP2009/001403**
 (22) **Fecha de presentación internacional: 27 de febrero de 2009 (27.02.2009)**
 (25) **Idioma de la presentación: inglés**
 (26) **Idioma de la publicación: inglés**
 (30) **Fecha de prioridad:**
 08075180.3 del 07 de marzo de 2008 (07.03.2008) EP
 (71) **Solicitante (para todos los estados designados con excepción de US):**
UNIVERSITÄTSSPITAL BERN [CH/CH]; Hebelstrasse 32, CH-4031 Basel (CH).
UNIVERSITÄT BERN [CH/CH]; Hochschulstrasse 4, CH-3012 Bern (CH).
 (72) **Inventores; y**
 (75) **Inventores/Solicitantes (solamente para US): MAECKE, Helmut [DE/DE];**
 Bergfriedweg 7, 79541 Lörrach (DE). **REUBI, Jean Claude [CH/CH];** Ausstrasse 4,
 CH-3084 Wabern (CH). **MANSI, Rosalba [CH/CH];** Langackerstrasse 2, CH-4142
 Münchenstein (CH).
 (74) **Agente: Burkert, Frank; c/o Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft,**
 Müllerstrasse 178, 13353 Berlin (DE).
 (81) **Estados designados** (en la medida en que no se indique lo contrario, para cada
 tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB,
 BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
 EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
 KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
 MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,
 SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
 UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 (84) **Estados designados** (en la medida en que no se indique lo contrario, para cada
 tipo de protección regional disponible): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW,
 MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ,
 MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
 FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI,
 SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
 SN, TD, TG).

Publicado:

- con el informe de búsqueda internacional (Art. 21 (3))
 - antes del vencimiento del plazo para enmienda de reivindicaciones y será republicado en caso de eventuales modificaciones (regla 48.2 (h))
-

Véanse las explicaciones („Guidance Notes on Codes an Abbreviations“) al comienzo de cada edicion regular de la Gaceta-PCT para la explicación del código de dos dígitos y de las otras abreviaturas

(54) **Título:** Conjugados Antagonistas peptídicos análogos a la bombesina

(57) **Resumen:**

Un medicamento de diagnóstico y terapéutico que comprende un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene la fórmula general (I): $[A-(B)_n]_x-C$ donde A es un quelante de metales que comprende al menos un radionucleido metálico, B es un separador unido al extremo N de C, o un enlace covalente, y C es un antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene una secuencia como la reivindicada, donde además, x es un número entero entre 1 y 3, y n es un número entero entre 1 y 6.

CONJUGADOS ANTAGONISTAS PEPTÍDICOS ANÁLOGOS A LA BOMBESINA

INTRODUCCIÓN

La invención se relaciona con radiofármacos terapéuticos o de diagnóstico/generadores de imágenes, con su preparación, y con su uso, donde los radiofármacos terapéuticos o de diagnóstico se definen como unidades de unión que presentan afinidad y son capaces de unirse a los receptores de bombesina, y más particularmente, al receptor del péptido liberador de gastrina (GRP). Las unidades de unión están marcadas con un grupo que forma complejos metálicos con isótopos que presentan emisiones alfa, beta, gamma y positrónicas. El uso incluye un tratamiento para un sujeto que tiene una enfermedad neoplásica, que comprende el paso de administrarle al sujeto una cantidad eficaz de un radiofármaco terapéutico que tiene un metal quelado con un grupo quelante combinado con una unidad capaz de unirse a los receptores de bombesina, y más particularmente, al receptor del péptido liberador de gastrina (GRP) sobreexpresado en las células tumorales. El uso incluye el diagnóstico por imágenes o de otra índole de un sujeto que tiene una enfermedad neoplásica, mediante el uso de un radiofármaco de diagnóstico/generador de imágenes que tiene un metal quelado con un grupo quelante combinado con una unidad capaz de unirse a receptores de bombesina, y más particularmente, al receptor del péptido liberador de gastrina (GRP) sobreexpresado en las células tumorales. El método consiste en formar un compuesto terapéutico o de

diagnóstico a partir de un compuesto precursor que consiste en un grupo quelante de metales unido de manera covalente a una unidad capaz de unirse a receptores de bombesina, y más particularmente, al receptor del péptido liberador de gastrina (GRP).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Cuando se diseña un marcador radiofarmacéutico efectivo para usar como agente de diagnóstico, es imperativo que las drogas tengan propiedades de direccionamiento y farmacocinéticas *in vivo* apropiadas. Además, Fritzberg et al. (1992, J. Nucl. Med., 33:394) indican que la química del radionucleido y sus enlaces asociados disminuyen la necesidad de optimizar la unión y la marca de modificaciones químicas de la biomolécula que actúa como vehículo. Por ende, el tipo de radionucleido, el tipo de biomolécula y el método usado para unirlos unos con otros pueden tener un efecto crucial sobre las propiedades de la radiomarca.

Los péptidos son biomoléculas que tienen una función crucial en muchos procesos fisiológicos, incluyendo acciones como neurotransmisores, hormonas y antibióticos. Las investigaciones han demostrado su eficacia en campos tales como la neurociencia, la inmunología, la farmacología y la biología celular. Algunos péptidos pueden actuar como mensajeros químicos. Se unen a receptores en la superficie de la célula blanco, y el efecto biológico del ligando es transmitido al tejido blanco. Por lo tanto, es posible

explotar la propiedad de unión específica del ligando con el receptor marcando el ligando con un radionucleido. En teoría, la afinidad elevada del ligando por el receptor facilita la retención del ligando radiomarcado en los tejidos que expresan el receptor. Sin embargo, aún se están investigando cuáles péptidos pueden marcarse con efectividad, y bajo qué condiciones ha de ocurrir la marca. Es bien conocido que la especificidad del ligando peptídico por el receptor puede alterarse durante la reacción química. Entonces, es necesario determinar una construcción peptídica óptima.

En los tumores se sobreexpresan diversos tipos de receptores a los cuales se unen específicamente los péptidos. En las siguientes publicaciones: Boerman *et al.*, *Seminar in Nuclear Medicine*, 2000, 30(3), 195; Reubi *et al.* *J. Nucl. Med.*, 2005, 46 (supl.) 67S; Reubi, J.C., *Endocrine Reviews*, 2003, 24(4), 389, se provee una lista no exhaustiva de péptidos que se unen específicamente a receptores presentes en la superficie de las células en los neoplasmas, es decir, la somatostatina, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la bombesina, que se une al receptor del péptido liberador de gastrina (GRP), la gastrina, la colecistoquinina (CCK) y la calcitonina.

La utilidad potencial de los péptidos específicos para receptores marcados con metales para el diagnóstico por imágenes centellográficas y la radioterapia puede observarse, por ejemplo, en los análogos de somatostatina,

por ejemplo, el Octreotide conjugado a ^{111}In -DTPA, un agente de diagnóstico por imágenes aprobado por la FDA, Octreoscan®, comercializado en los Estados Unidos por Covidien (Lowbertz et al., *Seminars in Oncology*, 1994, 1) y Reubi et al., *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, 67S-75S, y las referencias citadas en dichas publicaciones, respectivamente. El Octreotide y sus análogos han sido unidos de manera covalente a varios isótopos metálicos para diagnóstico por imágenes ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{68}Ga) y varios isótopos metálicos terapéuticos (^{105}Rh , $^{186/188}\text{Re}$, ^{153}Sm , ^{90}Y , ^{166}Ho , ^{177}Lu). Los conjugados marcados con metales se unen específicamente al receptor, y al unirse al receptor, la construcción es internalizada por el receptor, y los péptidos receptores marcados con metales o sus metabolitos son atrapados dentro de las células blanco.

Adicionalmente, el principio anterior puede extenderse a los péptidos ávidos por el receptor de GRP (péptidos que tienen una afinidad elevada por el receptor), por lo que es posible usar agonistas de bombesina marcados con metales para el diagnóstico por imágenes centellográficas y la radioterapia (Smith et al., *Anticancer Res.*, 23 (2003), 63-70; Baidoo et al., *Bioconjug. Chem.*, 9 (1998), 218-225; Gali et al., *Bioconjug. Chem.*, 12 (2001), 354-363; Smith et al., *Bioconjug. Chem.*, 14 (2003), 93-102, *Cancer Res.*, 63 (2003), 4082-4088; Rogers et al., In, M. Nicolini y U. Mazzi, editores, *Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine*, SGE Editoriali, Italia

(1999), 519-525; Zhang et al., *Cancer Res.*, 64 (2004), 6707-6715; Lantry et al., *EANM*, Helsinki (Finlandia) (2004); Linder et al., *J. Nucl. Med.*, 45 (2004) (5), 169P [resumen 482]. Chen et al., *J. Nucl. Med.*, 45 (2004), 1390-1397; Johnson et al., *Cancer Biother Radiopharm.* 2006, 21(2), 155-66, Smith et al., *Nucl. Med. Biol.*, 2005, 32 733-40).

En Chen et al. (*Appl. Radiat. Isot.*, 2007 (en imprenta)), Waser et al. (*Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2007 34, 95-100) y Lantry et al. (*J. Nucl. Med.*, 2006, 47, 1144-52), se describe un análogo de bombesina para el diagnóstico por imágenes centellográficas y la radioterapia, ^{177}Lu -DOTA unido a $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-[4\text{-aminobenzoil}]-\text{QWAVGHLM}-\text{NH}_2$) (^{177}Lu -AMBA).

Diversas patentes y solicitudes de patentes están relacionadas con agonistas de bombesina. Volkert et al. (US 2007/0065362 A) reivindican agonistas de bombesina marcados con metales con la siguiente estructura general:

unidad de marca metálica-grupo separador-agonista de bombesina para aplicaciones de diagnóstico por imágenes y terapéuticas. Otras patentes y solicitudes de patentes de los mismos inventores incluyen US 6921526 B (2005), US 7060247 B, US 7147838 B (2006) y WO 2002/087631 A1.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El principio subyacente para la selección de agonistas como radiofármacos en las publicaciones anteriores es que producen o provocan una respuesta por los receptores de GRP

al interactuar, después de lo cual el radiofármaco es internalizado en la célula por endocitosis. Los antagonistas de GRP contrarrestan el efecto de los agonistas y no son internalizados en la célula, por lo que se asume que los antagonistas no son apropiados por el diagnóstico por imágenes centellográficas y los propósitos relacionados con la radioterapia. Hasta el momento, el consenso ha sido desarrollar compuestos con buenas propiedades de internalización como radioligandos, lo cual ha de resultar en una acumulación *in vivo* elevada de los radioligandos en los tumores, acumulación que parecía ser necesaria para obtener una visualización y una terapia con radionucleidos óptimas *in vivo*. A partir de las investigaciones moleculares-farmacológicas realizadas, es bien sabido que, para obtener una internalización eficiente, usualmente es necesario emplear agonistas (Bodei et al., *J. Nucl. Med.*, 2006;47, 375-377; Koenig et al., *Trends Pharmacol. Sci.*, 1997;18, 276-287, Cescato et al., *J. Nucl. Med.*, 2006;47, 502-511. Ginj et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103, 16436-16441), y recientemente se demostró que, en el caso de los receptores de somatostatina, los antagonistas del receptor de somatostatina marcados con metales de alta afinidad resultaban en una internalización baja en las células tumorales, pero presentaban un desempeño igual o aún mejor en términos de captación *in vivo* en los modelos de tumores animales que los agonistas correspondientes, que resultan

en una internalización masiva. Los receptores de GRP se sobreexpresan en diversos neoplasmas (Cornelio et al, Ann. Onco., 2007, 18, 1457-1466, y las referencias citadas en dicha publicación), tales como el cáncer de próstata y sus metástasis, el cáncer de mama y sus metástasis, los tumores del estroma gastrointestinal, los carcinomas de células pulmonares pequeñas, los carcinomas de células renales, los tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos, los cánceres de células escamosas de cabeza y cuello, los neuroblastomas, y los cánceres de células escamosas de esófago. Los receptores de GRP también se expresan en los vasos sanguíneos asociados a los tumores de los cánceres de ovario, endometrio y páncreas humanos (Fleischmann et al., Cell Onc., 2007, 29, 421-33). Entonces, resulta muy deseable diseñar radiofármacos potentes con propiedades de antagonismo para el diagnóstico por imágenes y la radioterapia.

Jensen et al. (Pharma. Reviews, 2008 (en imprenta)) revisaron recientemente la farmacología como receptores de tres subtipos de receptores de bombesina diferentes, donde el receptor de GRP pertenece al subtipo 2.

En una publicación reciente, Cescato et al. (J. Nucl. Med., 2008, 49, 318-26) demostraron que puede ser preferible usar un antagonista de bombesina marcado con $^{99m}\text{Tc-N}_4$ sobre otros agonistas para efectuar el direccionamiento hacia los tumores.

En WO 2007/109475 A2, WO 2007/095443 A2, US

2008/0008649 A1 y US 7226577 B2 se describen las primeras invenciones en el campo de los compuestos dirigidos al receptor de GRP, los cuales presentan una estructura de metal quelado-conector-bombesina con un el esquema general que se indica a continuación:

metal-quelante-conector-análogo de bombesina

De acuerdo con WO 2007/095443 A2, la muestra L70 con la siguiente secuencia particular:

¹⁷⁷Lu-DOTA-Gly-4-aminobenzoil-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂

se comportó como agonista cuando se midió la captación transcurridas 1 y 24 horas. La captación no es óptima para propósitos terapéuticos, por lo que es necesario mejorarla.

Además de estas patentes y solicitudes, en las publicaciones se incluyen estudios preclínicos y clínicos (Waser et al., *Eur. J. Nucl. Medicine*, 2007, 34, 95-100; *J. Nucl. Med.*, 2006, 47, 1144-52).

Al seleccionar un antagonista dirigido a distintos sitios del receptor de GPR con gran afinidad, en esta invención se demuestra que una combinación de una estrategia con separadores resulta en una captación inesperadamente alta y persistente en los tumores, en combinación con una captación baja y una eliminación rápida en los órganos distintos del blanco. En un estudio comparativo, se observó una captación destacablemente mayor (de más del doble) en el tumor cuando se usó un conector similar. Una vez convalidadas las propiedades antagónicas

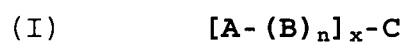
de los análogos de bombesina en ensayos *in vitro*, se descubrió que, aún después de agregar un separador en el extremo N, un quelante y un metal, se mantenían los efectos antagónicos mencionados, lo cual se traducía en un comportamiento *in vivo* excelente con relación a las relaciones entre el tumor y el fondo.

Entonces, un objeto de la presente invención es proveer nuevos conjugados antagonistas peptídicos de bombesina que presenten una captación elevada y una alta estabilidad *in vivo* (en suero y tejido humanos).

RESUMEN

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se refiere a conjugados antagonistas peptídicos análogos a la bombesina que se une selectivamente a los receptores de bombesina y más en particular al receptor de GRP sin suscitar la internalización al interior de la célula y sin señalar mediante la movilización de calcio a la vez que antagoniza los efectos inducidos por el agonista en dichos dos sistemas, donde el conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina tiene la Fórmula general (I):



donde

x es un entero entre 1 y 3,

n es un entero entre 1 y 6,

A es un quelante para metales que comprende por lo menos un radionúclido de metal, preferiblemente apropiado

para uso terapéutico o en diagnóstico, más preferiblemente para el diagnóstico por imágenes o radioterapia,

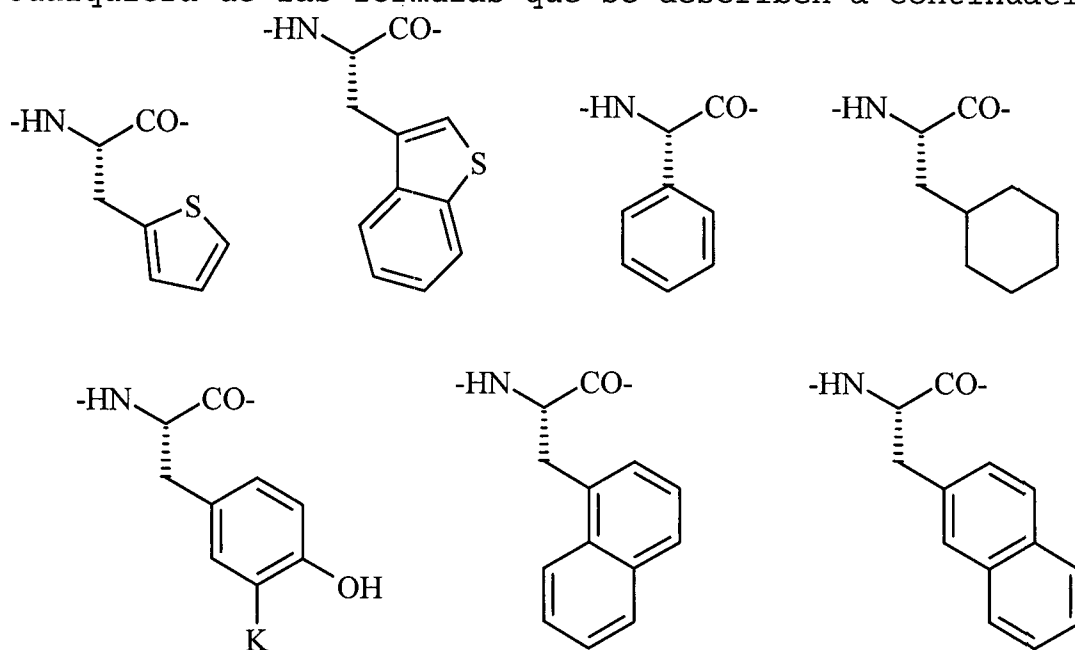
B es un conector separador que conecta con un N terminal de C o una unión covalente,

C es un antagonista peptídico análogo a la bombesina con la secuencia C-1 a C-4, donde

C-1: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-ZH,

donde

Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación:



K es F, Cl, I, o NO₂,

Xaa₂ es Gli o β-Ala,

Xaa₃ es Estatina, análogos e isómeros de Estatina, 4-Am, 5-MeHpA, 4-Am, 5-MeHxA o aminoácidos sustituidos en α,

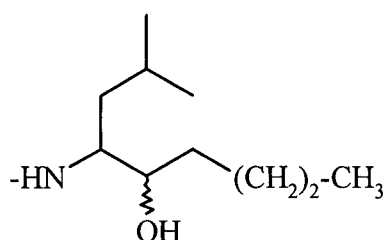
Xaa₄ es Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle, o iso-Bu-Gly, y

Z es NH u O;

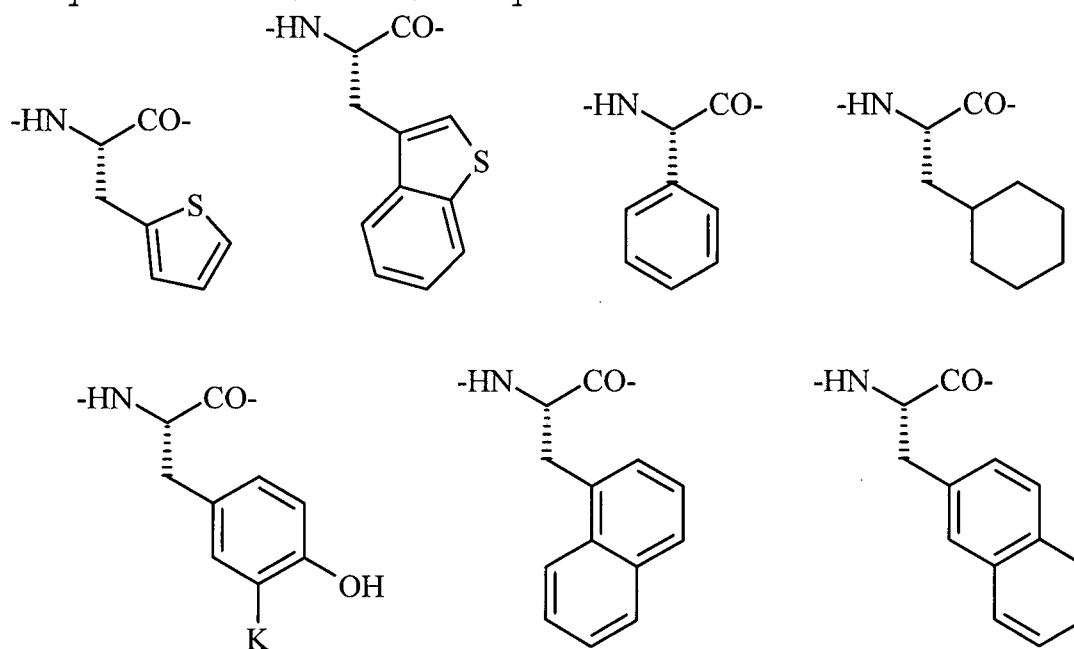
C-2: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ (CHOH-CH₂) - (CH₂)₂-CH₃,

donde

Leuψ (CHOH-CH₂) - (CH₂)₂-CH₃ es



Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación:



y

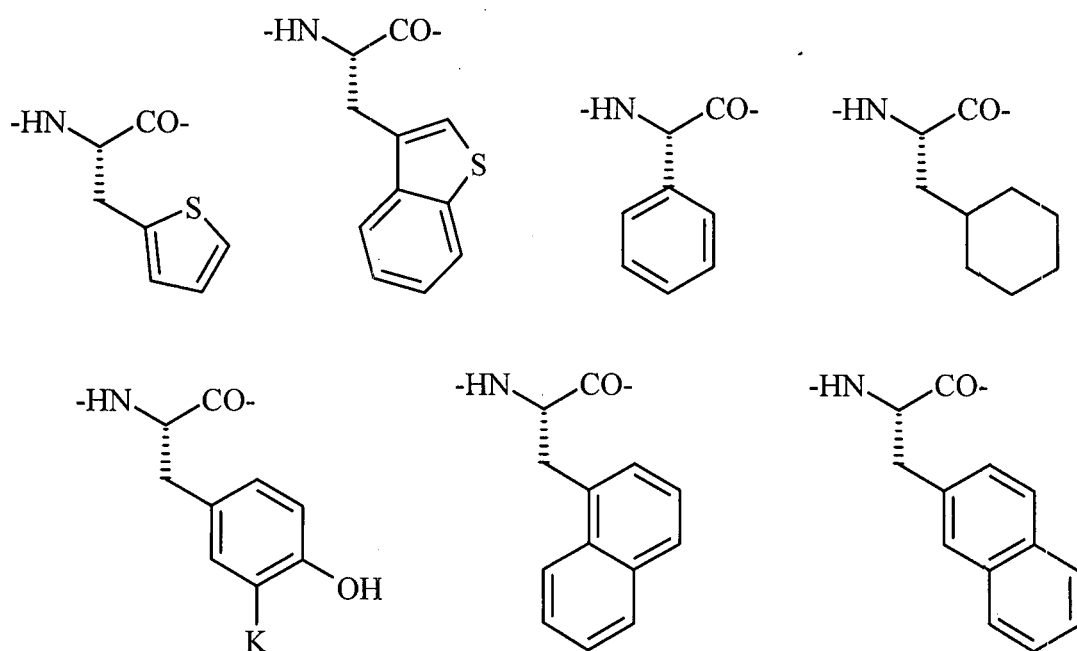
K es F, Cl, I, o NO₂,

Xaa₂ es Gli o β-Ala;

C-3: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₅¹³-Xaa₆¹⁴-ZH,

donde

Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación:



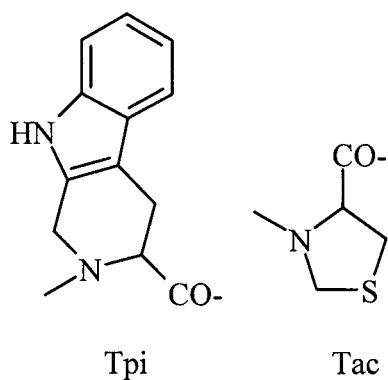
K es F, Cl, I, o NO₂,

Xaa₂ es Gli o β-Ala,

Xaa₅ es Leuψ-CH₂NH-,

Xaa₆ es Cys, Phe, Trp, Tpi o Tac,

donde Tpi y Tac tienen el siguiente significado:



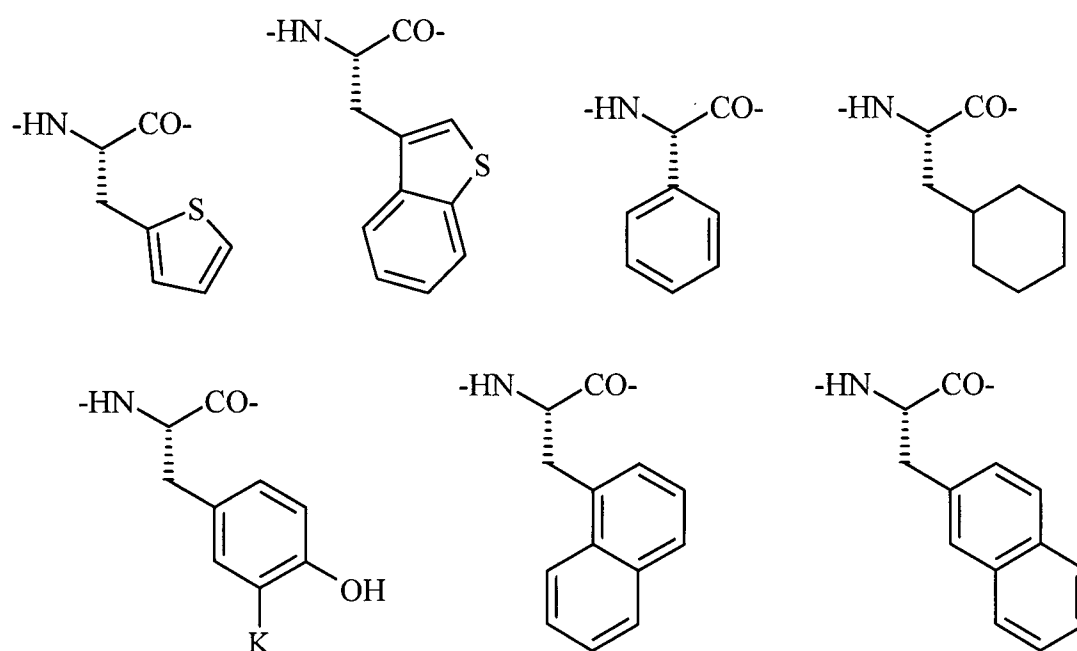
y

Z es NH, u O;

C-4: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₇,

donde

Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación:



K es F, Cl, I, o NO_2 ,

Xaa₂ es Gli o β -Ala,

Xaa₇ es Leu-O-Alquilo, o Leu-NH-alquilo.

La invención también se refiere a sales aceptables para uso farmacéutico de dichos conjugados antagonistas peptídicos análogos a la bombesina con un ácido inorgánico u orgánico, y además a hidratos, complejos, ésteres, amidas, solvatos y prodrogas de dichos compuestos con la Fórmula química general (I).

Descripción A (quelante para metales):

En una forma de realización preferida de la presente invención, el quelante para metales (A) es un quelante para metales trivalentes o para metales pentavalentes y sus análogos cercanos.

Preferiblemente, el quelante (A) para metales trivalentes se selecciona entre el grupo que comprende:

quelantes a base de DOTA-, NODASA-, NODAGA-, NOTA-, DTPA-, EDTA-, TETA-, y TRITA- y sus análogos cercanos,

donde

DOTA significa ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N'''-tetraacético,

DTPA significa ácido dietilentriaminapentaacético,

EDTA significa ácido etilendiamina-N, N'-tetraacético,

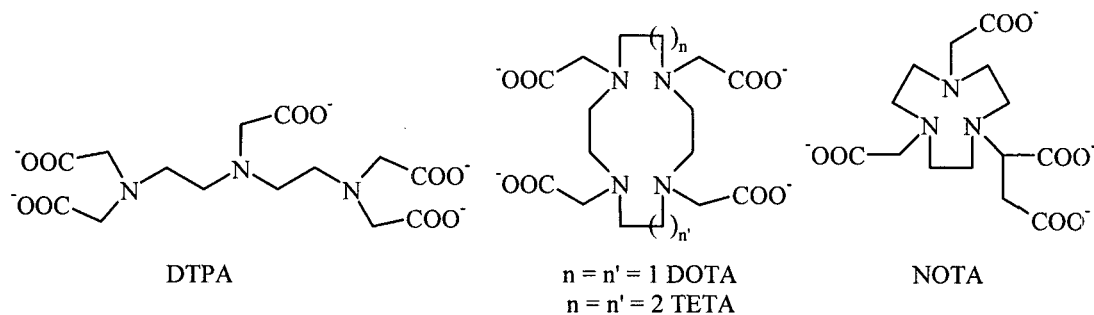
TETA significa ácido 1,4,8,11-tetraazaciclododecano-1,4,8,11-tetraacético, y

NOTA significa ácido 1,4,7-triazaciclononanotriacético.

Más preferiblemente, el quelante (A) para metales trivalentes se selecciona entre el grupo que comprende:

quelantes a base de DOTA-, NOTA-, DTPA-, y TETA- y sus análogos cercanos.

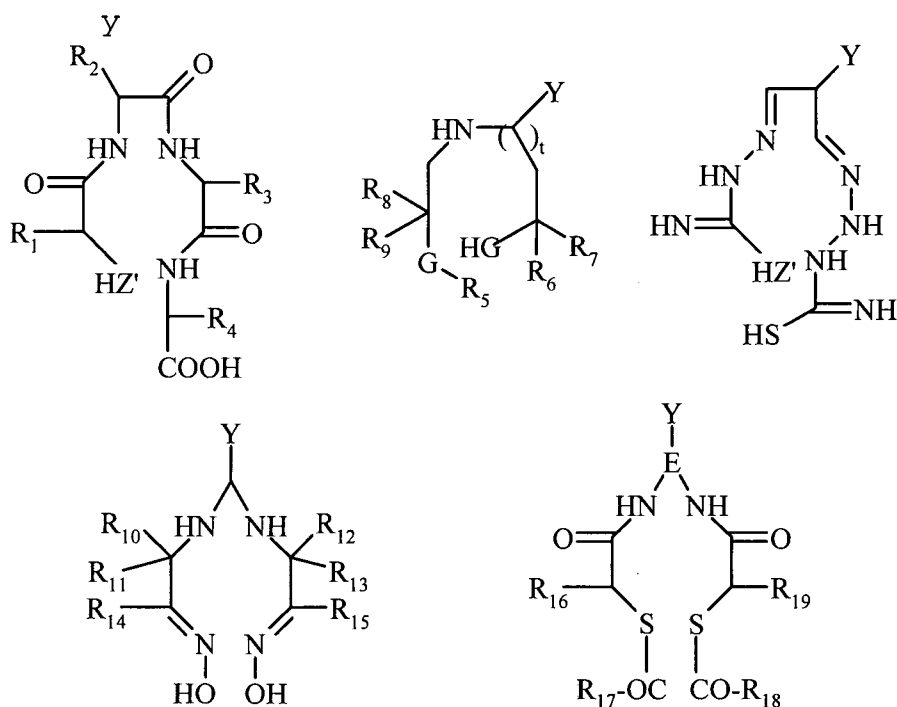
Las estructuras de dichos ligandos quelantes en su forma completamente desprotonada se muestran a continuación.



Aún más preferiblemente, el quelante (A) para metales trivalentes se selecciona entre el grupo que comprende DTPA (ácido dietilentriaminapentaacético) y macrociclos poliaza-policarboxilato tales como DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N'''-tetraacético) y sus análogos cercanos.

Preferiblemente, el quelante (A) para metales penta-
valentes se selecciona entre el grupo que comprende

2-hidrazino nicotinamida (HYNIC), quelantes N_4 , N_4-X
(N_4 puede ser lineal o macrocíclico y X puede ser una amina
azida, OH, halógeno, o-, m-, p-amino bencil
metaparacarboxibencilo, y quelantes carboxi (Nock, B. et
al. (2003 [^{99m}Tc]Demobesin 1, a novel bombesin analogue for
GRP receptor-targeted tumour imaging. *Eur. J. Nucl. Mol.*
Imaging, 30, 247-258)), Desferrioxamina (DFO), y $N_rS_{(4-r)}$.



donde

R_1-R_{15} son, independientemente entre sí, otros átomos
de hidrógeno o grupos (C_1-C_4) alquilo,



donde, en la unidad de la fórmula anterior, t
es 1 ó 2 ó 3 y por lo menos uno de los átomos de carbono en



dicha unidad está sustituido con Y o no está sustituido con Y,

R_{16} es un átomo de hidrógeno o un grupo CO_2 ($\text{C}_1\text{-C}_4$) alquilo;

R_{17} y R_{18} son, independientemente entre sí, otros grupos ($\text{C}_1\text{-C}_4$) alquilo o grupos fenilo;

R_{19} es $\text{CH}_2\text{-COOH}$ o un derivado funcional de los mismos; E es ($\text{C}_1\text{-C}_4$)alquilenos, o fenileno;

Opcionalmente, el ($\text{C}_1\text{-C}_4$)alquilenos está sustituido con $\text{CO}_2\text{-alquilo}$, $\text{CH}_2\text{-COalquilo}$, CONH_2 , o $\text{CONHCH}_2\text{-CO}_2\text{-alquilo}$;

opcionalmente, el fenileno está sustituido con $\text{CO}_2\text{-alquilo}$,

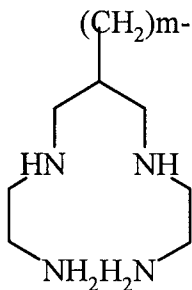
donde los grupos alquilo tienen entre 1 y 4 átomos de carbono;

G es NH o S;

Y es un grupo funcional que puede unirse a un grupo amino libre del péptido (N-terminal) o con el separador; y

Z' es S u O.

Los quelantes N_4 son preferiblemente,



donde

m significa un entero entre 1 y 4.

Los quelantes $N_rS_{(4-r)}$ se definen donde r es un entero

entre 1 y 4.

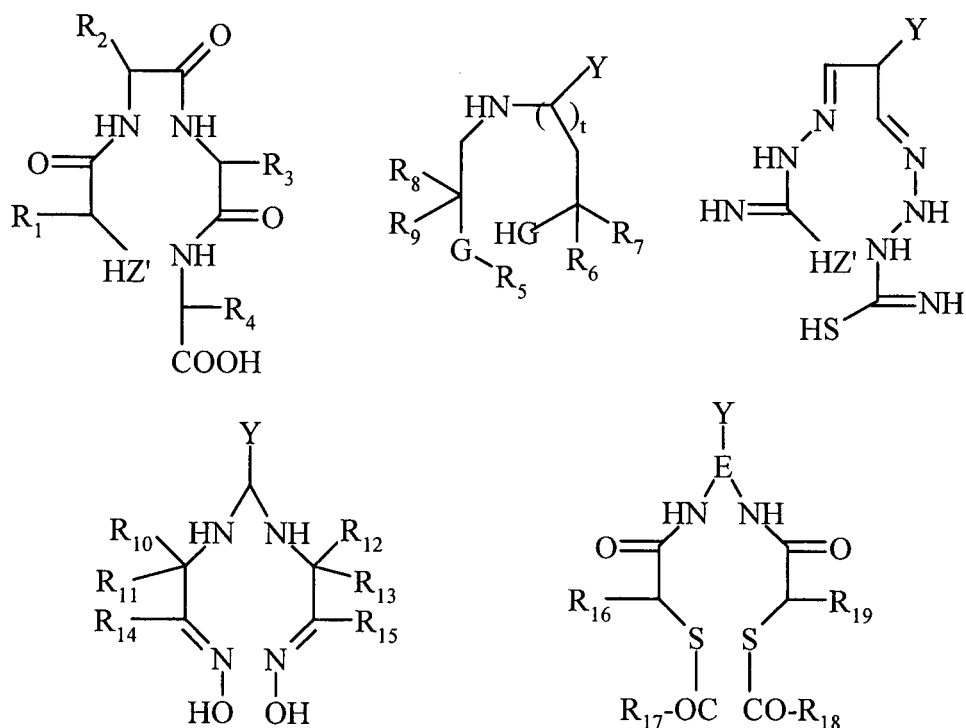
Dicho grupo funcional Y preferiblemente comprende isocianato, isotiocianato, formilo, halonitrofenilo, diazonio, epoxi, tricloro-s-triazinilo, etilenimino, clorosulfonilo, alcoxicarb-imidoilo, (sustituido o no sustituido) alquilcarboniloxicarbonilo, alquilcarbonilimidazolilo, succinimido-oxicarbonilo; donde dicho grupo está unido a un birradical (C_1-C_{10}) hidrocarburo. Los ejemplos apropiados de birradicales hidrocarburo son los birradicales derivados de benceno, (C_1-C_6) alcanos, (C_2-C_6) alquenos y (C_1-C_4)-alquilbencenos, y sus análogos cercanos.

Preferiblemente, los quelantes $N_tS_{(4-t)}$ se seleccionan entre el grupo que comprende

quelantes a base de bisamino bistiol (BAT) para un radionúclido de tecnecio como metal,

mercapto-acetil-glicil-glicil-glicina (MAG3) para un radionúclido de tecnecio como metal y sus análogos cercanos.

Más preferiblemente, el quelante (A) para metales pentavalentes se selecciona entre el grupo que comprende



y sus análogos cercanos,

donde R_1 - R_{19} , Z' , Y , G y t son según se definieron antes.

Preferiblemente, r es un entero de entre 2 y 4 y más preferiblemente r es 2 ó 3.

Preferiblemente, m significa un entero entre 1 y 2, más preferiblemente m es 1.

En US 5.367.080 A, US 5.364.613 A, US 5.021.556 A, US 5.075.099 A, US 5.886.142 A, cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad se divulgan quelantes para metales bien conocidos tales como quelantes lineales, macrocíclicos, de tetrapiridina y N_3S , N_2S_2 ó N_4 .

En US 5.720.934 A cuya divulgación se incorpora aquí como referencia en su totalidad, se divulgan quelantes para metales bien conocidos tales como quelantes a base de HYNIC, DTPA, EDTA, DOTA, TETA, bisamino bistirol (BAT).

En Doulias et al. (2003) *Endosomal and lysosomal*

effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. Free Radic. Biol. Med., Vol. 35, Entrega 7: 719-28 se divulgan quelantes para metales bien conocidos tales como Desferrioxamina (DFO).

Hay disponible un amplia variedad de agentes quelantes y se puede ver una revisión en Banerjee et al., (*Nucl. Med. and Biology*, 2005, 32, 1-20 y referencias citadas allí) que se incluye aquí como referencia.

La 2-hidrazino nicotinamida (HYNIC) es otra clase de grupo quelante (A), en presencia de un coligando que se ha utilizado ampliamente para la incorporación de ^{99m}Tc y $^{186,188}\text{Re}$ (Schwartz et al. *Bioconj. Chem.*, 1991, 2, 333-6; Babich et al., *J. Nucl. Med.*, 1993, 34, 1964-70; *Nucl. Med. Biol.*, 1995, 22, 25-30; *Nucl. Med. Biol.*, 1995, 22, pp. 32, pp. 1-10)

En la literatura se describe al DTPA que se utiliza en el Octreoscan® (que comercializa Covidian) para complejar ^{111}In y diversas modificaciones (Brechtel et al., *Bioconj. Chem.*, 1991, 2, 187-194; Li et al., *Nucl. Med. Biol.*, 2001, 28, 145-154).

Los quelatos del tipo DOTA para aplicaciones en radioterapia han sido descritos por Tweedle et al., Pat. US 48885363. Otros macrociclos poliaza para quelar isótopos de metales trivalentes han sido descritos por Maecke et al en *Bioconj. Chem.*, 2002, 13, 530 y se incluyen aquí como referencia.

Quelantes N_4 , ^{99m}Tc - N_4 -quelante se han utilizado para marcar péptidos en el caso de la minigastrina para dirigirla hacia receptores CCK-2 (Nock et al., *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, 1727-36).

En una forma de realización preferida de la presente invención, el radionúclido de metal es apropiado para complejarse con un quelante para metales y dar un quelato de metal radioactivo para el diagnóstico por imágenes. Preferiblemente, el radionúclido de metal se selecciona entre el grupo que comprende ^{133m}In , ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{52}Fe , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{203}Pb , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{51}Cr , ^{52m}Mn , ^{157}Gd , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{64}Cu y ^{82}Br . Más preferiblemente, el radionúclido de metal se selecciona entre el grupo que comprende ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , y ^{123}I . Aún más preferiblemente el radionúclido de metal es ^{68}Ga . Aún más preferiblemente el radionúclido de metal es ^{99m}Tc .

En una forma de realización preferida de la presente invención, el radionúclido de metal es apropiado para complejarse con un quelante para metales y dar un quelato de metal radioactivo para radioterapia. Preferiblemente, el radionúclido de metal se selecciona entre el grupo que comprende ^{186}Re , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{69}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{188}Rd , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{172}Tm , ^{90}Y , ^{111}In , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{125}I , ^{123}I , ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{129}I , ^{64}Cu y ^{177m}Sn . Más preferiblemente, el radionúclido de metal se selecciona entre el grupo que comprende ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{68}Ga , y

^{177}Lu .

En una alternativa adicional del primer aspecto, el radionúclido de metal apropiado es un halógeno radioactivo (isótopos de yodo y bromo), el halógeno radioactivo está unido directamente al péptido, como por ejemplo por reacción química a una unidad Tyr o Trp dentro del péptido, u opcionalmente **A** puede ser Tyr o Trp.

Los agentes preferidos para radiodiagnóstico (^{67}Ga , ^{111}In) y agentes radioterapéuticos (^{90}Y , ^{153}Sm , ^{177}Lu) opcionalmente contienen un ion de metal +3 quelado de la clase de elementos conocidos como lantánidos. Los metales radioactivos típicos de esta clase incluyen los isótopos $^{90}\text{Itrio}$, $^{111}\text{indio}$, $^{149}\text{Prometio}$, $^{153}\text{Samario}$, $^{166}\text{Disprosio}$, $^{166}\text{Holmio}$, $^{175}\text{Iterbio}$, y $^{177}\text{Lutecio}$. Todos dichos metales (y otros de la serie de los lantánidos) tienen químicas muy similares, porque permanecen en el estado de oxidación +3 y prefieren unirse a ligandos quelantes que contengan átomos donadores duros (oxígeno/nitrógeno).

Descripción B (separador):

B es un conector separador que conecta con un N terminal de C o una unión covalente.

En una forma de realización preferida de la presente invención B es un compuesto con la Fórmula (II)



donde

B_1 es una unión covalente, un aminoácido natural, un aminoácido no natural, una diamina lineal o una diamina

cíclica,

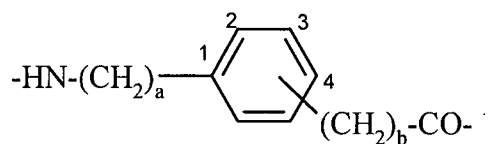
B₂ es una unión covalente, un aminoácido natural, un aminoácido no natural, un ácido carboxílico lineal o un ácido carboxílico cíclico,

con la condición de que ambos B₁ y B₂ no pueden ser uniones covalentes al mismo tiempo y que, cuando B₁ es una diamina, B₂ es un ácido carboxílico (*es decir*, en este caso B₂ no puede ser una unión ni un aminoácido natural o no natural).

Preferiblemente el aminoácido no natural es un compuesto con cualquiera de las fórmulas (III), (IV), (V) o (VI)

donde

(III)



donde

a es un entero entre 0 y 3,

b es un entero entre 0 y 3,

y patrones de sustitución relacionados u opcionalmente

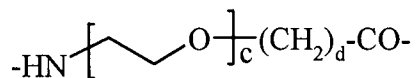
1,2-, 1,3- ó 1,4-

Preferiblemente,

a es 0 ó 1,

b es 0 ó 1,

(IV)



donde

c es un entero entre 1 y 24,

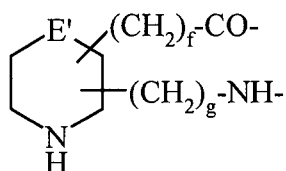
d es un entero entre 1 y 6.

Preferiblemente,

c es un entero entre 1 y 15, más preferiblemente c es entre 1 y 8,

d es un entero entre 1 y 3, más preferiblemente d es 1.

(V)



donde

E' es NH, o CH₂,

f es un entero entre 0 y 6,

g es un entero entre 0 y 6;

cuando E' es CH₂, entonces el anillo de 6 miembros opcionalmente está sustituido en cualquier posición del anillo de 6 miembros que sea un carbono, sobre el mismo carbono del anillo o sobre carbonos diferentes,

cuando E' es NH, entonces el anillo de 6 miembros opcionalmente está sustituido en cualquier posición del anillo de 6 miembros que sea un carbono, sobre el mismo átomo de carbono del anillo o sobre átomos de carbono diferentes y/o sobre el átomo de nitrógeno con la salvedad de que f o g debe ser un entero mayor o igual que 1.

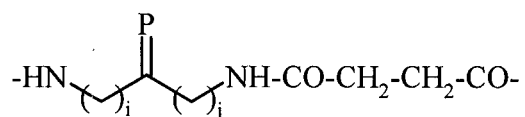
Preferiblemente,

E' es NH,

f es un entero entre 0 y 3,

g es un entero entre 0 y 3;

(VI)



donde

i es un entero entre 1 y 6,

j es un entero entre 1 y 6,

P es O o H₂.

Preferiblemente,

i es un entero entre 1 y 3,

j es un entero entre 1 y 3,

P es O.

Más preferiblemente, el separador se selecciona entre el grupo que comprende 4-amino-1-carboximetilpiperidina, ácido (R,S)-diaminoacético, PEG₁₋₂₄, Sar₅₋₁₀, ácido 8-aminooc-tanoico, ácido 6-aminocaproico, 4-(2aminoetil)-1-carboxime-til piperazina, ácido diaminobutirico, ácido hipúrico, ácido 4-amino-1-Boc-piperidina-4-carboxílico, ácido Gly-aminobenzoico, ácido 5-amino-3-oxa-pentil-succinamico, Peg₁₋₂₄-4-amino-1-carboximetil piperidina, Dab(ácido shikímico), (D-Gln)_x, (D-Asn)_x.

Descripción C (secuencia del antagonista peptídico análogo a la bombesina)

En una forma de realización preferida de la presente invención, la secuencia del antagonista peptídico análogo a la bombesina se selecciona entre el grupo que comprende C-1

a C-3, preferiblemente C-1 a C-2.

Preferiblemente, la secuencia del antagonista peptídico análogo a la bombesina se selecciona entre el grupo que comprende:

Compuesto 1 Seq: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compuesto 9 Seq: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ (CHOH-CH₂) - (CH₂)₂-CH₃;

Compuesto 12 Seq: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ (CH₂NH) - Phe-NH₂;

Compuesto 13 Seq: Dphe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ (CH₂NH) - Cys-NH₂.

Preferiblemente, el conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina con la Fórmula (I) que comprende por lo menos un radionúclido de metal se selecciona entre el grupo que comprende

Compuesto 1: DOTA-Gly-aminobenzoil-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compuesto 2: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidina-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compuesto 3: DOTA-ácido 4-amino-1-piperidina-4-carboxílico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compuesto 4: DOTA-ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compuesto 5: DOTA-(ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico)-(4-amino-1-carboximetil-

piperidina) -D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compuesto 6: DOTA-ácido diaminobutírico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compuesto 7: DOTA-4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazina-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compuesto 8: DOTA-ácido (5-amino-3-oxa-pentil)succinámico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Compuesto 9: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidina-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

Compuesto 10: DOTA-(ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-4-amino-1-carboximetil-piperidina-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

Compuesto 11: DOTA-ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

Compuesto 12: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidina-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂;

Compuesto 13: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidina-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂;

Compuesto 14: N₄-triazoles-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂.

Otras formas de realización preferidas:

En una forma de realización preferida de la presente invención, para el compuesto con la Fórmula (I), x es un entero entre 1 y 2, preferiblemente x es 1.

Cuando x es mayor o igual que 2, entonces (B)_n es un separador lineal o un separador ramificado conectado al N-

terminal del antagonista peptídico análogo a la bombesina (C).

En una forma de realización preferida de la presente invención, para el compuesto con la Fórmula (I), n es un entero entre 1 y 4, preferiblemente n es 1 ó 3, más preferiblemente 1.

En una forma de realización preferida de la presente invención, para el compuesto con la Fórmula (I), A es adicionalmente un quelante para metales que comprende por lo menos un átomo de metal "frío" [no radioactivo] correspondiente o equivalente al radionúclido de metal de la lista anterior. Dichos compuestos son útiles para ensayos de unión in vitro o in vivo y como compuestos de referencia. Las formas de realización preferidas de la lista anterior son válidas aquí.

En una forma de realización preferida de la presente invención, para el compuesto con la Fórmula (I), K es adicionalmente H o preferiblemente H.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a precursores de conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina que se unen selectivamente a receptores de bombesina y que más en particular se unen al receptor de GRP sin suscitar la internalización al interior de la célula y sin señalar mediante la movilización de calcio a la vez que antagoniza los efectos inducidos por el agonista en dichos dos sistemas, donde el conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina tiene la Fórmula general (I')



donde

x es un entero entre 1 y 3,

n es un entero entre 1 y 6

A' es un quelante para metales,

B es un conector separador que conecta con un N terminal de C o una unión covalente,

C es un antagonista peptídico análogo a la bombesina con la secuencia C-1 a C-4.

El quelante para metales A' es un quelante para metales libre de radionúclido de metal según se define en el primer aspecto para A.

El separador B y el antagonista peptídico análogo a la bombesina C son según se definieron antes en el primer aspecto.

La invención también se refiere a sales aceptables para uso farmacéutico de los conjugados antagonistas peptídicos análogos a la bombesina con un ácido inorgánico u orgánico, y a hidratos, complejos, ésteres, amidas, solvatos y prodrogas de dichos compuestos con la Fórmula química general (I').

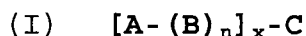
En una forma de realización preferida de la presente invención, x es un entero entre 1 y 2, preferiblemente x es 1. Cuando x es mayor o igual que 2, entonces (B)_n es un separador lineal o un separador ramificado conectado al N-terminal del antagonista peptídico análogo a la bombesina (C).

En una forma de realización preferida de la presente invención, en la Fórmula (I'), n es un entero entre 1 y 4, preferiblemente n es 1 ó 3, más preferiblemente 1.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende conjugados antagonistas peptídicos análogos a la bombesina con la Fórmula (I) o (I') y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere al uso de conjugados antagonistas peptídicos análogos a la bombesina con la Fórmula (I) o (I') para unirse a receptores de bombesina y más en particular al receptor del péptido liberador de gastrina (GRP) y/o para inhibir a los receptores de bombesina y más en particular al receptor del péptido liberador de gastrina (GRP).

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método para preparar un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina con la Fórmula general (I)



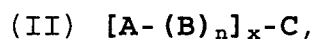
donde n, x, A, B y C son según se definieron antes, que comprende el paso de

- Radioquedar el conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina con la Fórmula general (I') según se definió anteriormente con un radionúclido de metal apropiado o un átomo de metal correspondiente a un radionúclido de metal de la lista anterior.

Preferiblemente, el método para preparar un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina con la Fórmula

general (I) comprende el paso de radioquelar con un radionúclido de metal apropiado.

En otra realización, el método para preparar un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene la fórmula general (I)



donde n, x, A, A', B y C son como se definió con anterioridad,

comprende adicionalmente los siguientes pasos:

- a) unir un separador B a un antagonista peptídico análogo a la bombesina C para obtener un separador-antagonista peptídico análogo a la bombesina con la secuencia C-1 a C-4, opcionalmente repetir el paso a); y
- b) unir un separador-antagonista peptídico análogo a la bombesina con un quelante de metales A' para obtener un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene la fórmula general (I'), opcionalmente repetir el paso b),

donde los pasos anteriores ocurren antes del radioquelado del conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene la fórmula general (I') con un radionucleido metálico o un átomo metálico apropiado, los cuales corresponden o son equivalentes a los radionucleidos metálicos indicados con anterioridad.

En una realización preferida de la presente invención, n, x, el quelante de metales A, el quelante de metales A',

el separador B y el antagonista peptídico análogo a la bombesina C son como se definió con anterioridad.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con un método para efectuar el diagnóstico por imágenes receptores de la bombesina, y más particularmente, células tumorales y/o vasos tumorales y peritumorales donde se expresa el receptor de GRP en un paciente, que comprende los siguientes pasos:

- administrarle a un paciente una cantidad eficaz como radiofármaco de un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene la fórmula (I); y
- realizar el diagnóstico por imágenes del radionucleido metálico en el paciente.

Una realización preferida del sexto aspecto se relaciona con el uso de una cantidad eficaz como radiofármaco de un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina, que tiene la fórmula (I), para la fabricación de un agente para realizar el diagnóstico por imágenes de receptores de bombesina, y más particularmente, células tumorales y/o vasos tumorales y peritumorales donde se expresa el receptor de GRP.

En una realización preferida, las células tumorales hacen referencia a cánceres seleccionados del grupo que comprende

- cáncer de próstata, incluyendo sus metástasis,
- cáncer de mama, incluyendo sus metástasis,
- tumores del estroma gastrointestinal,

- carcinomas de células pulmonares pequeñas,
- carcinomas de células renales,
- tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos,
- cánceres de células escamosas de cabeza y cuello,
- neuroblastomas, y
- cánceres de células escamosas de esófago.

Aún más preferiblemente, las células tumorales hacen referencia a cánceres seleccionados del grupo que comprende

- cáncer de próstata, incluyendo sus metástasis, y
- cáncer de mama, incluyendo sus metástasis.

En otra realización preferida, los vasos tumorales y peritumorales hacen referencia a cánceres seleccionados entre

- cánceres de ovario,
- cánceres de endometrio y
- cánceres de páncreas.

Preferiblemente, los vasos tumorales y peritumorales hacen referencia a cánceres de ovario.

En un séptimo aspecto, la invención se relaciona con un método para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con las células tumorales y/o los vasos tumorales y peritumorales, que comprende el siguiente paso:

- administrar una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene la fórmula (I).

Una realización preferida del séptimo aspecto se relaciona con el uso de una cantidad eficaz para el uso tera-

péutico de un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene la fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con las células tumorales y/o los vasos tumorales y peritumorales.

En una realización preferida, las enfermedades relacionadas con las células tumorales hacen referencia a cánceres seleccionados del grupo que consiste en

- cáncer de próstata, incluyendo sus metástasis,
- cáncer de mama, incluyendo sus metástasis,
- tumores del estroma gastrointestinal,
- carcinomas de células pulmonares pequeñas,
- carcinomas de células renales,
- tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos,
- cánceres de células escamosas de cabeza y cuello,
- neuroblastomas, y
- cánceres de células escamosas de esófago.

Aún más preferiblemente, las enfermedades relacionadas con las células tumorales hacen referencia a cánceres seleccionados del grupo que consiste en

- cáncer de próstata, incluyendo sus metástasis, y
- cáncer de mama, incluyendo sus metástasis.

En otra realización preferida, las enfermedades relacionadas con los vasos tumorales y peritumorales hacen referencia a cánceres seleccionados entre

- cánceres de ovario,
- cánceres de endometrio y

- cánceres de páncreas.

Preferiblemente, las enfermedades relacionadas con los vasos tumorales y peritumorales hacen referencia a cánceres de ovario.

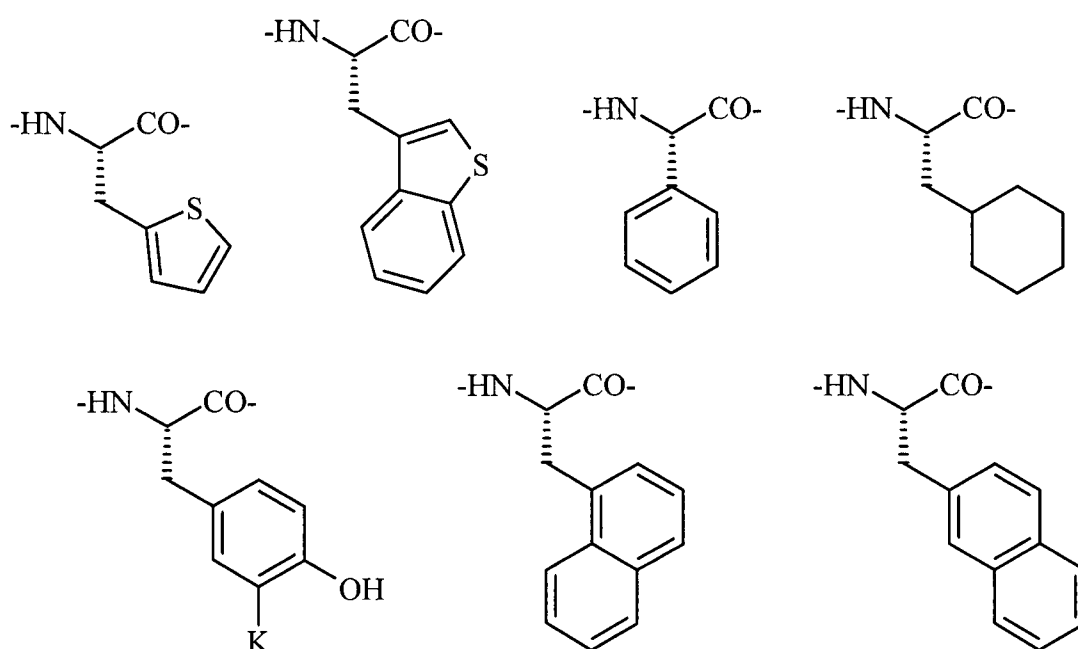
En un octavo aspecto, la invención se relaciona con un conjunto de elementos para la preparación de un agente radioterapéutico o un agente radiofarmacéutico para diagnóstico por imágenes que tiene la fórmula (I), donde dicho conjunto de elementos comprende un recipiente que contiene una cantidad predeterminada de un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de fórmula (I') y un vehículo, un diluyente, un excipiente o un coadyuvante aceptable para el uso farmacéutico, para radiomarcarse un quelante de metales.

En un noveno aspecto, la invención se refiere a un antagonista peptídico análogo a la bombesina con la secuencia C-1 a C-4, donde

C-1: $\text{Xaa}_1^6\text{-Gln}^7\text{-Trp}^8\text{-Ala}^9\text{-Val}^{10}\text{-Xaa}_2^{11}\text{-His}^{12}\text{-Xaa}_3^{13}\text{-Xaa}_4^{14}\text{-ZH,}$

donde

Xaa_1 es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación:



K es F, Cl, I, o NO_2 ,

Xaa₂ es Gli o β -Ala,

Xaa₃ es Estatina, análogos e isómeros de Estatina, 4-Am,5-MeHpA, 4-Am,5-MeHxA o aminoácidos sustituidos en α ,

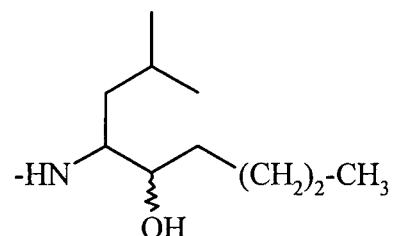
Xaa₄ es Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle, o iso-Bu-Gly, y

Z es NH u O;

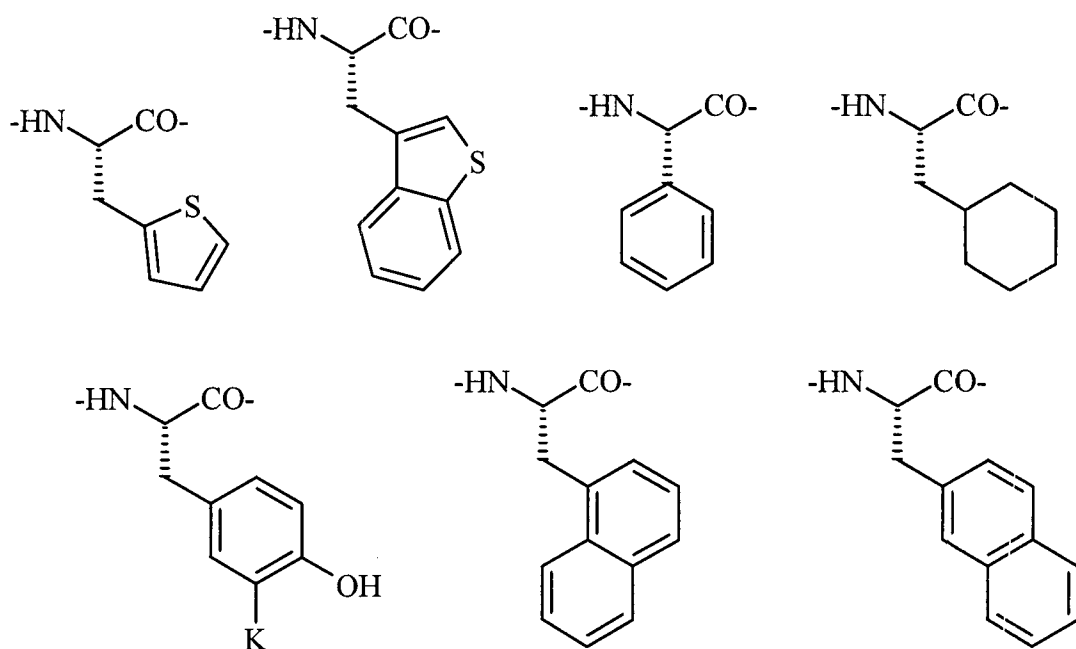
C-2: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

donde

Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃ es



Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación:



Y

K es F, Cl, I, o NO₂,

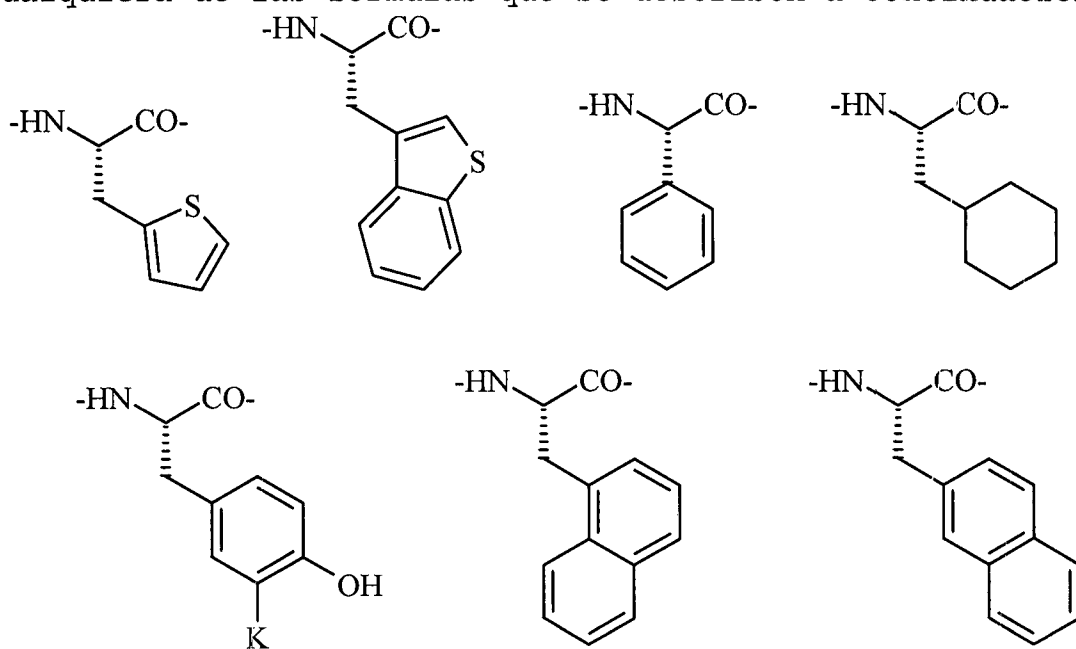
Xaa₂ es Gli o β-Ala;

C-3: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₅¹³-Xaa₆¹⁴-

ZH,

donde

Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación:



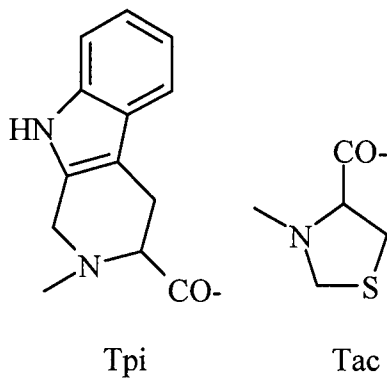
K es F, Cl, I, o NO_2 ,

Xaa₂ es Gli o β -Ala,

Xaa₅ es Leu ψ -CH₂NH-,

Xaa₆ es Cys, Phe, Trp, Tpi o Tac,

donde Tpi y Tac tienen el siguiente significado:



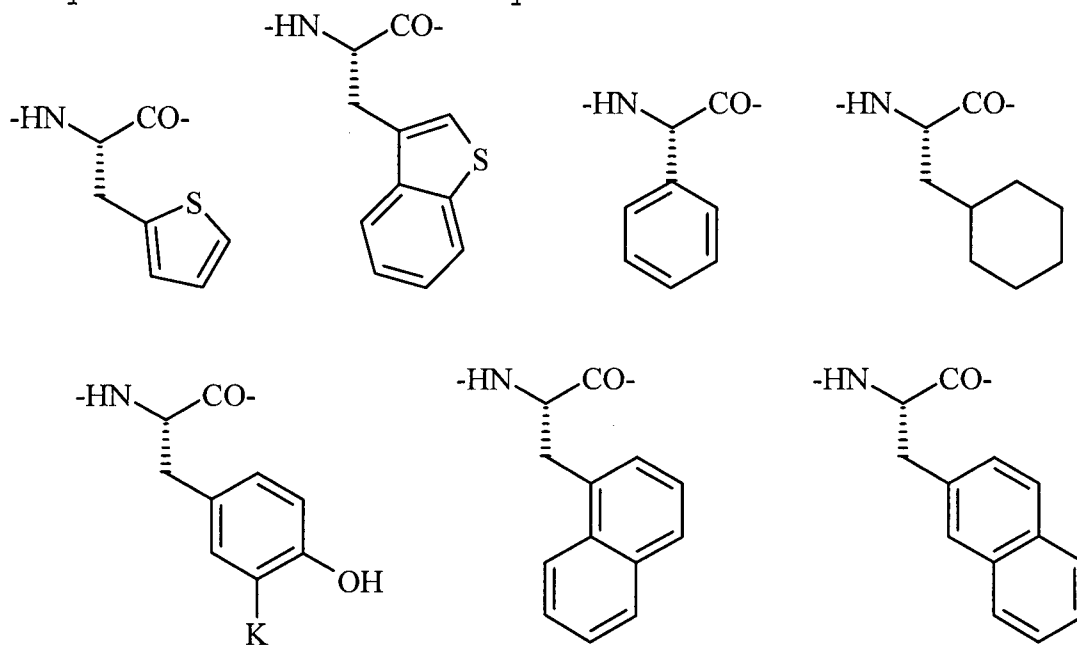
y

Z es NH, u O;

C-4: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₇,

donde

Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación:



K es F, Cl, I, o NO_2 ,

Xaa₂ es Gli o β -Ala,

Xaa₇ es Leu-O-Alquilo, o Leu-NH-alquilo.

DEFINICIONES

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "alquilo", solo o como parte de otro grupo, hace referencia a un grupo alquilo de cadena lineal o cadena ramificada con entre 1 y 20 átomos de carbono, tal como, por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, ter-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, heptilo, hexilo, decilo. Los grupos alquilo también pueden estar sustituidos, tal como con átomos de halógenos, grupos hidroxilo, grupos C₁-C₄-alcoxilo o grupos C₆-C₁₂-arilo. Más preferiblemente, el alquilo es C₁-C₁₀-alquilo, C₁-C₆-alquilo o C₁-C₄-alquilo.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "alquil(en)o inferior no ramificado o ramificado" tendrá el siguiente significado: un radical monovalente, divalente o trivalente de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido, que consiste en carbono e hidrógeno, que no contiene ninguna insaturación, y que tiene entre uno y ocho átomos de carbono, por ejemplo, sin limitaciones, metilo, etilo, n-propilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletilo (t-butilo), n-heptilo, y semejantes. Esta unidad puede estar insustituida o sustituida, tal como con átomos de halógenos, grupos hidroxilo, grupos C₁-C₄-alcoxilo o grupos C₆-C₁₂-arilo.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la

invención y las reivindicaciones, el término grupo "fenileno" se basa en un anillo de benceno di u opcionalmente trisustituido. Por ejemplo, el poli(p-fenileno) es un polímero compuesto por unidades repetidas de para-fenileno. El fenileno puede estar sustituido o insustituido. Puede estar sustituido con halógenos, OH, alcoxilo, preferiblemente C₁-C₄-alcoxilo, carboxilo, éster, preferiblemente C₁-C₄-éster, amida, nitro.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "alqueno" tendrá el siguiente significado: un compuesto químico insaturado, alifático o alicíclico, que contiene al menos un enlace doble entre carbonos. Los alquenos cíclicos más simples, que solamente tienen un enlace doble y carecen de otros grupos funcionales, forman una serie homóloga de hidrocarburos con la fórmula general C_nH_{2n}, por ejemplo, etileno (C₂H₄), propileno (C₃H₆). Los alquenos pueden estar sustituidos o insustituidos. Si el alqueno está sustituido, puede estar sustituido con átomos de halógenos, grupos hidroxilo, grupos C₁-C₄-alcoxilo o grupos C₆-C₁₂-arilo, o semejantes.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "arilo" hace referencia a un sistema de anillos insaturado, preferiblemente un sistema de anillos aromáticos, que más preferiblemente tiene entre 6 y 12 átomos de carbono en el esqueleto de los anillos. Los ejemplos incluyen fenilo y naftalenilo.

Las unidades de arilo pueden estar insustituidas o sustituidas, tal como con átomos de halógenos, grupos hidroxilo, grupos C_1-C_4 -alcoxilo o grupos C_6-C_{12} -arilo.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "benceno" tendrá el siguiente significado: un compuesto químico orgánico con la fórmula C_6H_6 . El benceno es un hidrocarburo aromático, y es el segundo $[n]$ -anuleno ($[6]$ -anuleno), un hidrocarburo cíclico con un enlace π continuo. El benceno puede estar insustituido o sustituido, tal como con átomos de halógenos, grupos hidroxilo, grupos C_1-C_4 -alcoxilo o grupos C_6-C_{12} -arilo.

Como se los usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, los términos "alqueniilo" y "alquinilo" se definen de manera similar al alquilo, pero contienen al menos un enlace doble o triple entre carbonos, respectivamente. Más preferiblemente, el alqueniilo puede ser un C_2-C_6 -alqueniilo, y el alquinilo puede ser más preferiblemente un C_2-C_6 -alquinilo.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "halógeno" hace referencia a F, Cl, Br o I.

Como se los usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, los términos "sales de ácidos inorgánicos u orgánicos", "ácido inorgánico" y "ácido orgánico" hacen referencia a ácidos minerales, incluyendo, sin limitaciones, ácidos tales como ácido

carbónico, nítrico, fosfórico, clorhídrico, perclórico o sulfúrico, o sus sales ácidas, tales como las sales de potasio, sodio, calcio, magnesio, p.ej., hidrógeno sulfato de potasio, o ácidos orgánicos apropiados, incluyendo, sin limitaciones, ácidos tales como ácidos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos, p. ej., los ácidos fórmico, acético, trifluoracético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, fumárico, pirúvico, benzoico, antranílico, mesílico, fumárico, salicílico, fenilacético, mandélico, embónico, metansulfónico, etansulfónico, bencensulfónico, fantoténico, toluensulfónico, trifluormetansulfónico y sulfanílico, respectivamente. Del mismo modo, los ácidos orgánicos también pueden estar presentes como sales, tales como sales de potasio, sodio, calcio, magnesio.

Tal como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "sal aceptable para el uso farmacéutico" se relaciona con las sales de ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como ácidos minerales, incluyendo, sin limitaciones, ácidos tales como ácido carbónico, ácido nítrico o ácido sulfúrico, o ácidos orgánicos, incluyendo, sin limitaciones, ácidos tales como ácidos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos, p.ej., los ácidos fórmico, acético, trifluoroacético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico,

málico, fumárico, pirúvico, benzoico, antranílico, mesílico, salicílico, fenilacético, mandélico, embónico, metansulfónico, etansulfónico, bencensulfónico, fantoténico, toluensulfónico y sulfanílico.

Tal como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "prodroga" hace referencia a cualquier compuesto unido de manera covalente que libera el fármaco activo original de acuerdo con la fórmula (I).

El término "prodroga", como se lo usa en esta solicitud, también comprende derivados aceptables para el uso farmacológico, tales como ésteres, amidas y fosfatos, de modo que el producto resultante de la biotransformación *in vivo* del derivado sea la droga activa definida en la fórmula (I). Se describen prodrogas en la referencia de Goodman y Gilman (*The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8^a edición, McGraw-Hill, edición internacional, 1992, "Biotransformation of Drugs", 13-15), cuya descripción se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. Las prodrogas de un compuesto de la presente invención se preparan modificando los grupos funcionales presentes en el compuesto, de manera tal que las modificaciones sean separadas, tanto mediante la manipulación de rutina o *in vivo*, para obtener el compuesto relacionado. Entre las prodrogas de los compuestos de la presente invención, se incluyen aquellos compuestos donde, por ejemplo, un grupo hidroxilo, tal como el grupo

hidroxilo en el átomo de carbono asimétrico, o un grupo amino, se encuentra unido a cualquier grupo que, una vez administrada la prodroga a un paciente, se separe para formar un grupo hidroxilo o amino libre, respectivamente.

Se describen ejemplos típicos de prodrogas, por ejemplo, en WO 99/33795 A, WO 99/33815 A, WO 99/33793 A y WO 99/33792 A, cuyas descripciones se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad.

Las prodrogas se caracterizan porque presentan una solubilidad acuosa excelente y una biodisponibilidad incrementada, y porque son fácilmente metabolizadas para obtener los inhibidores activos *in vivo*.

Como se los usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, los términos "secuencia de aminoácidos" y "péptido" se definen como una poliamida que puede obtenerse mediante la (poli)condensación de al menos dos aminoácidos.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "aminoácido" hace referencia a cualquier molécula que comprende al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxilo, pero que no tiene ningún enlace peptídico. En otras palabras, un aminoácido es una molécula que tiene un ácido carboxílico funcional y un nitrógeno amínico que tiene al menos un hidrógeno libre, preferiblemente en la posición alfa, pero sin un enlace amida en su estructura. De esta manera, un dipéptido que tiene un grupo amino libre en el extremo N y

un grupo carboxilo libre en el extremo C no será considerado un simple "aminoácido" en la definición anterior. El enlace amida entre dos residuos de aminoácidos adyacentes que se obtiene a partir de una condensación determinada se define como un "enlace peptídico".

Un enlace amida, como se usa en la presente, hace referencia a cualquier enlace covalente que tiene la estructura



donde el grupo carbonilo es provisto por una molécula y el grupo NH es provisto por la otra molécula a unir. El enlace amida entre los dos residuos de aminoácidos adyacentes que se obtiene por policondensación se define como un "enlace peptídico". Opcionalmente, los átomos de nitrógeno en el esqueleto de la poliamida (indicados con anterioridad como NH) pueden alquilarse de manera independiente, por ejemplo, con $-C_1-C_6$ -alquilo, preferiblemente con $-CH_3$.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, un residuo de aminoácido deriva del aminoácido correspondiente, a través de la formación de un enlace peptídico con otro aminoácido.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, un aminoácido es un aminoácido de ocurrencia natural o no natural, donde un aminoácido no natural es un residuo de aminoácido sintético/artificial, proteinogénico y/o no proteinogénico. Adicionalmente, los residuos de aminoácidos no

90

proteínogénicos pueden clasificarse como (a) homo análogos de aminoácidos protéinogénicos, (b) a-homo análogos de residuos de aminoácidos protéinogénicos, y (c) otros residuos de aminoácidos no protéinogénicos.

Por consiguiente, los residuos de aminoácidos derivan de los aminoácidos correspondientes, por ejemplo, a partir de: aminoácidos protéinogénicos, en particular, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lis, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val; o aminoácidos no protéinogénicos, tales como homo análogos de aminoácidos protéinogénicos cuya cadena lateral ha sido extendida con un grupo metileno, por ejemplo, homoalanina (Hal), homoarginina (Har), homocisteína (Hcy), homoglutamina (Hgl), homohistidina (Hhi), homoisoleucina (Hil), homoleucina (Hle), homolisina (Hly), homometionina (Hme), homofenilalanina (Hph), homoprolina (Hpr), homoserina (Hse), homotreonina (Hth), homotriptofano (Htr), homotirosina (Hty) y homovalina (Hva); a-homo análogos de aminoácidos protéinogénicos, donde se ha insertado un grupo metileno entre el carbono α y el grupo carboxilo para obtener α aminoácidos, p.ej., α -homoalanina (α Hal), α -homoarginina (α Har), α -homoasparagina (α Has), α -homocisteína (α Hcy), α -homoglutamina (α Hgl), α -homohistidina (α Hhi), α -homoisoleucina (α Hil), α -homoleucina (α Hle), α -homolisina (α Hly), α -homometionina (α Hme), α -homofenilalanina (α Hph), α -homoprolina (α Hpr), α -homoserina (α Hse), α -homotreonina (α Hth), α -homotriptofano

(aHtr), a-homotirosina (aHty) y a-homovalina (aHva); otros aminoácidos no proteinogénicos, por ejemplo, ácido a-aminoadípico (Aad), ácido a-aminoadípico (a Aad), ácido a-aminobutírico (Abu), ácido a-aminoisobutírico (Aib), a alanina (aAla), ácido 4-aminobutírico (4-Abu), ácido 5-aminovalérico (5-Ava), ácido 6-aminohexanoico (6-Ahx), ácido 8-aminooctanoico (8-Aoc), ácido 9-aminononanoico (9-Anc), ácido 10-aminodecanoico (10-Adc), ácido 12-aminododecanoico (12-Ado), ácido a-aminosubérico (Asu), ácido azetidin-2-carboxílico (Aze), a-ciclohexilalanina (Cha), citrulina (Cit), deshidroalanina (Dha), ácido a-carboxiglutámico (Gla), a-ciclohexilglicina (Chg), propargilglicina (Pra), ácido piroglutámico (Glp), a-terbutilglicina (Tle), 4-benzoilfenilalanina (Bpa), a-hidroxilisina (Hyl), 4-hidroxiprolina (Hyp), alo-isoleucina (aIle), lantionina (Lan), (1-naftil)alanina (1-Nal), (2-naftil)alanina (2-Nal), norleucina (Nle), norvalina (Nva), ornitina (Orn), fenilglicina (Phg), ácido piperídico (Pip), sarcosina (Sar), selenocisteína (Sec), estatina (Sta), a-tienilalanina (Thi), ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinilín-3-carboxílico (Tic), alo-treonina (aThr), ácido tiazolidín-4-carboxílico (Thz), ácido a-aminobutírico (GABA), iso-cisteína (iso-Cys), ácido diaminopropiónico (Dpr), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab), ácido 3,4-diaminobutírico (aaDab), bifenilalanina (Bip), fenilalanina sustituida en la posición para con -C₁-C₆-alquilo, -haluro, -NH₂, -CO₂H o Phe(4-R) (donde R = -C₁-C₆-alquilo, -haluro, -NH₂, o -CO₂H);

ácidos nucleicos peptídicos (PNA, véase P.E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.*, 32, 624-30); o sus análogos N-alquilados, tales como sus análogos N-metilados.

Los aminoácidos cíclicos pueden ser proteinogénicos o no proteinogénicos, tales como Pro, Aze, Glp, Hyp, Pip, Tic y Thz.

Para hallar ejemplos y detalles adicionales, puede consultarse, por ejemplo, J.H. Jones, *J. Peptide Sci.*, 2003, 9, 1-8, cuya descripción se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad.

Como se los usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, los términos "aminoácido no proteinogénico" y "residuo de aminoácido no proteinogénico" también abarcan derivados de aminoácidos proteinogénicos. Por ejemplo, la cadena lateral de un residuo de aminoácido proteinogénico puede derivatizarse para convertir el residuo de aminoácido proteinogénico en "no proteinogénico". Lo mismo se aplica a los derivados de un residuo de aminoácido que se halla en el extremo C y/o el extremo N de una secuencia de aminoácidos.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, un residuo de aminoácido proteinogénico se obtiene a partir de un aminoácido proteinogénico seleccionado del grupo que consiste en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val, tanto en la configuración L como en la configuración D; el segundo

centro quiral en la Thr y la Ile pueden tener una configuración R o S. Por lo tanto, p.ej., cualquier modificación posterior a la traducción de una secuencia de aminoácidos, tal como la N-alquilación, que podría ocurrir de manera natural, genera el residuo de aminoácido modificado, "no proteinogénico", correspondiente, aunque, en la naturaleza, dicho residuo de aminoácido está incorporado en una proteína. Preferiblemente, los aminoácidos modificados se seleccionan entre aminoácidos N-alquilados, β -aminoácidos, α -aminoácidos, lantioninas, dehidroaminoácidos, y aminoácidos con motivos estructurales de guanidina alquilada.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "ácido carboxílico" o "ácido dicarboxílico" hace referencia a compuestos orgánicos que tienen una unidad COOH o dos unidades COOH, respectivamente, tales como, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido ciclohexano carboxílico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido láctico (ácidos carboxílicos) o ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido adípico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido ftálico (ácidos dicarboxílicos), respectivamente.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "diamina" hace referencia a compuestos orgánicos que tienen dos unidades $NR'R''$, donde R' y R'' pueden ser independientemente alquilo, alquénilo, alquínilo, arilo. Las diaminas pueden ser, por

ejemplo, etilendiamina, 1,4-ciclohexan diamina, piperazina.

Como se mencionó con anterioridad, los aminoácidos, los ácidos carboxílicos, los ácidos dicarboxílicos o las diaminas también incluyen específicamente los radicales respectivos obtenidos cuando dichos aminoácidos, ácidos carboxílicos, ácidos dicarboxílicos o diaminas, respectivamente, están incluidos en los compuestos de la invención, es decir, p.ej., -HN-...-CO- (aminoácido), -OC-... (ácido carboxílico), -OC-...-CO- (ácido dicarboxílico), -HN-...-NH- (diamina).

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "quelante de metales" se define como una molécula que forma un complejo con un radionucleido metálico, para formar un complejo metálico que es estable bajo condiciones fisiológicas, y que también puede conjugarse con un grupo de direccionamiento a través de un separador. El quelante de metales forma un complejo con un radionucleido metálico.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "radionucleido metálico" se define como un radionucleido que es un átomo con un núcleo inestable, donde dicho núcleo se caracteriza por un exceso de energía, la cual está disponible para transmitirla a una partícula radiactiva que puede ser creada de novo en el núcleo, o como alternativa, a un electrón atómico (véase la conversión interna). Los radionucleidos metálicos usados en la presente son

especialmente apropiados para usos de diagnóstico o terapéuticos, más preferiblemente, para el diagnóstico por imágenes o la radioterapia. En este proceso, el radionucleido sufre decaimiento radiactivo y emite (a) uno o más rayos gamma y/o partículas subatómicas. Estas partículas constituyen la radiación ionizante. Los radionucleidos pueden aparecer en la naturaleza, pero también pueden producirse por medios artificiales.

Estos radionucleidos metálicos incluyen, sin limitaciones, galio (p.ej., ^{67}Ga , ^{68}Ga), cobre (p.ej., ^{67}Cu y ^{64}Cu), tecnecio (p.ej., $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y $^{94\text{m}}\text{Tc}$), renio (p.ej., ^{186}Re y ^{188}Re), plomo (p.ej., ^{212}Pb), bismuto (p.ej., ^{212}Bi) y paladio (p.ej., ^{109}Pd). Se conocen métodos para preparar estos isótopos. Los generadores de molibdeno/tecnecio para producir $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se hallan disponibles comercialmente. Los procedimientos para producir ^{186}Re incluyen los procedimientos que se describen en Deutsch et al. (*Nucl. Med. Biol.*, Vol. 13:4:465-477, 1986) y Vanderheyden et al. (*Inorganic Chemistry*, Vol. 24:1666-1673, 1985), y los métodos para producir ^{188}Re se describen en Blachot et al. (*Intl. J. of Applied Radiation and Isotopes*, Vol. 20:467-470, 1969) y Klofutar et al. (*J. of Radioanalytical Chem.*, Vol. 5:3-10, 1970). La producción de ^{212}Pd se describe en Fawwaz et al., *J. Nucl. Med.* (1984), 25:796. La producción de ^{212}Pb y ^{21}Bi se describe en Gansow et al., *Amer. Chem. Soc. Symp.*, Ser. (1984), 241:215-217, y Kozah et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* (Enero de 1986), 83:474-478. Se

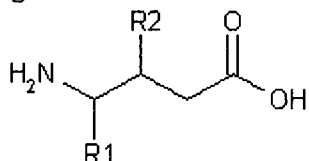
prefiere el ^{99m}Tc para el uso en el diagnóstico, y los otros radionucleidos mencionados con anterioridad tienen usos terapéuticos.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "separador" se define como un grupo conector entre el quelante de metales y los antagonistas peptídicos de bombesina.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "agonista" hace referencia a una sustancia (ligando) que se une en un sitio específico en una molécula receptora de una célula, por lo que activa la transducción de señales en la célula. Esto resulta en un efecto mensurable.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "antagonista" hace referencia a una sustancia (ligando) que se une en un sitio en una célula receptora que es específico para una sustancia agonista, de modo que bloquea este sitio para el agonista sin producir su efecto. Por consiguiente, el antagonista inhibe el efecto del agonista.

Como se lo usa más adelante en la descripción de la invención y las reivindicaciones, el término "análogo de estatina" se define como un mimético dipeptídico con la siguiente estructura genérica:



Estatina: R2 = OH, R1 puede variar significativamente, pero típicamente es igual que las cadenas laterales de los aminoácidos

Análogos de estatina: R2 = H, R1 puede variar significativamente, pero típicamente es igual que las cadenas laterales de los aminoácidos

ABREVIATURAS

NODASA = ácido 1,4,7-triazaciclononan-1-succínico-ácido-4,7-diacético

NODAGA = ácido 1,4,7-triazaciclononan-N-glutárico-ácido N',N''-diacético

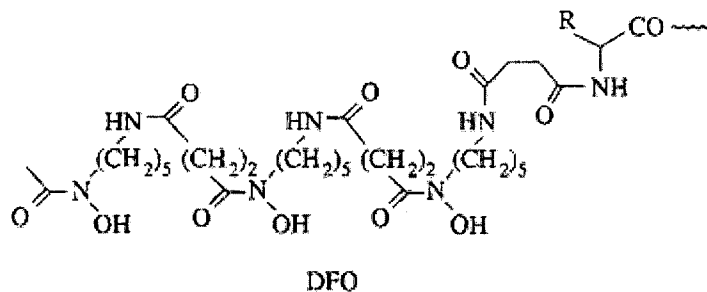
TRITA = ácido 1,4,7,10 tetraazaciclotridecan-1,4,7,10 N, N', N'', N'''-tetraacético

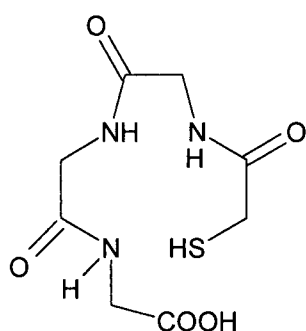
Cpa = (S)-4-carboxamidofenilalanina

4-Am-5-MeHpA = ácido 4-amino-5-metilheptanoico

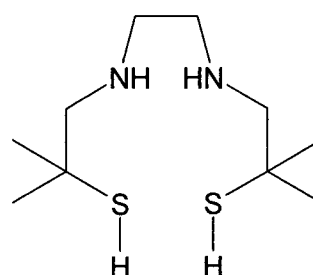
4-Am-5-MeHxA = ácido 4-amino-5-metilhexanoico

DFO = N'-[5-(acetil-hidroxi-amino)pentil]-N-[5-[3-(5-aminopentil-hidroxi-carbamil)propanoilamino]pentil]-N-hidroxi-butandiamida

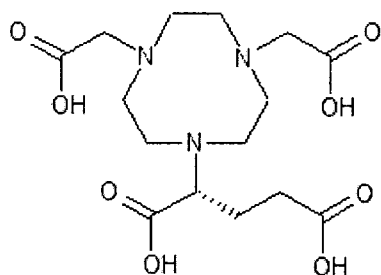




monotiol de triamida (MAG3)



bistiol de bisamina (BAT)



NODAGA

Sin una elaboración adicional, se cree que aquellos entrenados en la técnica, mediante el uso de la descripción precedente, han de poder utilizar la presente invención en su mayor extensión. Por ende, las siguientes realizaciones específicas preferidas han de interpretarse como meramente ilustrativas, y de ningún modo de manera limitativa con relación al resto de la descripción.

FIGURAS

Fig. 1: Curvas de respuesta a la dosis de análogos de bombesina, determinadas con el ensayo de liberación de calcio.

El ensayo de liberación de calcio se realizó como se describe en la sección de materiales y métodos. Se trataron células PC3 con bombesina, en concentraciones que variaron entre 0,01 nmol/l y 10 μ mol/l (●), sola o en presencia de 10 μ mol/l de los análogos de bombesina compuesto 1 (▲) o

In-compuesto 1 ($\blacklozenge$), o el compuesto 1a, un análogo de bombesina ($\blacksquare$). El compuesto 1, evaluado solo en concentraciones de 1 $\mu\text{mol/l}$, y 10 $\mu\text{mol/l}$ de compuesto 1 ($\triangle$), In-compuesto 1 ($\times$) y compuesto 1a ($\square$) no tuvieron efecto sobre la liberación de calcio en las células PC3. El compuesto 1a hace referencia a la secuencia de unión de 1, sin el conector y el quelato (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂). El compuesto 1 hace referencia al quelato (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂). In-compuesto 1 hace referencia al quelato de In (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂).

Fig. 2: Microscopía de inmunofluorescencia de células HEK-GRPR.

Microscopía de inmunofluorescencia del compuesto 1, In-compuesto 1, el compuesto 1b y GRPR-ANTAG usando el anticuerpo monoclonal contra el epítipo HA y células HEK-GRPR. (a) sin péptido, (b) con 10 nmol/l de bombesina, (c) con compuesto 1b, (d) con compuesto 1b + 10 nmol/l de bombesina, (d, f, h, j) células tratadas con 10 nmol/l de bombesina en presencia de 1 $\mu\text{mol/l}$ de los análogos compuesto 1b, GRPR-ANTAG, compuesto 1 e In-compuesto 1, (c, e, g, i) células tratadas con el compuesto 1b, GRPR-ANTAG y el compuesto 1.

Fig. 3a, 3b, 4a, 4b: Diagnóstico por imágenes por PET en ratones con tumores PC-3 (3) y LNCaP (4) con el compuesto 2 marcado con Ga-68. a) 1 hora después de la inyección de 10 MBq de radiomarca, b) bloqueado

con 100 µg de bombesina.

Fig. 6: Imagen SPECT/CT de ^{99m}Tc -ARN4-06 (15 MBq/200 pmol) en ratones con tumores PC-3.

Fig. 8: Imagen SPECT/CT de ^{99m}Tc -ARN4-05 (15 MBq/200 pmol) en ratones con tumores PC-3.

Fig. 9: Análisis de HPLC con el compuesto 2 marcado con Ga-68 en una columna de fase inversa.

Fig. 10a, b, c, d, e: Ensayo de estabilidad con el compuesto 2 marcado con Ga-68 en plasma y orina de ratón por HPLC.

Fig. 11: Estabilidad del compuesto 2 marcado con Lu-177 en suero humano.

Fig. 12: Comparación de Ga-68 RM2 en tumor/tejido con F18 FDG y F18 colina

Las descripciones completas de todas las solicitudes, las patentes y las publicaciones citadas en la presente se incorporan en su totalidad a modo de referencia en la presente.

Los ejemplos a continuación pueden repetirse con un éxito similar mediante el reemplazo de los reactivos y/o las condiciones de operación de esta invención, que se describen de manera genérica o específica, por los usados en los ejemplos precedentes.

A partir de la descripción anterior, aquellos entrenados en la técnica han de poder evaluar fácilmente las características esenciales de esta invención, y sin apartarse de su espíritu y su alcance, han de poder

realizar diversos cambios y modificaciones en la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

EJEMPLOS

donde A tiene el significado de A pero también A' según sea apropiado para todos los ejemplos que se divulgan a continuación.

Ejemplo 1 (A-B-C)

donde A tiene el significado de A pero también A' según sea apropiado para todos los ejemplos que se divulgan a continuación.

a) Síntesis de conjugados antagonistas peptídicos análogos a la bombesina con la secuencia general

(A = DOTA, B = Separador B₁ - B₂, C = Péptido con amida N-terminal Z [Z = NH])

DOTA-Separador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

Los péptidos se sintetizaron manualmente en fase sólida usando la estrategia Fmoc. Para obtener amidas N-terminales, se utilizó resina LL amida de Rink MBHA (100-200 mesh) (resina 4-(2',4'-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-4-Metilbenzhidrilaamina). En general, se cargó en el reactor resina amida de Rink MBHA con una carga teórica de 0,34 mmol/g de resina. Se agregó N,N-Dimetilformamida (DMF) al reactor y se agitó durante 30 minutos para permitir que la resina se hinche. Luego de eliminar el solvente, se agregó una solución de piperidina al 20% en DMF y la resina se agitó durante 15 minutos para

eliminar el grupo protector 9-Fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Este paso se repitió dos veces. Luego de este procedimiento, la resina se lavó tres veces durante 5 min con DMF. La solución de piperidina y la solución de DMF de los últimos tres lavados se recogieron y completaron con etanol hasta 100 ml. De esta solución se tomó una alícuota para determinar mediante espectrofotometría la cantidad de grupos protectores Fmoc eliminados.

Antes de acoplar el derivado Fmoc-aminoácido la resina se lavó dos veces durante 2 min con DMF. Se agregaron a la resina 2 equivalentes de Fmoc-aminoácido, preactivado con 2 equivalentes de N,N-Diisopropilcarbodiimida (DIC) / N-Hidroxibenzotriazol (HOBt) y el pH se ajustó hasta un valor de 8-9 por agregado de aproximadamente 4 equivalentes de N-Etilidiisopropilamina (DIPEA). La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas sometida a agitación suave. Luego de la reacción, se separó la solución y la fase sólida se lavó dos veces durante 5 min con DMF. La reacción se monitoreó usando la prueba de Kaiser. Se lavó cierta cantidad de cuentas de la resina 3 veces con etanol, se mezclaron 50 μ L de la solución 1 (20 g fenol en 10 ml de etanol con 1 ml de una solución de KCN 0,01 M en 49 ml de piridina) y se agregaron 50 μ L de solución 2 (500 g de ninhidrina en 10 ml de etanol) y las cuentas se calentaron durante 10 min a 95°C. Las cuentas azules indicaban funciones amino libres no acopladas.

Todos los aminoácidos se utilizaron como derivados

protegidos con Fmoc en el N-terminal y se acoplaron de una manera similar. Se utilizó triptofano con un grupo protector tert-butiloxicarbonilo (Boc) sobre la cadena lateral a la vez que la histidina y la glutamina se protegieron con Trt. Si al llevar a cabo la prueba de Kaiser luego de acoplar cada aminoácido, esta indicaba un acoplamiento incompleto de las funciones amino, se repetía el acoplamiento.

Luego de construir la secuencia de péptido deseada completa, la resina se lavó 5 veces con DCM seguido de 5 lavados con dietil éter, cada uno durante 2 minutos y se secó al vacío.

b) Acoplar con SEPARADOR y proquelante DOTA(^tBu)₃

El proquelante DOTA(^tBu)₃ se adquirió de Macrocyclics Inc., Dallas, EE.UU. Antes de acoplar el separador, se eliminó la protección con Fmoc en el N-terminal de los péptidos unidos a la resina. La resina se dejó hinchar durante 15 min en DMF, se trató dos veces con una solución de piperidina al 20% en DMF (15 min) y se lavó tres veces con DMF. La solución proveniente de los tratamientos con piperidina y los siguientes lavados con DMF se recogió para determinar la cantidad de grupos Fmoc separados.

Se agregaron a la resina 2 equivalentes del separador, preactivado con hexafluorofosfato de 2-(1H-9-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-amonio (HATU) durante 20 min en DMF. El pH se ajustó a 8-9 por agregado de DIPEA. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se monitoreó el acoplamiento usando la prueba de Kaiser. El

proquelante DOTA(^tBu)₃ se acopló de la misma manera luego de eliminar el Fmoc según se describió anteriormente. El producto acoplado con DOTA(^tBu)₃ se agitó durante toda la noche. Luego de eliminar la solución, la resina se lavó 3 veces con DMF, 5 veces con DCM seguido de 5 lavados con dietil éter, cada vez durante 2 minutos y se secó al vacío.

c) Desprotección, separación y purificación

El péptido-resina se tomó en una jeringa equipada con material sinterizado. Se agregó una solución de ácido trifluoroacético (TFA)/Tioanisol (TA)/Triisopropilsilano (TIS)/H₂O (94/2/2/1) y la jeringa se agitó durante 2 horas. La solución se agregó a una mezcla de 50% de diisopropil éter y 50% de dietil éter sobre hielo para permitir la precipitación del péptido. El péptido se recolectó por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó varias veces con dietil éter y se secó al vacío. El producto en bruto se disolvió en agua y se purificó por RP-HPLC semi-preparativa en un sistema Metrohm de HPLC LC-CaDI 22-14 (Herisau, Suiza) con una columna Macherey-Nagel VP 250/21 Nucleosil 100-5 C₁₈ (eluyentes: eluyente 1 = TFA al 0,1% en agua y eluyente 2 = acetonitrilo; gradiente: 0-20 min, 90%-50% eluyente 1; flujo: 15 ml/min).

Los conjugados se analizaron por RP-HPLC analítica y se caracterizaron por espectroscopía de masas (ESI-MS).

A-B-C-1

DOTA-Separador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-

Xaa₃¹³- Xaa₄¹⁴-ZH (Z = NH)

Compuesto 1: A = DOTA, B₁ = Gly, B₂ = 4-aminobenzóilo;
Xaa₁ = DFe; Xaa₂ = Gli; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu,

DOTA-Gly-aminobenzóilo-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-
Sta-Leu-NH₂; C₈₀H₁₁₄N₂₀O₂₀, calculado (m/z): 1675,8, encontrado
[M+K]⁺: 1715,1.

Compuesto 2: A = DOTA, B₁ = 4-amino-1-carboximetil-
piperidinilo; B₂ = no se encontró, Xaa₁ = DFe; Xaa₂ = Gli;
Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidina-D-Phe-Gln-Trp-
Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₉H₁₁₈N₂₀O₁₉; calculado (m/z):
1639,9, encontrado [M+K]⁺: 1678,1

Compuesto 3: A = DOTA, B₁ = 4-amino-1-piperidina-4-
carboxi; B₂ = no se encontró, Xaa₁ = DFe; Xaa₂ = Gli; Xaa₃ =
Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-ácido 4-amino-1-piperidina-4-carboxílico-D-Phe-
Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

C₇₇H₁₁₆N₂₀O₁₉, calculado (m/z): 1624,9, encontrado [M+K]⁺:
1663,7

Compuesto 4: A = DOTA, B₁ = 15-amino-4,7,10,13-
tetraoxapentadecanoilo; B₂ = no se encontró, Xaa₁ = DFe;
Xaa₂ = Gli; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-
D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₈₂H₁₂₇N₁₉O₂₃,
calculado (m/z): 1747,8, encontrado [M+K]⁺: 1785,1

Compuesto 5: A = DOTA, B₁ = 15-amino-4,7,10,13-
tetraoxapentadecanoilo; B₂ = 4-amino-1-piperidina-4-

carboxi, Xaa₁ = DFe; Xaa₂ = Gli; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-(ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico)-(4-amino-1-carboximetil-piperidina)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₈₉H₁₃₉N₂₁O₂₄, calculado (m/z): 1886,0, encontrado [M+K]⁺: 1924,9

Compuesto 6: A = DOTA, B₁ = ácido diaminobutírico; B₂ = no se encontró, Xaa₁ = DFe; Xaa₂ = Gli; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-ácido diaminobutírico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₅H₁₁₄N₂₀O₁₉, calculado (m/z): 1598,9, encontrado [M+K]⁺: 1638,4

Compuesto 7: A = DOTA, B₁ = 4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazinilo; B₂ = no se encontró, Xaa₁ = DFe; Xaa₂ = Gli; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazina-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₉H₁₂₁N₂₁O₁₉, calculado (m/z): 1667,9, encontrado [M+Na]⁺: 1691,2

Compuesto 8: A = DOTA, B₁ = ácido (5-amino-3-oxapentil)succinámico; B₂ = no se encontró, Xaa₁ = DFe; Xaa₂ = Gli; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-ácido (5-amino-3-oxapentil)succinámico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

C₇₉H₁₂₀N₂₀O₂₁, calculado (m/z): 1685,9, encontrado [M+K]⁺: 1723,7

Ejemplo 2 (A-B-C)

- a) Síntesis de conjugados antagonistas peptídicos análogos a la bombesina con la secuencia general

(A = N₄-azido, B = Separador B₁ - B₂, C = Péptido con amida N-terminal Z [Z = NH₂])

N₄-triazoles-dPEG₁-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

a) Síntesis de los péptidos: Fmoc-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

Los péptidos se sintetizaron manualmente en fase sólida usando la estrategia Fmoc. Para obtener amidas N-terminales, se utilizó resina LL amida de Rink MBHA (100-200 mesh). La síntesis se llevó a cabo según se describe en el Ejemplo 1.

b) Acople con el grupo alquilo del propargil-dPEG₁-NHS-éster

Antes de acoplar con el grupo alquilo, se eliminó la protección con Fmoc en el N-terminal de los péptidos unidos a la resina. La resina se dejó hinchar durante 15 min en DMF, se trató dos veces con una solución de piperidina al 20% en DMF (15 min) y se lavó tres veces con DMF. La solución proveniente del tratamiento con piperidina y los siguientes lavados con DMF se recogieron para la determinación de Fmoc.

Se agregaron a la resina 2 equivalentes del propargil-dPEG₁-NHS-éster. El pH se ajustó a 8-9 por agregado de DIPEA. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h y se monitoreó el acoplamiento usando la prueba de Kaiser.

c) Desprotección, separación y purificación

El péptido-resina se tomó en una jeringa equipada con material sinterizado. Se agregó una solución de TFA/TIS/H₂O (94/2,5/2,5) y la jeringa se agitó durante 2 horas. La solución se agregó a una mezcla de 50% de diisopropil éter y 50% de dietil éter sobre hielo para permitir la precipitación del péptido. El péptido se recolectó por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó varias veces con dietil éter y se secó al vacío. El producto en bruto se disolvió en agua y se purificó por RP-HPLC semi-preparativa según se describió anteriormente.

Los conjugados se analizaron por RP-HPLC analítica y se caracterizaron por espectroscopía de masas (ESI-MS).

d) Síntesis del quelante N₄-azido. La síntesis incluye 3 pasos.

i) Síntesis de N,N',N'',N'''-tetrakis(tert-butiloxicarbonil)-6-(azido)-1,4,8,11-tetraazaundecano

(N₄(Boc)₄-N₃) [3]:

a) N,N',N'',N'''-tetrakis(tert-butiloxicarbonil)-6-(hidroxi)-1,4,8,11-tetraazaundecano (N₄(Boc)₄-OH) [1]: se enfrió a 0°C una solución de 6-(hidroxi)-1,4,8,11-tetraazaundecano (1 g, 3,1 mmol) en DMF (10 ml). A esto se le agregó una solución de dicarbonato de Di-tert-butilo (3,32 ml, 15,5 mmol) en DMF (5 ml) seguido de DIPEA (2,7 ml, 15,5 mmol). Luego, la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 18 horas. Luego de este tiempo de reacción, la mezcla de reacción se particionó entre agua

y acetato de etilo. La capa acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo y las fases combinadas de acetato de etilo se lavaron con solución de cloruro de sodio y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. La filtración y evaporación del solvente bajo presión reducida dio el compuesto del título con un rendimiento del 86%.

ii) N,N',N'',N''' -tetrakis(*tert*-butiloxicarbonil)-6-(*O*-metilo sulfonil))-1,4,8,11-tetraazaundecano ($N_4(\text{Boc})_4\text{-O-SO}_2\text{CH}_3$) [2]:

A una solución de 1 (300 mg, 0,54 mmol) en piridina (3 ml) se le agregó cloruro de metilsulfonilo (84 μL , 1,08 mmol). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente hasta completar la reacción según se monitoreó por TLC. El solvente se evaporó bajo presión reducida, el residuo se tomó en acetato de etilo. El acetato de etilo se lavó tres veces con NaHCO_3 al 10% y agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La filtración y evaporación del solvente bajo presión reducida dio el producto en bruto, que se siguió purificando por cromatografía en columna de gel de sílice para dar el compuesto del título con un rendimiento del 84%.

iii) N,N',N'',N''' -tetrakis(*tert*-butiloxicarbonil)-6-(azido)-1,4,8,11-tetraazaundecano ($N_4(\text{Boc})_4\text{-N}_3$) [3]:

Se agitó una suspensión de 2 (250 mg, 0,38 mmol) y azida de sodio (100 mg, 1,52 mmol) en DMF (3 ml) a 75°C durante 5 horas. Más tarde, la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 18 horas. Luego, la

mezcla de reacción se dividió en porciones entre agua y acetato de etilo. La capa acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo y las fases de acetato de etilo combinadas se lavaron con solución de cloruro de sodio y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. La filtración y evaporación del solvente bajo presión reducida dio el producto en bruto, que luego se purificó por cromatografía en columna. (Rendimiento 88%).

d) Acoplamiento en solución

Se disolvieron el péptido (6,2 mg, 5 μ m) con grupo alquilo terminal y **3** (3 mg, 5 μ m) en una mezcla 1:1 de agua y alcohol tert-butílico (1 ml). Se agregó cobre en polvo (10 mg) seguido de sulfato de cobre(II) pentahidrato acuoso 0,1 M (60 μ L, 6 μ m, 1,2 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 24 horas. El cobre en polvo se separó por filtración, el solvente se eliminó bajo presión reducida. El péptido en bruto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa.

El conjugado de péptido-quelante se trató con TFA:TIS:H₂O (95:2:3) durante 2 horas. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El producto en bruto se trituroó en dietil éter y se purificó por RP-HPLC semi-preparativa según se describió anteriormente.

Los conjugados se analizaron por RP-HPLC analítica y se caracterizaron por espectroscopía de masas (ESI-MS).

Compuesto 14: **A** =N₄-azido, **B**₁ = propargil-dPEG₁-NHS-éster; **B**₂ = no se encontró, Xaa₁ = DFe; Xaa₂ = Gli; Xaa₃ =

Sta; Xaa₄ = Leu

N₄-triazoles-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₆₈H₁₀₅N₂₁O₁₃, calculado (m/z): 1424,7, encontrado [M+H]⁺: 1425,5

Ejemplo 3 (A-B-C2)

DOTA-Separador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₂-CH₃

Todos los pseudopéptidos se sintetizaron en fase en solución por condensación del heptapéptido Fmoc-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Xaa₂-His-OH con el aminoácido modificado H-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃.

a) Síntesis del heptapéptido Fmoc-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Xaa₂-His-OH

Los péptidos se sintetizaron manualmente sobre resina de cloruro de 2-clorotritilo usando la estrategia Fmoc. En general, se cargó resina de cloruro de 2-clorotritilo con una carga teórica de 1,4 mmol/g de resina en el reactor. La resina se dejó hinchar en DCM durante 30 min y el primer aminoácido se acopló por agregado de 1 equivalente de aminoácido, se mezcló con exceso molar de 4 veces de DIPEA en DCM. La mezcla de la reacción de acoplamiento se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas y luego la resina se lavó dos veces con una mezcla de DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1), dos veces con DCM y por último se dejó hinchar en DMF. El Fmoc se desprotegió usando 20% de piperidina en DMF y se determinó la cantidad de grupo protector Fmoc eliminado por espectrofotometría a 300 nm. El próximo

aminoácido se acopló por agregado de un exceso molar de aminoácido de 2 veces, se mezcló con cantidades equimolares de DIC/HOBt, y exceso molar de 4 veces de DIPEA en DMF. La resina se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas y el acoplamiento se monitoreó usando la prueba con ninhidrina de Kaiser. Cada aminoácido se acopló usando la misma estrategia.

b) Acoplamiento con SEPARADOR y proquelante DOTA ($t\text{Bu}$)₃

Los acoplamientos se llevaron a cabo según se describió anteriormente.

c) Separación y purificación

Los péptidos completamente protegidos se separaron del soporte sólido suspendiendo la resina en una mezcla de TFA/TIS/DCM (1/5/94). Varias veces se extrajo un volumen de 5 ml de la solución de clivaje con la jeringa, se incubó 10 min y las fracciones separadas se recogieron en un matraz de 50 ml. Luego recoger de todas las fracciones se agregaron 3 X 10 ml de tolueno al matraz, se evaporaron los solventes y el producto se secó después durante 1 hora usando una bomba de vacío con aceite.

d) Síntesis de Boc-Leu ψ (CHOH)-(CH₂)₃-CH₃. La síntesis incluye tres pasos.

i) Síntesis de Boc-Leu-N(OCH₃)CH₃

Se disolvió Boc-Leu-OH (1 g, 4,3 mmol) en DCM (30 ml) y se agregaron tetrafluoroborato de 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) (1,380 g, 4,3 mmol), HOBt (0,581 g, 4,3 mmol) y DIPEA (743 μL , 4,3 mmol) a 0°C.

Luego de 5 min de agitación, se agregaron clorhidrato de O,N-dimetilhidroxilamina (0,461 g, 4,73 mmol) y DIPEA (817 μ L, 4,73 mmol). Todo el material sólido se disolvió dentro de los 10 min y se agitó la mezcla durante toda la noche a la temperatura ambiente. El solvente se evaporó, la mezcla de reacción se redisolvió en AcOEt y se lavó con H₂O, ácido cítrico al 5%, H₂O, solución acuosa de NaHCO₃ al 5%, solución de NaCl saturado, varias veces. La solución se secó sobre MgSO₄ y el solvente se eliminó al vacío. El compuesto deseado se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice. ESI-MS: calculado 269; encontrado 292 [M +Na]⁺.

ii) Síntesis de Boc-Leu-(CH₂)₃-CH₃

Se activó magnesio (0,330 g, 13,6 mmol) suspendiendo en tolueno durante 30 min bajo N₂. El tolueno se eliminó y el Mg se secó bajo N₂. A la suspensión de Mg en THF (20 ml) se le agregó bromobutano (1,46 ml, 13,6 mmol) gota a gota y la mezcla se calentó a reflujo. Cuando se disolvió todo el magnesio, se agregó gota a gota Boc-Leu-N(OCH₃)CH₃ en THF y la reacción se agitó durante 2 horas a 0°C. Se agregó HCl 1M (150 ml) seguido de acetato de etilo (100 ml). La fase orgánica se lavó con sulfato ácido de potasio 1M, agua, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío. El producto esperado se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice. El producto se caracterizó por ¹H-RMN y ¹³C-RMN. ESI-MS: calculado 271; encontrado 293,3 [M +Na]⁺.

iii) Síntesis de Boc-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃

A una solución de Boc-Leu-(CH₂)₃-CH₃ (0,190 g, 0,7

mmol) en metanol (5 ml) se le agregó NaBH_4 (0,104 g, 2,8 mmol). La mezcla de reacción se siguió agitando durante 1 hora, luego se neutralizó con ácido acético y el solvente se eliminó bajo presión reducida. El producto esperado se precipitó con una solución saturada de bicarbonato. El péptido se recolectó por filtración, se lavó con agua, hexano y se secó. El producto se caracterizó por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. ESI-MS: calculado 272; encontrado 273 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 547,7 $[2\text{M} + \text{H}]^+$.

iv) Acoplamiento en solución

Se desprotegió Boc-Leu ψ (CHOH) - $(\text{CH}_2)_3$ -CH₃ usando una solución de 80% TFA en DCM. Luego de 1 hora, la solución se concentró, se lavó varias veces con DCM y se secó.

El quelante-separador-péptido se disolvió en DMF, HATU (1,2 equivalentes) se agregó y se agitó la mezcla durante 1 hora. H-Leu ψ (CHOH) - $(\text{CH}_2)_3$ -CH₃ se disolvió en DMF y se agregó al péptido. El pH se ajustó a 8 usando DIPEA y la reacción se agitó durante 4 horas a la temperatura ambiente.

Se concentró el solvente y el péptido, completamente protegido, se obtuvo por precipitación con H_2O sobre hielo. El péptido en bruto se precipitó, se enfrió, se centrifugó y separó del solvente por decantación. Para obtener el péptido completamente desprotegido, este se solubilizó en una mezcla de DCM/TFA/TIS/ H_2O 10/85/2,5/2,5. Luego de 4 horas, la solución se concentró y se precipitó el péptido usando una mezcla de 50% de dietil éter y 50% de diisopropil éter sobre hielo. Luego se recolectó el péptido por centri-fu-

gación a 3000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó varias veces con dietil éter y luego el producto en bruto se mantuvo al vacío durante toda la noche para eliminar los solventes restantes. El producto en bruto se disolvió en agua y se purificó por [cromatografía] preparativa según se describió anteriormente.

Los conjugados se analizaron por RP-HPLC analítica y se caracterizaron por espectroscopía de masas (ESI-MS).

Compuesto 9: $A = \text{DOTA}$, $B_1 = 4\text{-amino-1-carboximetil-piperidina}$; $B_2 = \text{no se encontró}$, $Xaa_1 = \text{DFe}$; $Xaa_2 = \text{Gli}$;

$\text{DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidina-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu}\psi(\text{CHOH-CH}_2) - (\text{CH}_2)_2\text{-CH}_3$, $\text{C}_{74}\text{H}_{112}\text{N}_{18}\text{O}_{17}$,
calculado (m/z): 1524,8, encontrado $[\text{M}+\text{K}]^+$: 1564,3

Compuesto 10: $A = \text{DOTA}$, $B_1 = 15\text{-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoilo}$; $B_2 = 4\text{-amino-1-carboximetil-piperidina}$, $Xaa_1 = \text{DFe}$; $Xaa_2 = \text{Gli}$;

$\text{DOTA-PEG}_4\text{-4-amino-1-carboximetil-piperidina-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu}\psi(\text{CHOH-CH}_2) - (\text{CH}_2)_2\text{-CH}_3$; $\text{C}_{86}\text{H}_{135}\text{N}_{19}\text{O}_{22}$,
calculado (m/z): 1786,9, encontrado $[\text{M}+\text{K}]^+$: 1811,1

Compuesto 11: $A = \text{DOTA}$, $B_1 = 15\text{-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoilo}$; $B_2 = \text{no se encontró}$, $Xaa_1 = \text{DFe}$; $Xaa_2 = \text{Gli}$;

$\text{DOTA-PEG}_4\text{-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu}\psi(\text{CHOH-CH}_2) - (\text{CH}_2)_2\text{-CH}_3$

$\text{C}_{78}\text{H}_{121}\text{N}_{17}\text{O}_{21}$, calculado (m/z): 1632,8, encontrado $[\text{M}+\text{K}]^+$: 1672,2

Ejemplo 4 (A-B-C-3)

DOTA-Separador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-
Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-NH₂

Síntesis de conjugados de bombesina con la secuencia general: DOTA-Separador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²- Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

a) Síntesis del péptido: Fmoc- Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²- Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

Los péptidos se sintetizaron manualmente sobre resina MBHA LL (100-200 mesh) HCl usando una estrategia Boc. En general, se cargó en el reactor resina MBHA con una carga teórica de 0,59 mmol/g y se dejó hinchar en DCM durante 30 min. La resina se trató 3 veces (10 min) con una solución de DIPEA al 10% en DCM. El primer acoplamiento del Boc-Leuψ(CH₂NH)-Phe-OH se consiguió usando 2 equivalentes de Boc-aminoácido activado con 2 equivalentes de HOBT y 2 equivalentes de DIC. La mezcla de la reacción de acoplamiento se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas y la reacción se monitoreó con la prueba con ninhidrina de Kaiser. El la protección con Boc revirtió usando TFA al 30% en DCM y este paso se repitió dos veces. Luego, la resina se trató con una solución de DIPEA al 10% en DCM y los acoplamientos se llevaron a cabo según se describió anteriormente.

(H-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂:
C₅₆H₇₆N₁₄O₉, calculado (m/z): 1089,3, encontrado [M+H]⁺:
1089,8

b) Acoplamiento con SEPARADOR y proquelante DOTA ($t\text{Bu}$)₃

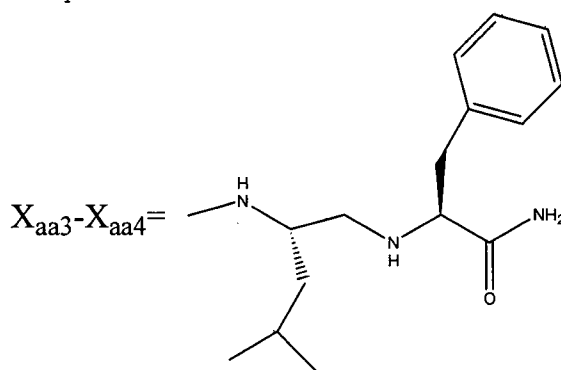
Los acoplamientos se llevaron a cabo según se describió anteriormente.

c) Desprotección, separación y purificación

El péptido se trató con TFA (1 ml) y TIS (30 μL) y se agitó la mezcla a la temperatura ambiente durante 5 min. Luego, la mezcla se enfrió en baño de hielo y se agregó ácido trifluorometansulfónico (TFMSA) (100 μL) gota a gota con agitación. El matraz se selló con un tapón y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas. Se redujo el volumen al vacío y el péptido se precipitó agregando dietil éter frío. El precipitado se lavó varias veces con dietil éter y el producto en bruto se secó al vacío. El producto en bruto se disolvió en agua y se purificó por HPLC preparativa según se describió anteriormente.

Los conjugados se analizaron por RP-HPLC analítica y se caracterizaron por espectroscopía de masas (ESI-MS).

Compuesto 12: **A** = DOTA, **B**₁ = 4-amino-1-carboximetil-piperidina; **B**₂ = no se encontró, Xaa₁ = DFe; Xaa₂ = Gli; Xaa₃ = Leu ψ (CH₂NH); Xaa₄ = Fe



DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidina-D-Phe-Gln-Trp-

Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH) -Phe-NH₂

C₇₉H₁₁₄N₂₀O₁₇, calculado (m/z): 1615,9, encontrado
[M+K]⁺: 1654,9

Síntesis de conjugados de bombesina con la secuencia general: DOTA-Separador-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leu ψ (CH₂NH) -Cys-NH₂

a) Síntesis del péptido: Fmoc- Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leu ψ (CH₂NH) -Cys-NH₂

Los péptidos se sintetizaron manualmente en fase sólida sobre resina MBHA (0,59 mmol/g) usando una estrategia Boc. Se acopló Boc-Cys(4-MeOBzl)-OH (2,5 eq.) con la resina usando DIC (2,5 eq.) y HOBt (2,5 eq.) como reactivo activador. El pH se ajustó a 8 con DIPEA (5 eq.). La introducción de ¹³ψ¹⁴(CH₂-NH) unida reducida se llevó a cabo usando Boc-Leu-aldehído (2,5 eq.) disuelto en dimetilformamida acidificada. Se agregó NaBH₃CN (2,5 eq.) en DMF lentamente, durante el transcurso de 20 min, y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a la temperatura ambiente. Luego de la formación de un péptido reducido unido, todas las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo usando aminoácidos N-protectados con Boc.

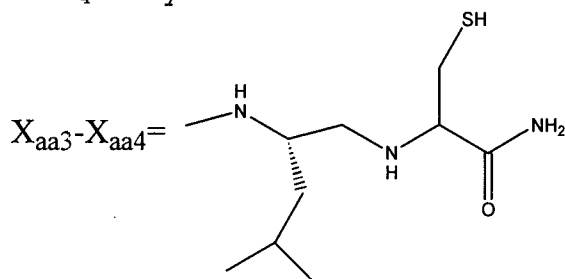
b) Acoplamiento con SEPARADOR y proquelante DOTA (tBu)₃

Los acoplamientos se llevaron a cabo según se describió anteriormente.

c) Desprotección, separación y purificación

La desprotección, separación y purificación se llevaron a cabo según se describió anteriormente. Los

Compuesto 13: **A** = DOTA, **B**₁ = 4-amino-1-carboximetil-piperidina; **B**₂ = no se encontró, Xaa₁ = DFe; Xaa₂ = Gli; Xaa₃ = Leuψ(CH₂NH)-; Xaa₄ = Cys



Ejemplo 4

Procedimiento general

Ejemplo 5

Marca de los conjugados sintetizados con ^{115}In

Se siguió la formación de complejos de los análogos de bombesina con $^{\text{nat}}\text{In}$ usando el mismo protocolo. El $^{\text{nat}}\text{In}$ se usó en forma de una solución de $^{\text{nat}}\text{InCl}_3$ con una relación molar de 1:1.

Ejemplo 6 (ensayos *in vitro*)

Materiales y métodos para la caracterización *in vitro* de antagonistas del receptor de GRP

Reactivos y péptidos

Todos los reactivos fueron del mejor grado disponible, y se los adquirió en proveedores comunes. El anticuerpo monoclonal contra el epítopo de la hemaglutinina (HA) de ratón se adquirió en Covance (Berkeley, CA). Los anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de ratón (H+L) Alexa Fluor 488 fueron de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). La bombesina y el antagonista [D-Phe⁶, Leu-NHET¹³, des-Met¹⁴]-bombesina(6-14) (GRPR-ANTAG) se adquirieron en Bachem (Bubendorf, Suiza). RM26, RM1b, In-RM1b y ^{175}Lu -AMBA se adquirieron en H.R. Mäcke (Basel, Suiza). Se usó el conjunto de elementos para la determinación de calcio Fluo-4NW, de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR).

Líneas celulares

Las células de riñón embrionario humano 293 (HEK293), donde se expresaba el receptor de GRP marcado con el epítopo de HA (HEK-GRPR), se generaron como se describió con anterioridad (Cescato et al., 2008) y se cultivaron a 37°C, con 5% de CO₂, en medio Eagle modificado por Dulbecco

(DMEM) con GlutaMAXTM-I, con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 750 µg/ml de G418. Las células de cáncer de próstata humano (células PC3) se obtuvieron en la DSMZ (Colección Alemana de Cultivos de Microorganismos y Células, S.R.L; DSMZ N° ACC465), y se las cultivó a 37°C, con 5% de CO₂, en F12K de Ham con L-glutamina 2 mM, suplementado con 10% (v/v) de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Todos los reactivos de cultivo fueron de Gibco BRL (Grand Island, NY).

Mediciones de la afinidad de unión

La afinidad de unión por el receptor de GRP de los diversos compuestos se determinó por medio de una autorradiografía del receptor *in vitro*, en secciones de carcinomas de próstata bien caracterizados o secciones de precipitados de células HEK-GRPR o PC3 obtenidas con un crióstato, como se describió con anterioridad (Markwalder et al., *Can. Res.*, 1999; 59, 1152-1159; Reubi et al., *Eur. J. Nucl. Med.*, 2000;27: 273-282; Reubi et al., *Clin. Cancer Res.* 2002;8 1139-1146). Los radioligandos usados fueron ¹²⁵I-[Tyr⁴]-bombesina, conocida porque marca los receptores de GRP de manera preferencial (Vigna et al., *Gastroenterology*. 1987;93: 1287-1295), e ¹²⁵I-[D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]-bombesina(6-14), como ligando universal del receptor de bombesina (*Gastroenterology*. 1987;93: 1287-1295).

Los resultados pueden observarse en la tabla 1.

Microscopía de inmunofluorescencia

Se realizaron ensayos basados en microscopía de inmunofluorescencia con células HEK-GRPR como se describió con anterioridad (Cescato et al., 2006; Cescato et al., 2008). En resumen, se cultivaron células HEK-GRPR en placas de cuatro cavidades de 35 mm (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) recubiertas con poli-D-lisina (20 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Para el experimento, las células se trataron con bombesina 10 nM o los diversos análogos de bombesina en una concentración 1 µM, o para evaluar el antagonismo potencial, con bombesina 10 nM, en presencia de un exceso de 100 veces de estos análogos diversos, durante 30 minutos a 37°C, con 5% de CO₂, en medio de cultivo, y luego se las procesó para la microscopía de inmunofluorescencia usando el anticuerpo monoclonal contra el epítopo de HA de ratón, en una dilución de 1:1000, como primer anticuerpo, y el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H+L) Alexa Fluor 488, en una dilución de 1:600, como anticuerpo secundario. Las imágenes de las células se generaron usando un microscopio de inmunofluorescencia Leica DM RB y una cámara Olympus DP10.

La internalización del receptor de GRP inducida por la bombesina es antagonizada eficientemente por los análogos de bombesina compuesto 1, In-compuesto 1, compuesto 1b y GRPR-ANTAG. Las células HEK-GRPR se trataron durante 30 minutos con vehículo (sin péptido, a) o con 10 nmol/l de bombesina (b), una concentración que induce un efecto de

internalización submáxima. En los paneles (d, f, h, j) se ilustran células tratadas con 10 nmol/l de bombesina, en presencia de 1 μ mol/l de los análogos compuesto 1b, GRPR-ANTAG, compuesto 1 e In-compuesto 1. El efecto del compuesto 1b, GRPR-ANTAG, el compuesto 1 e In-compuesto 1, solos en una concentración de 1 μ mol/l, se ilustra en los paneles (c, e, g, i, k). Después de la incubación con los péptidos, las células se procesaron para la inmunocitoquímica como se describió con anterioridad. Es posible detectar una coloración clara en forma de puntos perinucleares en las células tratadas con bombesina. Esta coloración en forma de puntos es anulada de manera eficiente por un exceso de los análogos compuesto 1, In-compuesto 1, compuesto 1b y GRPR-ANTAG. El compuesto-1, In-compuesto 1, el compuesto 1b y GRPR-ANTAG, administrados por sí solos, no tuvieron efectos sobre la internalización del receptor de GRP.

Los resultados pueden observarse en la tabla 1 y la Fig. 2.

Ensayo de liberación de calcio

La liberación de calcio intracelular se midió en células PC3, usando el conjunto de elementos para la determinación de calcio Fluo-4NW, como se describió con anterioridad (Magrys et al., *J. Clin. Immunol.* 2007, 27, 181-192; Michel et al; Cescato et al., *J. Nucl. Med.* 2008; 49: 318-326). En resumen, las células PC3 se sembraron en placas de 96 cavidades (10000 células por cavidad), y se

las cultivó durante 2 días a 37°C, con 5% de CO₂, en medio de cultivo. El día del experimento, las células se lavaron con un amortiguador de ensayo (HBSS 1x, HEPES 20 mM) que contenía probenecid 2,5 mM, y luego se las cargó con 100 µl/cavidad de colorante Fluo-4NW en un amortiguador de ensayo que contenía probenecid 2,5 mM, durante 30 minutos a 37°C, con 5% de CO₂, para posteriormente dejarlas a temperatura ambiente por 30 minutos. Para medir la movilización de calcio intracelular después de la estimulación con los análogos de bombesina a evaluar, las células cargadas con colorante se transfirieron a un dispositivo SpectraMax M2^e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La movilización de calcio intracelular se registró de manera cinética, durante 60 segundos y a temperatura ambiente, con el monitoreo de la emisión de fluorescencia a 520 nm (con λ_{ex} = 485 nm), en presencia de los análogos a las concentraciones indicadas. La fluorescencia máxima (F-máx.) se midió después de agregar ionomicina 25 µM. Se realizaron mediciones basales (F-línea basal) en células sin tratar cargadas con colorante. Los datos se indican como porcentajes de la respuesta máxima al calcio (F-máx. - F-línea basal = 100% de la respuesta máxima al calcio), como se describió con anterioridad (Magrys et al., *J. Clin. Immunol.* 2007, 27, 181-192; Michel et al., Cescato et al., *J. Nucl. Med.* 2008; 49: 318-326). Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces, es decir, por triplicado.

En la Fig. 1 se indica que In-compuesto 1 y el

compuesto 1a se comportan como antagonistas que, en presencia de de bombesina (BB), desvían la curva de respuesta a la dosis de la bombesina hacia la derecha.

Los resultados pueden observarse en la tabla 1 y la Fig. 1.

Compuesto 1: DOTA-Gly-aminobenzoil-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 2: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidin-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 3: DOTA-4-amino-1-piperidin-4-carboxilicacid-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 4: DOTA-ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 5: DOTA-(ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico)-(4-amino-1-carboxi-metil-piperidina)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 6: DOTA-ácido diaminobutírico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 7: DOTA-4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazin-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 8: DOTA-(5-amino-3-oxa-pentil)-ácido succinámico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Compuesto 9: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidin-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuø(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Compuesto 10: DOTA-(ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico)-4-amino-1-carboximetil-piperidin-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Compuesto 11: DOTA-ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapenta-decanoico-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Compuesto 12: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidin-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

Compuesto 13: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidin-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂

Compuesto 14: N₄-triazoles-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂.

Tabla 1. Propiedades de unión al receptor de GRP *in vitro*, señalización e internalización de análogos de BN

Compuesto	IC ₅₀ unión media ± SEM	de (nM)	Señalización movilización de Ca ⁺⁺	de efecto	Internalización del receptor
1	30 ± 4,5		ANTAG/sin agonista	efecto	Antag/sin efecto agonista
¹¹⁵ In-1	16 ± 5,3		ANTAG/sin agonista	efecto	Antag/sin efecto agonista
2	9,7 ± 3,8		ANTAG/sin agonista	efecto	Antag/sin efecto agonista
¹¹⁵ In-2	9,3 ± 1,9		ANTAG/sin agonista	efecto	Antag/sin efecto agonista
3	43 ± 14		ANTAG/sin agonista	efecto	Antag/sin efecto agonista
4	21± 6,5		ANTAG/sin agonista	efecto	Antag/sin efecto agonista
5	7,3 ± 0,6		ANTAG/sin	efecto	Antag/sin efecto

		agonista	agonista
6	7,4 ± 2,2	ANTAG/sin efecto agonista	Antag/sin efecto agonista
7	11 ± 0	NA	NA
8	19 ± 3,0	NA	NA
9	3,2 ± 1,3	ANTAG/sin efecto agonista	Antag/sin efecto agonista
¹¹⁵ In-9	2,5 ± 0,2	ANTAG/sin efecto agonista	Antag/sin efecto agonista
10	6,9 ± 0,5	ANTAG/sin efecto agonista	NA

Las afinidades de unión de los compuestos 1, 2 y 9 se midieron después de formar complejos con el isótopo no radiactivo, ¹¹⁵In. Los datos permiten concluir que la formación de complejos con el isótopo no afecta la unión de la afinidad de unión por el receptor o las propiedades de antagonismo.

Métodos de referencia en publicaciones relevantes:

Cescato R, Schulz S, Waser B, et al. *Internalization of sst2, sst3 and sst5 receptors: Effects of somatostatin agonists and antagonists. J. Nucl. Med.*, 2006;47:502-511.

Cescato R, Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, Charalambidis D, Piccand V, Reubi JC. *Bombesin Receptor Antagonists May Be Preferable to Agonists for Tumor Targeting. J. Nucl. Med.* 2008; 49:318-326.

Magrys, A.; Anekonda, T.; Ren, G.; Adamus, G. *The role of anti-alpha-enolase autoantibodies in pathogenicity of*

autoimmune-mediated retinopathy. *J. Clin. Immunol.* 2007, 27, 181-192.

Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res.* 1999;59:1152-1159.

Michel, N.; Ganter, K.; Venzke, S.; Bitzegeio, J.; Fackler, O. T.; Kepplet, O. T. The Nef protein of human immunodeficiency virus is a broad-spectrum modulator of chemokine receptor cell surface levels that acts independently of classical motifs for receptor endocytosis and Galphai signaling. *Mol. Biol. Cell.* 2006, 17, 3578-3590.

Reubi JC, Schaer JC, Waser B, et al. Affinity profiles for human somatostatin receptor sst1-sst5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur. J. Nucl. Med.*, 2000;27:273-282.

Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, et al. Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers: Detection with the Universal Radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] Bombesin(6-14). *Clin. Cancer Res.*, 2002;8:1139-1146.

Vigna SR, Mantyh CR, Giraud AS, et al. Localization of specific binding sites for bombesin in the canine gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 1987;93:1287-1295.

Ejemplo 7

Experimentos de biodistribución en ratones desnudos con tumores PC-3

Se sometieron ratones desnudos hembra a implantes

subcutáneos de 10 millones de células tumorales PC-3, las cuales habían sido expandidas frescas en un solución salina amortiguada con fosfato esterilizada (PBS, pH 7,4). Once días después de la inoculación, a los ratones se les administró una inyección de 10 pmol de péptidos radiomarcados (aproximadamente 0,18 MBq) diluidos en NaCl (0,1% de albúmina de suero bovino, pH 7,4, volumen inyectado total: 100 µl) en la vena caudal. Para determinar la captación no específica en el tumor o los órganos positivos para el receptor, se pre-inyectó un grupo de 4 animales con 0,02 µmol de péptido sin marcar en solución de NaCl al 0,9%, y 5 minutos después, se inyectó el péptido radiomarcado. A intervalos de 1, 4, 24, 48 y 72 horas, se sacrificaron los ratones (en los grupos de 3-4) y se recolectaron los órganos de interés, se lavó el exceso de sangre, se los pesó y se realizó el conteo en un contador γ.

¹¹¹In-compuesto 1

¹¹¹In- DOTA-Gly-aminobenzoil-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Cantidad inyectada:	5 µCi/10 pmol/100 µl/ratón
Compuesto bloqueador:	2000 veces
Animal:	Ratones desunidos con tumores PC3; 3 ratones/grupo
Punto de tiempo:	1 hora, 4 horas, 4 horas con bloqueo, 24 horas, 48 horas, 72 horas

Órgano	1 hora	4 horas	4 horas c/bloqueo	24 horas	48 horas	72 horas
Sangre	0.86±0.17	0.04±0.00	0.02±0.01	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Corazón	0.28±0.05	0.04±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01	0.00±0.00	0.01±0.00
Hígado	1.93±0.29	0.38±0.05	0.39±0.08	0.19±0.01	0.10±0.01	0.09±0.02
Bazo	0.57±0.21	0.12±0.01	0.09±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01	0.02±0.00
Pulmón	0.82±0.13	0.12±0.04	0.10±0.03	0.05±0.01	0.02±0.01	0.01±0.00
Riñón	3.99±0.33	1.93±0.18	2.67±0.10	1.01±0.06	0.50±0.09	0.28±0.02
Estómago	3.31±0.63	0.76±0.14	0.07±0.03	0.05±0.02	0.01±0.00	0.02±0.01
Intestino	1.73±0.48	0.20±0.10	0.07±0.01	0.04±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Adrenal	4.14±1.46	1.20±0.12	0.10±0.06	1.24±0.16	0.38±0.09	0.36±0.04
Páncreas	21.92±1.34	1.32±0.31	0.07±0.02	0.15±0.02	0.06±0.01	0.06±0.01
Pituitaria	7.80±1.90	0.85±0.45	0.11±0.09	0.21±0.19	0.03±0.03	0.05±0.07
Músculo	0.19±0.06	0.03±0.01	0.02±0.00	0.03±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Hueso	0.40±0.10	0.18±0.07	0.04±0.01	0.14±0.03	0.03±0.00	0.03±0.01
Tumor	14.24±1.75	13.46±0.80	0.46±0.00	6.58±1.14	2.08±0.12	1.31±0.23

110

Relación entre tumor y tejido	1 hora	4 horas	24 horas	48 horas	72 horas
tumor: riñón	3,6	7,0	6,5	4,2	4,7
tumor: hígado	7,4	35,4	34,6	20,8	14,5
tumor: sangre	16,5	336,5	658,0	1600,0	1871,4
tumor: músculo	75,0	448,7	219,3	693,3	1091,7

⁶⁸Ga-compuesto 1

⁶⁸Ga-DOTA-Gly-aminobenzoil-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-
Sta-Leu-NH₂

Ratones desunidos con tumores PC3;

Animal: 3 ratones/grupo

Cantidad

inyectada: 1,27 µCi/10 pmol/100 µl/ratón

Compuesto

bloqueador: Compuesto 1, 3000 veces

1 hora, 1 hora con bloqueo, 2

Punto de tiempo: horas

Órgano	1 hora con		
	1 hora	bloqueo	2 horas
sangre	0,86 ± 0,09	0,55 ± 0,30	0,39 ± 0,15
corazón	0,33 ± 0,21	0,30 ± 0,18	0,14 ± 0,02
hígado	1,14 ± 0,37	1,05 ± 0,60	0,98 ± 0,32
bazo	1,29 ± 0,53	0,08 ± 0,05	0,08 ± 0,01

pulmón	0,80 ± 0,33	0,71 ± 0,23	0,21 ± 0,09
riñón	2,79 ± 0,39	3,18 ± 1,79	1,21 ± 0,12
estómago	3,09 ± 0,51	0,41 ± 0,31	1,68 ± 0,02
intestino	2,09 ± 0,17	1,06 ± 0,55	5,39 ± 0,52
adrenal	3,31 ± 0,78	0,07 ± 0,06	0,89 ± 0,62
páncreas	27,84 ± 4,88	0,96 ± 0,45	10,73 ± 2,76
pituitaria	13,35 ± 1,32	0,28 ± 0,08	0,22 ± 0,00
músculo	0,26 ± 0,08	0,07 ± 0,05	0,20 ± 0,02
hueso	0,03 ± 0,01	0,18 ± 0,11	0,03 ± 0,01
tumor	8,71 ± 0,67	2,04 ± 1,04	10,45 ± 1,61

	1 hora	2 horas
tumor: riñón	3,13	8,64
tumor: hígado	7,66	10,68
tumor: páncreas	0,31	0,97
tumor: sangre	10,18	27,08
tumor: músculo	33,74	53,51

¹¹¹In-compuesto 2

¹¹¹In-DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidin-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Cantidad inyectada:	5 µCi/10 pmol/100 µl/ratón
Compuesto bloqueador:	2000 veces
Animal:	Ratones desunidos con tumores PC3; 3 ratones/grupo
Punto de tiempo:	1 hora, 4 horas, 4 horas con bloqueo, 24 horas, 48 horas, 72 horas

Órgano	1 hora	4 horas	4 horas c/bloqueo	24 horas	48 horas	72 horas
Sangre	0.77±0.28	0.05±0.04	0.13±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Corazón	0.32±0.09	0.04±0.03	0.09±0.01	0.02±0.01	0.01±0.00	0.02±0.02
Hígado	0.49±0.12	0.18±0.06	0.34±0.03	0.09±0.01	0.07±0.01	0.06±0.02
Bazo	0.53±0.20	0.12±0.06	0.16±0.02	0.06±0.02	0.05±0.01	0.06±0.03
Pulmón	0.70±0.30	0.10±0.07	0.19±0.01	0.04±0.03	0.11±0.24	0.04±0.02
Riñón	4.78±1.11	2.14±0.73	2.98±0.20	1.25±0.16	0.91±0.09	0.74±0.18
Estómago	3.15±0.78	1.07±0.15	0.12±0.02	0.06±0.02	0.03±0.01	0.05±0.01
Intestino	2.11±0.47	0.25±0.15	0.11±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
Adrenal	3.46±2.07	1.17±0.54	1.10±0.60	0.71±0.29	0.54±0.29	1.01±0.74
Páncreas	22.64±4.71	1.55±0.48	0.10±0.00	0.32±0.09	0.19±0.04	0.19±0.02
Pituitaria	7.00±5.68	0.59±0.55	0.58±0.49	0.07±0.33	0.21±0.33	0.51±0.24
Músculo	0.29±0.17	0.05±0.04	0.06±0.02	0.02±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01
Hueso	0.91±0.68	0.35±0.57	0.35±0.11	0.20±0.18	0.12±0.11	0.15±0.05
Tumor	15.23±4.78	11.75±2.43	0.45±0.04	6.84±1.02	4.67±0.39	4.07±0.34

Relación entre tumor y tejido	1 hora	4 horas	24 horas	48 horas	72 horas
tumor: riñón	3,2	5,5	5,5	5,1	5,5
tumor: hígado	30,9	64,6	74,1	67,2	63,0
tumor: sangre	19,9	243,9	2744,6	3823,7	3391,2
tumor: páncreas	0,7	7,6	21,4	24,6	21,4
tumor: músculo	52,0	260,2	436,6	354,5	165,4

⁶⁸Ga-compuesto 2

⁶⁸Ga-DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidin-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂
Radioligando: ⁶⁸Ga-compuesto 2

Ratones desunidos con tumores PC3;

Animal: 3 ratones/grupo

Cantidad

inyectada: 1,27 µCi/10 pmol/100 µl/ratón

Punto de tiempo: 1 hora

Órgano	1 hora
sangre	0,45 ± 0,01
corazón	0,19 ± 0,02
hígado	0,41 ± 0,04
bazo	0,36 ± 0,01
pulmón	0,34 ± 0,03
riñón	1,87 ± 0,08
estómago	2,13 ± 0,34
intestino	1,54 ± 0,22

adrenal	2,48 ± 0,48
páncreas	11,63 ± 0,19
pituitaria	0,36 ± 019
músculo	0,13 ± 0,00
hueso	0,23 ± 0,03
tumor	9,31 ± 1,58

	1 hora
tumor: riñón	4,98
tumor: hígado	22,60
tumor: páncreas	0,80
tumor: sangre	20,85
tumor: músculo	74,02

¹¹¹In-compuesto 4

¹¹¹In-DOTA- (ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico) -
D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Cantidad inyectada:	5 µCi/10 pmol/100 µl/ratón
Compuesto bloqueador:	2000 veces
Animal:	Ratones desunidos con tumores PC3; 3 ratones/grupo
Punto de tiempo:	1 hora, 4 horas, 4 horas con bloqueo, 24 horas, 48 horas, 72 horas

Órgano	1 hora	4 horas con bloqueo	4 horas	24 horas
--------	--------	------------------------	---------	----------

13

Sangre	0.21 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Corazón	0.08 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Hígado	0.22 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Bazo	0.18 ± 0.10	0.07 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Pulmón	0.24 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Riñón	1.85 ± 0.15	1.38 ± 0.37	1.40 ± 0.29	0.24 ± 0.01
Estómago	2.01 ± 0.36	0.56 ± 0.18	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Intestino	1.16 ± 0.24	0.10 ± 0.04	0.05 ± 0.04	0.02 ± 0.00
Adrenal	2.18 ± 0.93	0.86 ± 0.17	0.07 ± 0.06	0.59 ± 0.16
Páncreas	10.96 ± 0.57	0.52 ± 0.05	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Pituitaria	4.23 ± 1.46	0.55 ± 0.20	0.17 ± 0.10	0.00 ± 0.00
Músculo	0.08 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Hueso	0.16 ± 0.06	0.12 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Tumor	10.56 ± 0.70	8.63 ± 1.13	0.45 ± 0.06	3.23 ± 0.52

Relación entre tumor y tejido	1 hora	4 horas	24 horas
tumor: riñón	5,71	6,27	13,40
tumor: páncreas	0,96	16,71	345,16
tumor: sangre	49,67	552,10	3457,24
tumor: músculo	140,10	349,48	808,55
tumor: hueso	64,16	71,75	86,62

¹¹¹In-compuesto 5

¹¹¹In-DOTA- (ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico) -
(4-amino-1-carboxi-metil-piperidina) -D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-
Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Animal:	Ratones desunidos con tumores PC3; 3-4 ratones/grupo			
Cantidad inyectada:	5 µCi/10 pmol/100 µl/ratón			
Compuesto bloqueador:	2000 veces			
Punto de tiempo:	1 hora, 4 horas, 4 horas con bloqueo, 24 horas			
Órgano	1 hora	4 horas con bloqueo	4 horas	24 horas
Sangre	0.75 ± 0.21	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Corazón	0.28 ± 0.06	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Hígado	0.40 ± 0.09	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.05	0.11 ± 0.02
Bazo	0.80 ± 0.28	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.01
Pulmón	0.62 ± 0.15	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.19	0.51 ± 0.73
Riñón	5.08 ± 0.72	1.76 ± 0.36	2.04 ± 0.15	1.37 ± 0.22
Estómago	3.92 ± 1.26	0.06 ± 0.01	0.87 ± 0.58	0.05 ± 0.01
Intestino	2.39 ± 0.42	0.03 ± 0.01	0.17 ± 0.10	0.05 ± 0.02
Adrenal	3.63 ± 0.53	0.07 ± 0.02	0.68 ± 0.31	0.62 ± 0.16
Páncreas	26.83 ± 4.34	0.06 ± 0.02	1.36 ± 0.81	0.33 ± 0.05
Pituitaria	9.02 ± 0.99	0.23 ± 0.14	0.38 ± 0.16	0.46 ± 0.52
Músculo	0.19 ± 0.07	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Hueso	0.34 ± 0.04	0.03 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02
Tumor	10.27 ± 0.36	0.61 ± 0.07	9.35 ± 0.73	6.33 ± 0.76

114

Relación entre tumor y tejido	1 hora	4 horas	24 horas
tumor: sangre	13,73	319,66	1155,51
tumor: riñón	2,02	4,59	4,62
tumor: páncreas	0,38	6,90	19,16
tumor: músculo	53,65	475,17	364,92
tumor: hueso	29,93	124,55	76,65

¹¹¹In-compuesto 9

¹¹¹In-DOTA: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidin-D-Phe-Gln-
Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuø(CHOH-CH₂) - (CH₂)₂-CH₃

Cantidad inyectada:	5 µCi/10 pmol/100 µl/ratón
Compuesto bloqueador:	2000 veces
Animal:	Ratones desunidos con tumores PC3; 3 ratones/grupo
Punto de tiempo:	1 hora, 4 horas, 4 horas con bloqueo, 24 horas, 48 horas, 72 horas

Órgano	1 hora	4 horas	4 horas c/bloqueo	24 horas	48 horas	72 horas
Sangre	0.43±0.10	0.12±0.03	0.04±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Corazón	0.17±0.03	0.09±0.02	0.15±0.05	0.03±0.01	0.02±0.00	0.08±0.03
Hígado	0.73±0.12	0.49±0.14	0.40±0.02	0.20±0.02	0.11±0.01	0.10±0.02
Bazo	1.13±0.41	0.57±0.24	0.23±0.03	0.21±0.06	0.15±0.04	0.15±0.04
Pulmón	0.45±0.05	0.21±0.06	0.38±0.06	0.08±0.04	0.05±0.02	0.18±0.07
Riñón	5.23±3.01	2.43±0.47	2.88±1.52	1.41±0.22	0.97±0.06	0.55±0.15
Estómago	4.43±2.48	5.72±4.04	0.16±0.03	1.08±0.15	0.43±0.10	0.28±0.09
Intestino	3.61±0.61	3.31±1.61	0.14±0.02	0.35±0.05	0.16±0.07	0.10±0.01
Adrenal	10.66±2.64	5.16±1.55	1.36±0.56	2.31±0.96	2.24±1.43	1.84±0.36
Páncreas	65.69±8.14	39.80±9.25	0.18±0.04	4.52±0.53	2.30±0.19	1.06±0.19
Pituitaria	12.63±3.26	5.54±2.07	3.72±1.62	0.71±0.37	0.56±0.24	2.56±0.28
Músculo	0.22±0.06	0.14±0.04	0.13±0.07	0.05±0.01	0.03±0.01	0.08±0.04
Hueso	1.31±1.29	0.71±0.25	1.61±0.52	0.29±0.14	0.23±0.13	1.08±0.83
Tumor	9.16±1.16	13.17±5.01	0.38±0.08	8.39±0.88	5.89±0.351	3.04±1.44

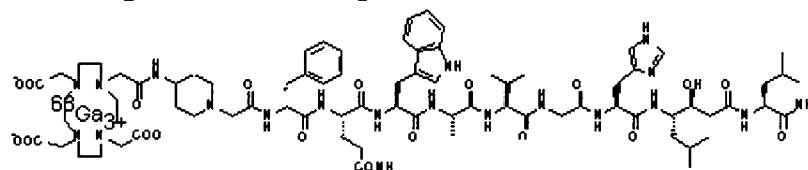
Relación entre tumor y tejido	1 hora	4 horas	24 horas	48 horas	72 horas
tumor: riñón	1,8	5,4	6,0	6,1	6,2
tumor: hígado	12,7	26,7	42,4	53,0	35,0
tumor: sangre	21,1	109,7	631,4	803,8	304,0
tumor: páncreas	0,2	0,3	1,9	2,6	2,9
tumor: músculo	42,6	94,7	169,2	191,9	42,9

Ejemplo 8

Diagnóstico por imágenes por PET/CT, experimento de biodistribución, afinidad de unión y estabilidad del compuesto 2 marcado con Ga-68 en ratones con tumores PC-3 y LNCaP

Diagnóstico por imágenes + biodistribución

Compuesto 2: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidin-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂



Fórmula empírica: C₇₈H₁₁₅N₂₀O₁₉Ga; peso molecular: 1704,89

El compuesto 2 marcado con Ga-68 se determinó en un diagnóstico por imágenes por microPET/CT (Inveon, Siemens) en ratones con tumores PC-3 y LNCaP, 1 hora después de inyectar 10 MBq de radiomarca. Debido a la eliminación renal rápida de este antagonista de bombesina, se observó muy poca actividad de fondo con solamente una captación marginal en el riñón y la vejiga. El contraste tumoral elevado visible en ambos xenoinjertos fue bloqueado de

manera efectiva por 100 µg de bombesina o el compuesto 2 no radiactivo propiamente dicho. Los receptores de bombesina fueron bloqueados con éxito con bombesina, lo que resultó en una pérdida crítica de la señal en el tumor en los ratones con tumores PC-3, Fig. 3a y 3b, y los ratones con tumores LNCaP Fig. 4a y 4b.

Afinidad de unión

La afinidad de unión del compuesto 2 marcado con Ga-68 por GRPr se determinó con dos métodos diferentes, los cuales comprendieron autorradiografía en tejidos humanos y un ensayo celular donde se usaron células PC-3. Con ambos métodos se determinó una afinidad de unión elevada del compuesto 2, con una IC₅₀ de aproximadamente 8 nM, sobre la base del compuesto 2, el péptido DOTA no radiactivo.

Estabilidad en plasma de ratón y microsomas

El compuesto 2 marcado con Ga-68 presenta una buena estabilidad metabólica, la cual puede medirse con distintos métodos *in vitro* e *in vivo*. La estabilidad en plasma *in vivo* del compuesto 2 marcado con Ga-68 se investigó en plasma de ratones que no tenían tumores, y se analizó la orina por HPLC 1, 3, 5, 10 y 15 minutos después de la inyección intravenosa de aproximadamente 20 MBq de compuesto 2 marcado con Ga-68 (Fig. 10a, b, c, d, e). Después de algunos minutos, se observó una degradación mínima de la radiomarca en plasma, con dos metabolitos muy pequeños/polares con tiempos de retención de 1,3 minutos y 1,5 minutos, que también fueron observados como metabolitos

Radioligando:
Radioligando:

^{99m}Tc-ARN4-05
^{99m}Tc-ARN4-05

Ratones desnudos con tumores PC-3; 6-9

Animal:

ratones/grupo

Cantidad inyectada:

10 µCi/10 pmol/100 µl/ratón

Punto de tiempo:

1 hora, 4 horas, 24 horas

bazo	3,91	0,66	1,29	0,53	0,87	0,18
pulmón	5,11	1,00	3,17	1,51	1,69	0,84
riñón izquierdo	6,55	0,59	2,73	0,42	1,28	0,30
estómago	8,09	1,45	5,44	1,26	0,61	0,19
intestino	8,41	2,39	2,02	0,80	0,16	0,08
adrenal	11,99	1,62	6,31	0,27	1,41	0,45
páncreas	72,50	8,98	11,18	2,89	0,41	0,20
pituitaria	6,86	2,85	2,12	0,59	0,83	0,31
músculo	0,27	0,03	0,07	0,00	0,18	0,12
Hueso	0,78	0,13	0,45	0,18	0,35	0,20
tumor	28,66	1,75	34,68	3,71	18,40	2,58
riñón	6,26	0,48	2,84	0,49	1,24	0,32

Tumor: relación entre los órganos	1 hora	4 horas	24 horas
tumor: sangre	20,79	85,11	455,94
tumor: corazón	36,75	150,38	176,45
tumor: hígado	4,37	9,50	15,47
tumor: bazo	7,50	20,51	21,05
tumor: pulmón	5,64	11,78	10,88
tumor: riñón	4,26	12,92	14,35
tumor: estómago	3,32	5,83	30,02
tumor:	3,20	16,51	117,53

117

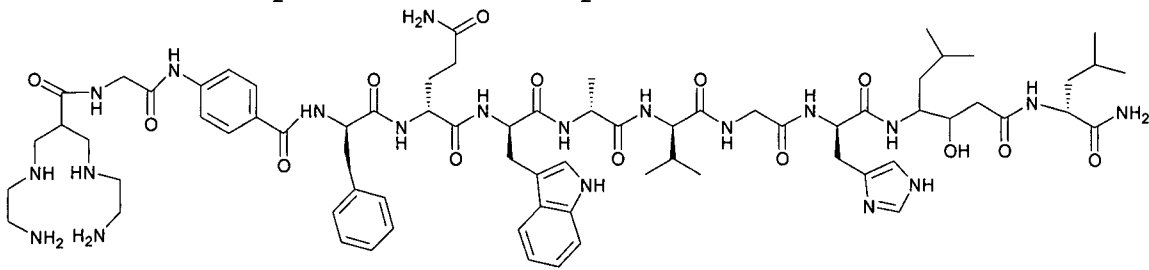
intestino			
tumor: adrenal	2,31	2,62	13,07
tumor: páncreas	0,38	3,28	44,93
tumor: pituitaria	4,43	4,40	22,14
tumor: músculo	116,82	283,06	99,65
tumor: hueso	34,10	35,16	52,06
tumor: riñón	4,25	12,25	14,87

En la Figura 6 se ilustra una imagen de SPECT/CT de ^{99m}Tc-ARN4-06 (15 MBq/200 pmol)

Ejemplo 10

Diagnóstico por imágenes por SPECT/CT y experimento de bio-distribución de ^{99m}Tc-ARN4-05 en ratones con tumores PC-3

Véase el protocolo del experimento anterior.



Órgano	1 hora	Desv. est.	4 horas	Desv. est.	24 horas	Desv. est.
sangre	1,69	0,14	0,40	0,05	0,09	0,02
corazón	0,68	0,02	0,20	0,03	0,14	0,07
hígado	12,32	1,01	7,75	0,62	3,88	0,40
bazo	4,00	0,60	1,72	0,34	0,83	0,22
pulmón	3,11	0,47	1,24	0,41	1,15	1,47
riñón izquierdo	10,50	1,20	6,12	1,17	1,42	0,13

estómago	5,68	0,01	4,86	1,04	0,42	0,15
intestino	6,97	1,57	2,12	0,37	0,12	0,01
adrenal	19,05	3,06	7,91	2,70	2,08	0,31
páncreas	64,86	6,72	19,86	2,35	0,57	0,21
pituitaria	3,67	2,03	1,15	0,11	1,53	1,33
músculo	0,43	0,16	0,08	0,02	0,11	0,04
hueso	1,34	0,26	0,57	0,11	0,41	0,19
tumor	22,50	2,62	29,91	4,00	15,16	0,45

Tumor: relación entre los órganos	1 hora	4 horas	24 horas
tumor: sangre	13,30	74,77	167,74
tumor: corazón	33,19	149,55	105,06
tumor: hígado	1,83	3,86	3,91
tumor: bazo	5,62	17,41	18,21
tumor: pulmón	7,24	24,11	13,21
tumor: riñón	2,14	4,89	10,71
tumor: estómago	3,96	6,15	35,99
tumor: intestino	3,23	14,09	129,43
tumor: adrenal	1,18	3,78	7,30
tumor: páncreas	0,35	1,51	26,66
tumor: pituitaria	6,14	25,96	9,93
tumor: músculo	52,54	364,22	133,21
Tumor: hueso	16,80	52,85	37,06

En la Figura 8 se ilustra una imagen de SPECT/CT de ^{99m}Tc -ARN4-05 (15 MBq/200 pmol)

Ejemplo 11

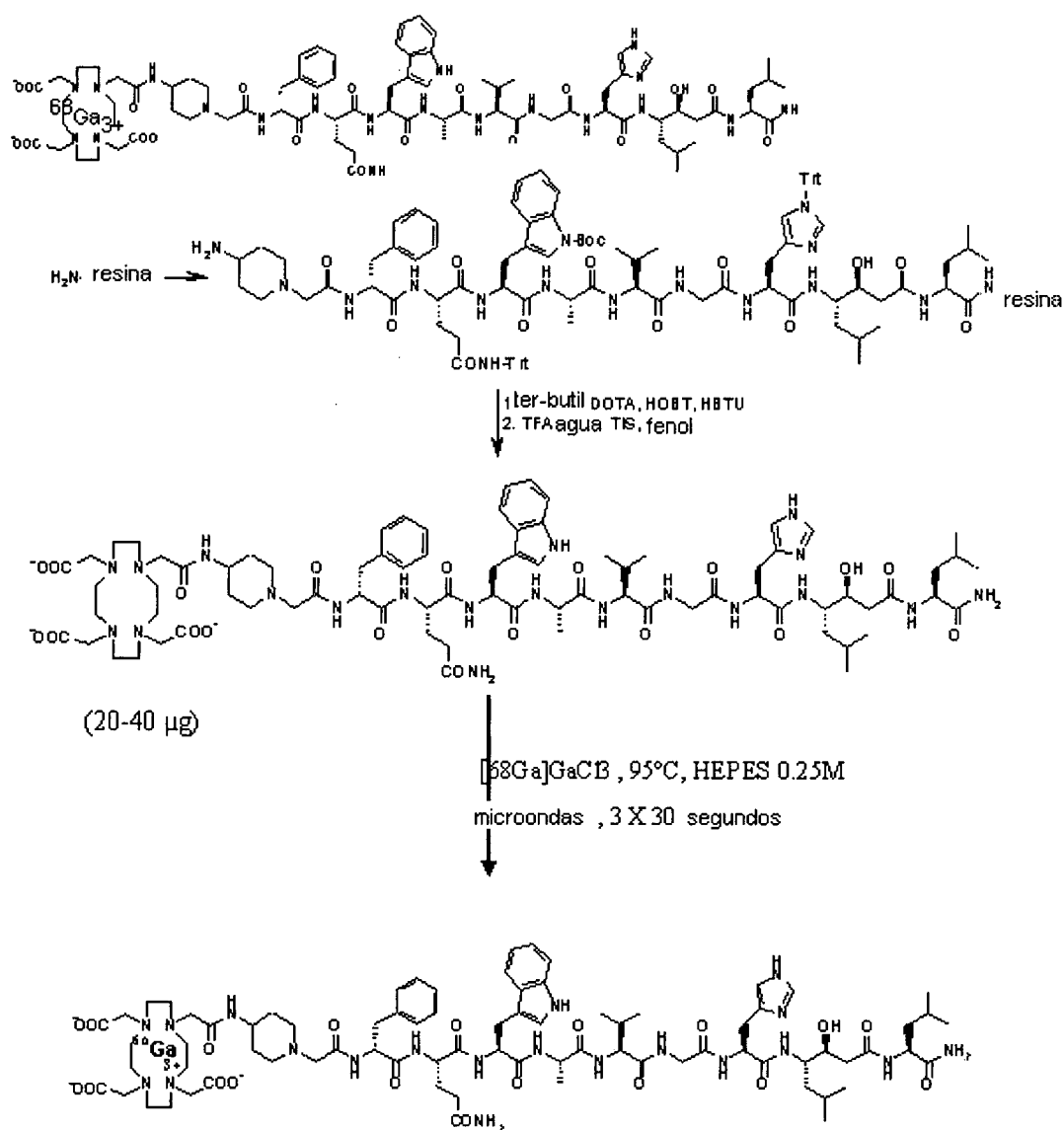
Síntesis del compuesto 2 marcado con Ga-68

Paso 1: Se sintetizaron péptidos no radiactivos por medio de una síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), de acuerdo con una estrategia con Fmoc convencional, usando una resina de amida Rink con base de poliestireno.

Paso 2:

350 μl de HEPES 0,25M en un recipiente Wheaton V

- Se agrega $[\text{68Ga}]\text{GaCl}_3$ en 400 μl de acetona al 97,6%/HCl 0,05 N
- Se ajusta el pH en aproximadamente 3,5 con HCl 0,1 M
- Se agregan 40 μg de péptido en 40 μl de agua
- Se calienta a 75 W (95°C) durante 30 segundos
- Se deja reposar durante 30 segundos
- Se repite el calentamiento y se deja reposar otras tres veces
- Se agregan 5 ml de agua a la mezcla de reacción
- Se inmoviliza en tC18 Light SPE
- Se lava con agua (5 ml)
- Se eluye con EtOH (500 μl)



Rendimiento radioquímico optimizado)	79 -231 MBq (32-60% de (nod.c.)
Actividad inicial	189-593 MBq
Cantidad de marcas	10
Fallas	0
Pureza radioquímica	>98% (por HPLC y ITLC)
Actividad específica	3,2-11,8 GBq/μmol

En la Figura 9 se ilustra el análisis por HPLC del compuesto 2 marcado con Ga-68 en una columna de fase inversa.

Pureza del producto

Columna: ACE, 5 μ , C18 50 x 4,6 mm

Solvente: Solvente A: H₂O + 0,1% de TFA

Solvente B: MeCN + 0,1% de TFA

Gradiente: 5-95% en 7 minutos

Flujo: 2 ml/minuto

Ejemplo 12**Estabilidad en suero del compuesto 2 marcado con Lu-177**

Compuesto 2: DOTA-4-amino-1-carboximetil-piperidin-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

También se investigó la estabilidad en suero del compuesto 2 con una radiomarca de Lu-177 en suero humano. Después de incubar el compuesto 2 marcado con Lu-177 en suero humano durante 96 horas, aún fue posible determinar la presencia de 70% del compuesto intacto con métodos de HPLC (Fig. 11). A 1 ml de suero humano preparado recientemente, que había sido equilibrado con anterioridad en un ambiente con 5% de CO₂ a 37°C, se le agregaron 0,03 nmol de una solución del péptido de referencia marcado con ¹⁷⁷Lu. La mezcla se incubó en un ambiente con 5% de CO₂ a 37°C. En distintos puntos de tiempo, se tomaron alícuotas de 100 μ l (por triplicado) y se las trató con 200 μ l de EtOH para hacer precipitar las proteínas del suero. Después, se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 5000 rpm. Se tomaron 50 μ l de sobrenadante para determinar la actividad en un contador con cavidades γ , se lavó el sedimento dos veces con 1 ml de EtOH y se realizó el

conteo, y luego se comparó la actividad en el sobrenadante con la actividad en el precipitado para obtener el porcentaje de péptidos no unidos a las proteínas o el radiometal transferido a las proteínas del suero. El sobrenadante se analizó por HPLC (eluyentes: A = ácido trifluoroacético al 0,1% en agua y B = acetonitrilo; gradiente: 0 minutos, 95% de A; 20 minutos, 50% de A) para determinar la estabilidad del péptido en suero.

En la Fig. 11 se ilustra la estabilidad del compuesto 2 marcado con Lu-177 en suero humano.

Ejemplo 13

Comparación con F18-colina y F18-FDG

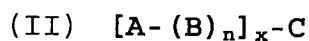
Se comparó la biodistribución de Ga-68 RM2, de acuerdo con la siguiente tabla:

Ga-68-	DOTA-	4-amino-1-carboximetil-piperidin-	D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH2
--------	-------	-----------------------------------	---

1 hora después de la inyección en ratones con tumores PC-3, con la marca de F-18, [¹⁸F]fluoroetilcolina (FEC), usada para realizar el diagnóstico por imágenes del cáncer de próstata, y FDG, la referencia de F18 más usada en oncología. Con las relaciones elevadas observadas entre tumor y tejido, es posible corroborar la utilidad del compuesto con Ga-68 RM2 para el diagnóstico por imágenes por PET. Véase la figura 12.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina con la Fórmula general (I)



donde

x es un entero entre 1 y 3,

n es un entero entre 1 y 6,

A es un quelante para metales que comprende por lo menos un radionúclido de metal,

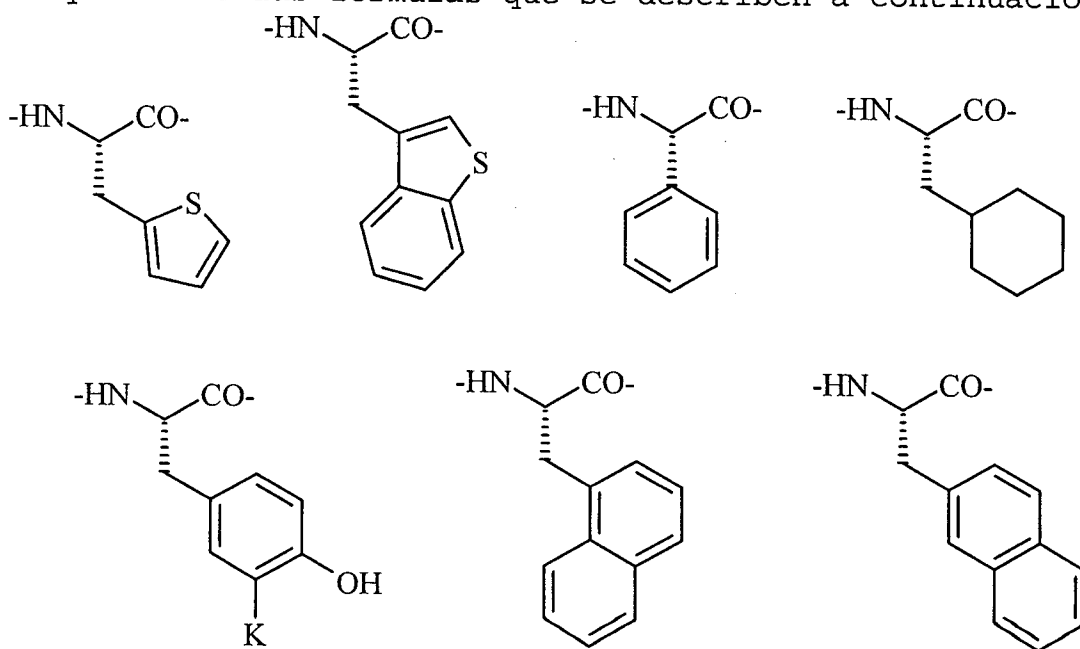
B es un conector separador que conecta con un N terminal de C o una unión covalente,

C es un antagonista peptídico análogo a la bombesina con la secuencia C-1 a C-4, donde:

C-1: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-ZH,

donde:

Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación



K es F, Cl, I, o NO_2 ,

Xaa₂ es Gli o β -Ala,

Xaa₃ es Estatina, análogos e isómeros de Estatina, 4-Am,5-MeHpA, 4-Am,5-MeHxA o aminoácidos sustituidos en α ,

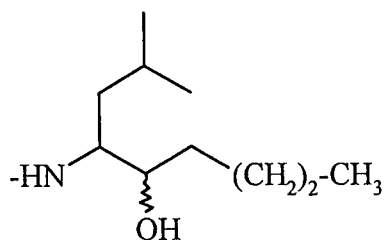
Xaa₄ es Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle, o iso-Bu-Gly, y

Z es NH, O;

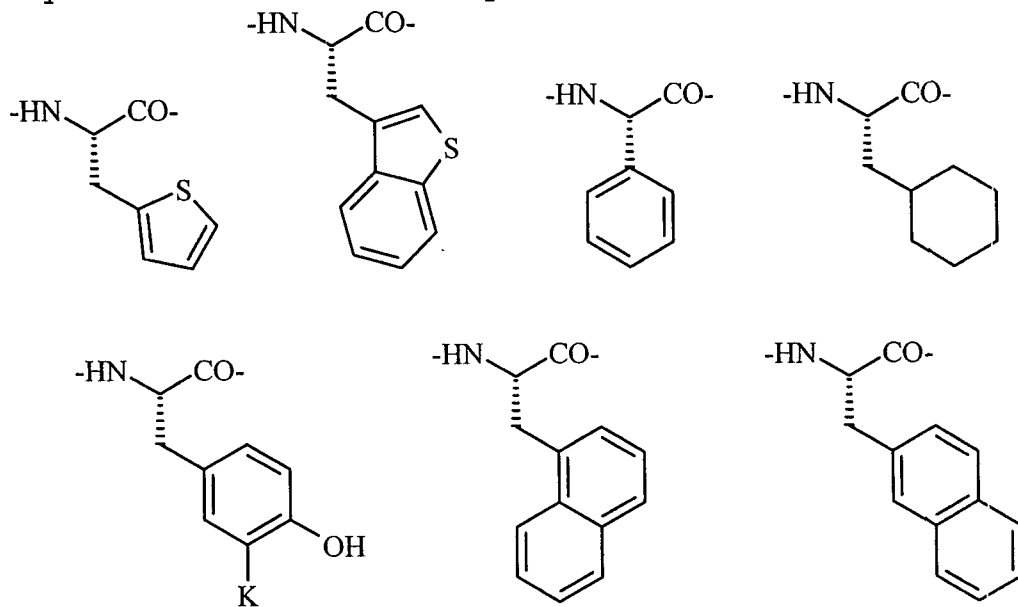
C-2: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

donde:

Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃ es



Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación



y

K es F, Cl, I, o NO_2 ,

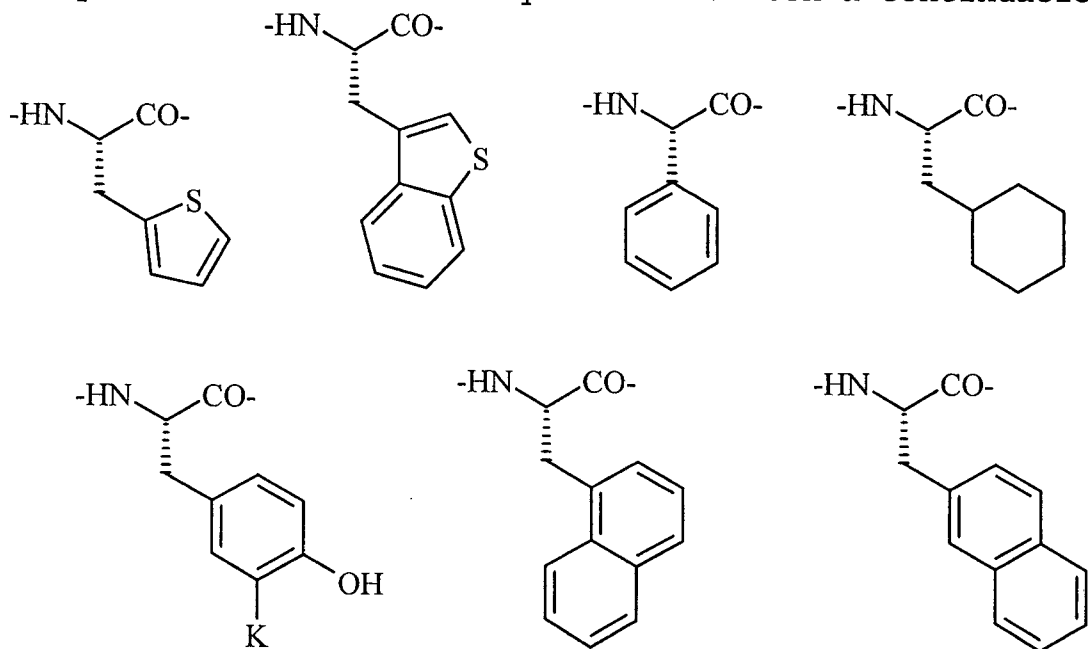
Xaa₂ es Gli o β -Ala;

C-3: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₅¹³-Xaa₆¹⁴-

ZH,

donde:

Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación



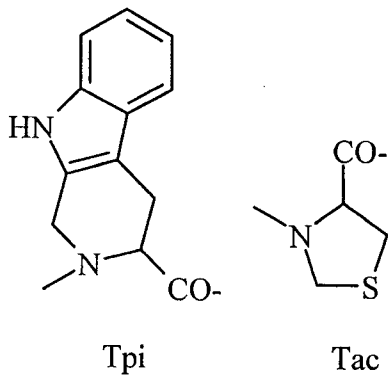
K es F, Cl, I, o NO_2 ,

Xaa₂ es Gli o β -Ala,

Xaa₅ es Leu ψ -CH₂NH-,

Xaa₆ es Cys, Phe, Trp, Tpi o Tac,

donde Tpi y Tac tienen el siguiente significado:



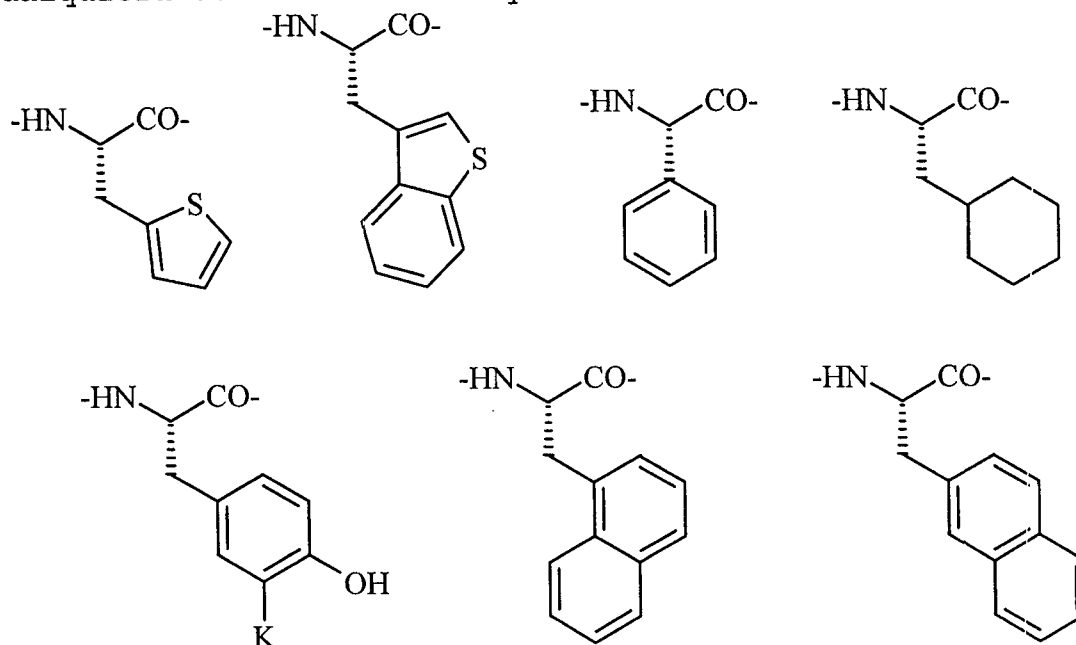
Y

Z es NH, u O;

C-4: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₇,

donde:

Xaa₁ es D-Fe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o un residuo con cualquiera de las fórmulas que se describen a continuación



K es F, Cl, I, o NO₂

Xaa₂ es Gli o β-Ala,

Xaa₇ es Leu-O-Alquilo, o Leu-NH-alquilo,

y sales con un ácido inorgánico u orgánico, hidratos, complejos, ésteres, amidas, solvatos y prodrogas de los mismos aceptables para uso farmacéutico.

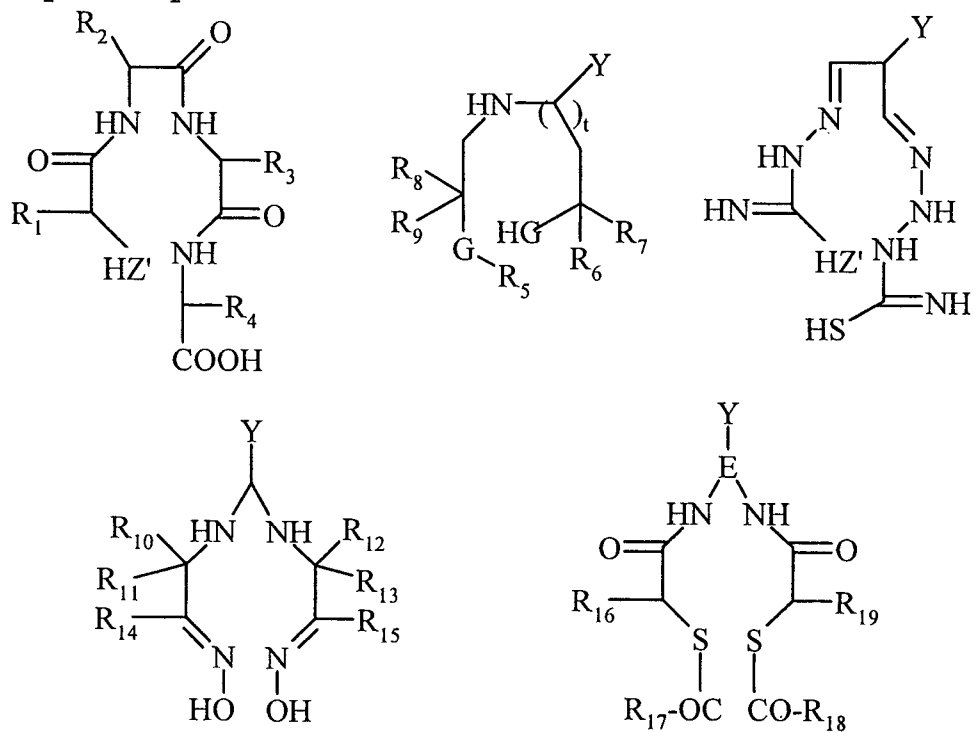
2. El conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con la reivindicación 1 donde el quelante para metales (A) es un quelante para metales trivalentes o para metales pentavalentes y sus análogos cercanos.

3. El conjugado antagonista peptídico análogo a la

122

bombesina de acuerdo con la reivindicación 2 donde el quelante para metales trivalentes se selecciona entre el grupo que comprende quelantes a base de DOTA-, NODASA-, NODAGA-, NOTA-, DTPA-, EDTA-, TETA-, y TRITA- y sus análogos cercanos.

4. El conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con la reivindicación 2 donde el quelante para metales pentavalentes se selecciona entre el grupo que comprende:



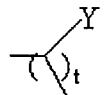
donde

R_1 - R_{15} son, independientemente entre sí, otros átomos de hidrógeno o grupos (C_1 - C_4) alquilo, donde, en la unidad



de la fórmula anterior, t es 1 ó 2 ó 3 y por lo

menos uno de los átomos de carbono en dicha unidad



está sustituido con Y o no está sustituido con Y,

R_{16} es un átomo de hidrógeno o un grupo $\text{CO}_2(\text{C}_1\text{-C}_4)$ -alquilo;

R_{17} y R_{18} son, independientemente entre sí, otro grupo $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ -alquilo o grupos fenilo;

R_{19} es $\text{CH}_2\text{-COOH}$ o un derivado funcional de los mismos;

E es $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ -alquilenos, o fenileno

opcionalmente $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ -alquilenos está sustituido con CO_2 -alquilo, $\text{CH}_2\text{-CO}$ -alquilo, CONH_2 , o $\text{CONHCH}_2\text{-CO}_2$ -alquilo, opcionalmente fenileno está sustituido con CO_2 -alquilo,

donde los grupos alquilo tienen entre 1 y 4 átomos de carbono;

G es NH o S;

Y es un grupo funcional que puede unirse a un grupo amino libre del péptido (N-terminal) o con el separador, y Z' es S u O.

5. El conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con la reivindicación 1 donde el radionúclido de metal para el diagnóstico por imágenes se selecciona entre el grupo que comprende $^{133\text{m}}\text{In}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{52}Fe , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{203}Pb , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{51}Cr , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{157}Gd , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , y ^{82}Br .

6. El conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con la reivindicación 1 donde el radionúclido de metal para radioterapia se selecciona entre

el grupo que comprende ^{186}Re , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{69}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{188}Rd , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{172}Tm , ^{90}Y , ^{111}In , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{125}I , ^{123}I , ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{129}I y $^{177\text{m}}\text{Sn}$.

7. El conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con la reivindicación 1 donde el separador B conectado al N-terminal de C tiene la Fórmula general II:



donde

B_1 es una unión covalente o un aminoácido natural o un aminoácido no natural o una diamina lineal o una diamina cíclica,

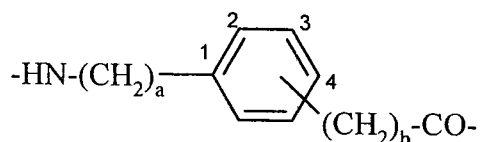
B_2 es una unión covalente o un aminoácido natural o un aminoácido no natural o un ácido carboxílico lineal o un ácido carboxílico cíclico,

con la condición de que ambos B_1 y B_2 no pueden ser uniones covalentes al mismo tiempo y que, cuando B_1 sea una diamina, entonces B_2 será un ácido carboxílico.

8. El conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con la reivindicación 7 donde el aminoácido no natural es un compuesto con cualquiera de las Fórmulas generales III, IV, V o VI

donde

III



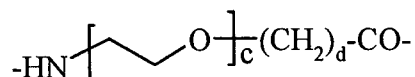
donde

a es un entero entre 0 y 3,

b es un entero entre 0 y 3,

y patrones de sustitución relacionados u opcionalmente 1,2-
, 1,3- ó 1,4-;

IV

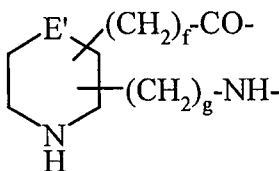


donde

c es un entero entre 1 y 24,

d es un entero entre 1 y 6;

V



donde

E' es NH, o CH₂,

f es un entero entre 0 y 6,

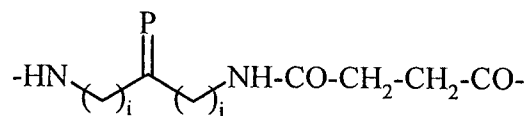
g es un entero entre 0 y 6;

cuando E' es CH₂, entonces el anillo de 6 miembros
opcionalmente está sustituido en cualquier posición del
anillo de 6 miembros que sea un carbono, sobre el mismo
carbono del anillo o sobre carbonos diferentes,

cuando E' es NH, entonces el anillo de 6 miembros
opcionalmente está sustituido en cualquier posición del
anillo de 6 miembros que sea un carbono, sobre el mismo
átomo de carbono del anillo o sobre átomos de carbono
diferentes y/o sobre el átomo de nitrógeno con la salvedad

de que f ó g debe ser un entero mayor o igual que 1;

VI



donde

i es un entero entre 1 y 6,

j es un entero entre 1 y 6,

P es O o H₂.

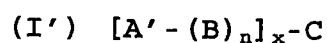
preferiblemente,

i es un entero entre 1 y 3,

j es un entero entre 1 y 3,

P es O, y sus análogos cercanos.

9. El conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con cualquiera de reivindicaciones 1 - 8, donde se hace la salvedad de que el conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina tiene la Fórmula general (I')



donde

A' se incluye en vez de A y tiene el mismo significado que A excepto que el mismo es un quelante para metales libre de radionúclido de metal.

10. Una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los conjugados antagonistas peptídicos análogos a la bombesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. Uso de cualquiera de los conjugados antagonistas

peptídicos análogos a la bombesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que es para unirlos a receptores de bombesina, preferiblemente al receptor del péptido liberador de gastrina (GRP), y/o para inhibir los receptores de bombesina, preferiblemente el receptor del péptido liberador de gastrina (GRP).

12. Un método para preparar cualquiera de los conjugados antagonistas peptídicos análogos a la bombesina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el paso de

- radioquelar un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene la fórmula general (I'), como se definió con anterioridad, con un radionucleido metálico o un átomo metálico apropiado.

13. Un método para realizar el diagnóstico por imágenes de receptores de bombesina, preferiblemente un receptor de GRP, expresados en células tumorales y/o vasos tumorales y peritumorales en un paciente, que comprende los siguientes pasos:

- administrarle a un paciente una cantidad eficaz como radiofármaco de un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8;
- efectuar el diagnóstico por imágenes del radionucleido metálico en el paciente.

14. Uso de una cantidad eficaz como radiofármaco de un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que

es para la fabricación de un agente para realizar el diagnóstico por imágenes de receptores de bombesina, preferiblemente el receptor de GRP, expresados en células tumorales y/o vasos tumorales y peritumorales.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde dichas células tumorales hacen referencia a cánceres seleccionados del grupo que comprende

- cáncer de próstata, incluyendo sus metástasis,
- cáncer de mama, incluyendo sus metástasis,
- tumores del estroma gastrointestinal,
- carcinomas de células pulmonares pequeñas,
- carcinomas de células renales,
- tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos,
- cánceres de células escamosas de cabeza y cuello,
- neuroblastomas, y
- cánceres de células escamosas de esófago,

y donde

dichos vasos tumorales y peritumorales hacen referencia a cánceres seleccionados grupo que comprende

- cánceres de ovario,
- cánceres de endometrio y
- cánceres de páncreas.

16. Un método para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con las células tumorales y/o los vasos tumorales y peritumorales que comprende el paso de

- administrar una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un conjugado antagonista peptídico análogo a la

bombesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

17. Uso de una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que es para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con las células tumorales y/o los vasos tumorales y peritumorales.

18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, donde dichas enfermedades relacionadas con las células tumorales y/o los vasos tumorales y peritumorales se seleccionan del grupo que comprende

- cáncer de próstata, incluyendo sus metástasis,
- cáncer de mama, incluyendo sus metástasis,
- tumores del estroma gastrointestinal,
- carcinomas de células pulmonares pequeñas,
- carcinomas de células renales,
- tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos,
- cánceres de células escamosas de cabeza y cuello,
- neuroblastomas, y
- cánceres de células escamosas de esófago,

y donde

dichas enfermedades relacionadas con los vasos tumorales y peritumorales se seleccionan del grupo que comprende

- cáncer de próstata, incluyendo sus metástasis, y
- cáncer de mama, incluyendo sus metástasis.

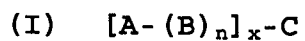
19. Un conjunto de elementos para la preparación de

un agente radioterapéutico o un agente radiofarmacéutico para diagnóstico por imágenes que comprende un recipiente que contiene una cantidad predeterminada del conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina de acuerdo con la reivindicación 9 y un vehículo, un diluyente, un excipiente o un coadyuvante aceptable para el uso farmacéutico, para radiomarcarse un quelante de metales.

CONJUGADOS ANTAGONISTAS PEPTÍDICOS ANÁLOGOS A LA BOMBESINA

RESUMEN

Un medicamento de diagnóstico y terapéutico que comprende un conjugado antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene la fórmula general (I), donde A es un quelante de metales que comprende al menos un radionucleido metálico, B es un separador unido al extremo N de C, o un enlace covalente, y C es un antagonista peptídico análogo a la bombesina que tiene una secuencia como la reivindicada, donde además, x es un número entero entre 1 y 3, y n es un número entero entre 1 y 6.



(Fig. 1)

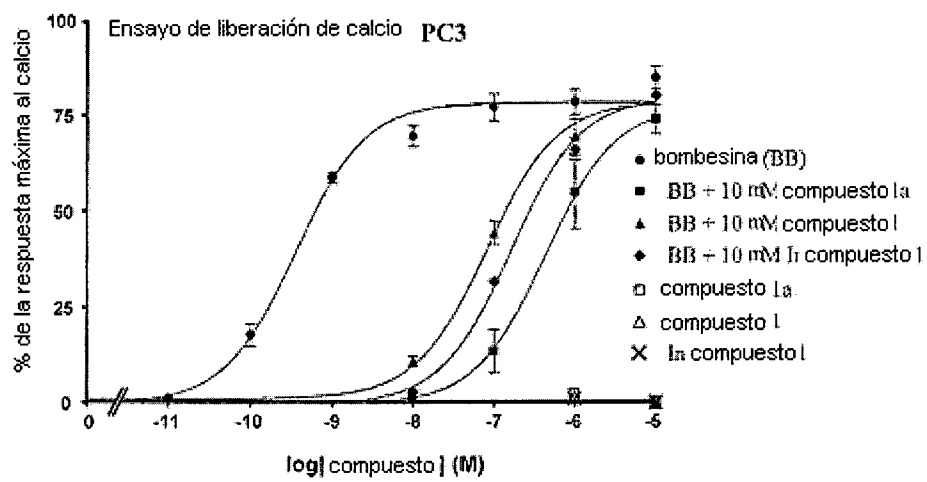


Fig.1

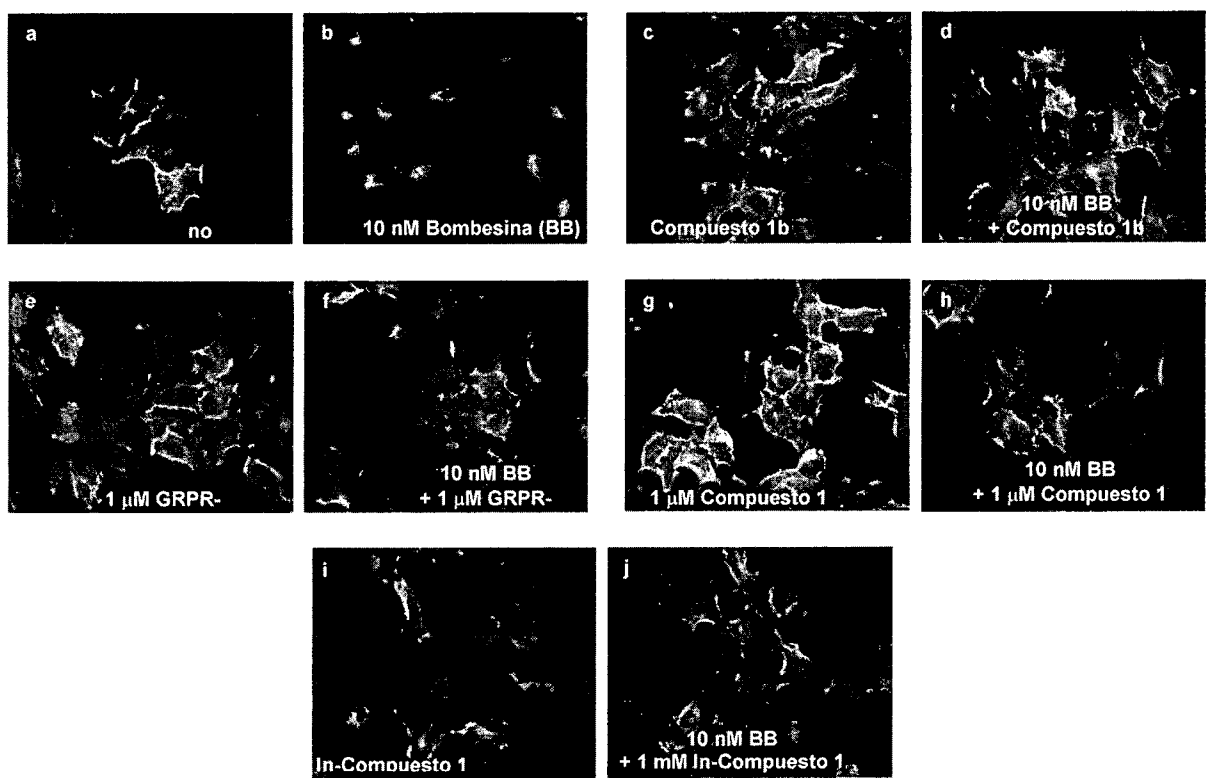


Fig. 2

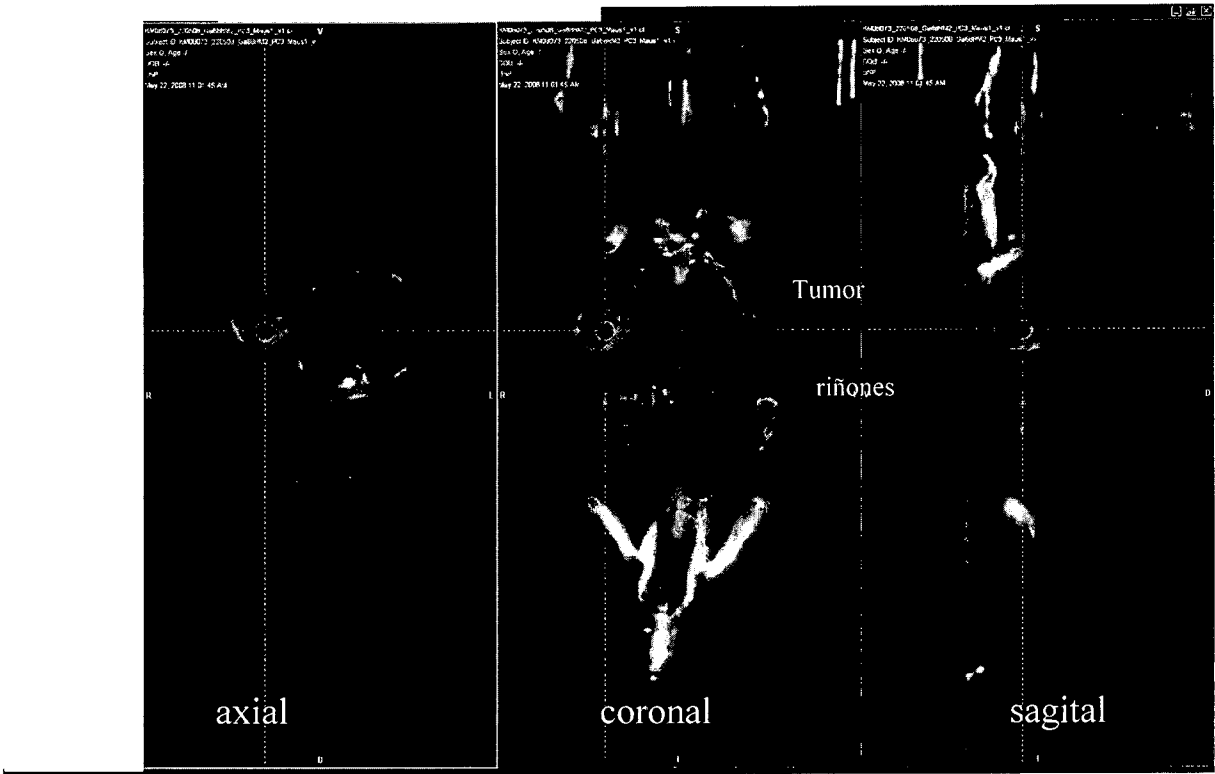


Fig. 3a

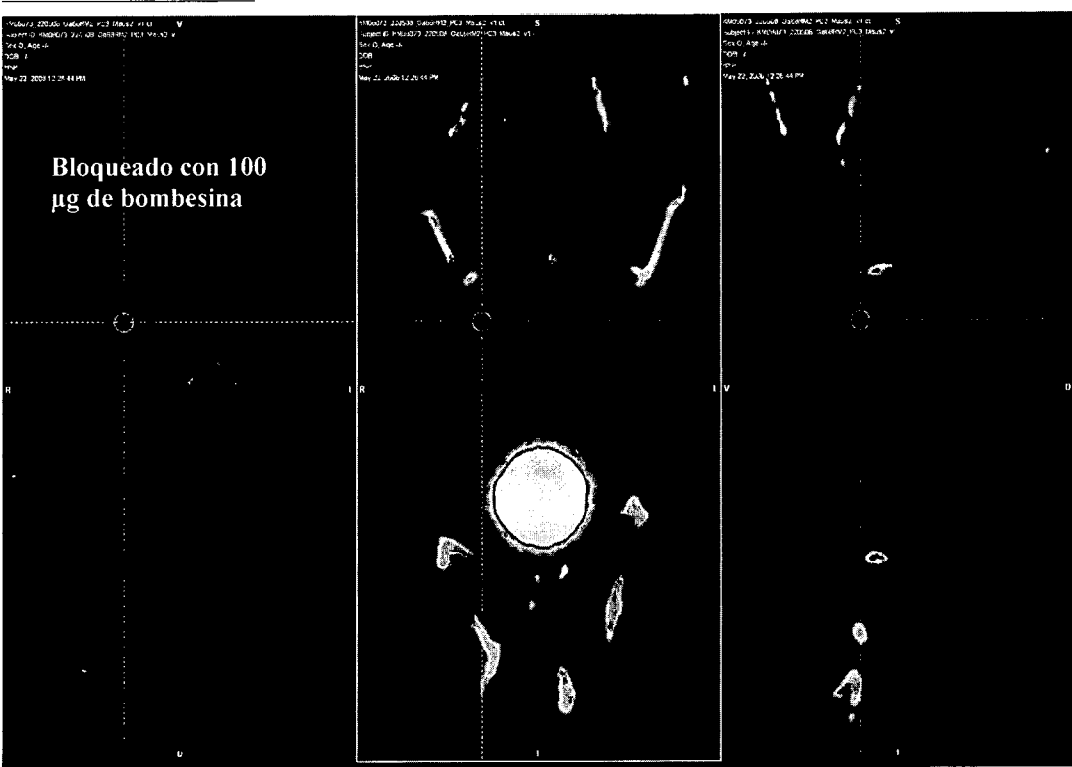


Fig. 3b

130

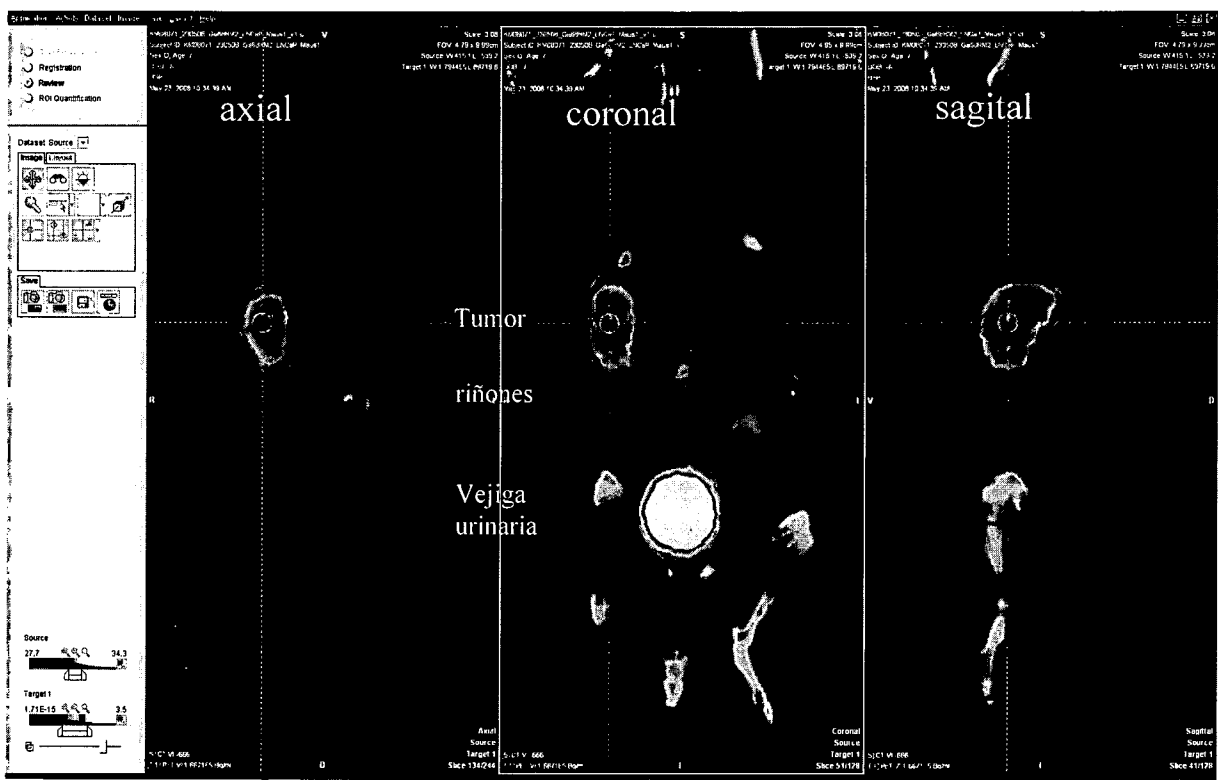


Fig. 4a

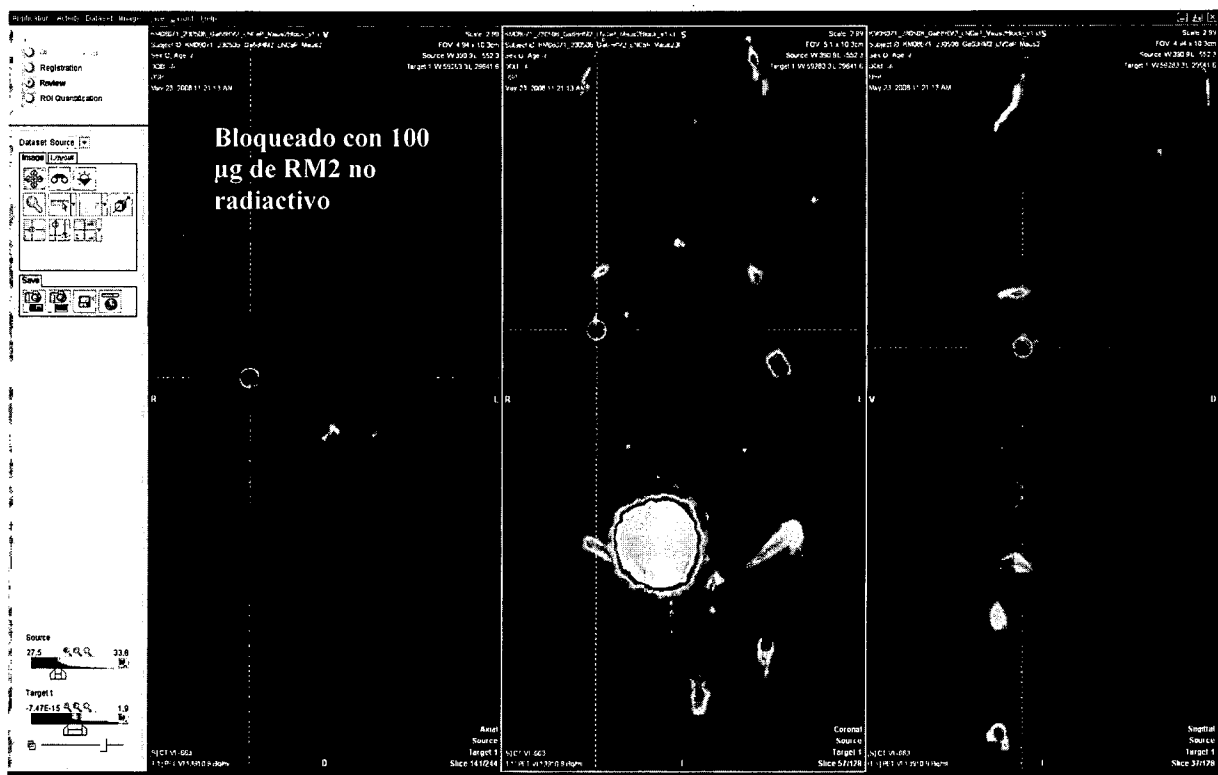
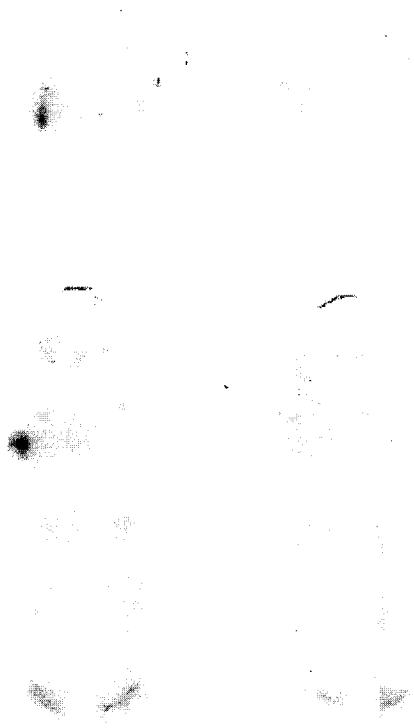


Fig. 4b



12 h pi

bloqueado

Fig. 6

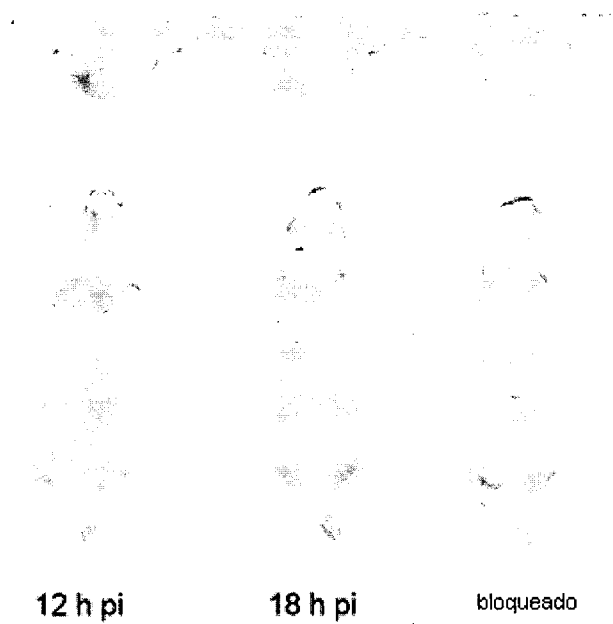


Fig. 8

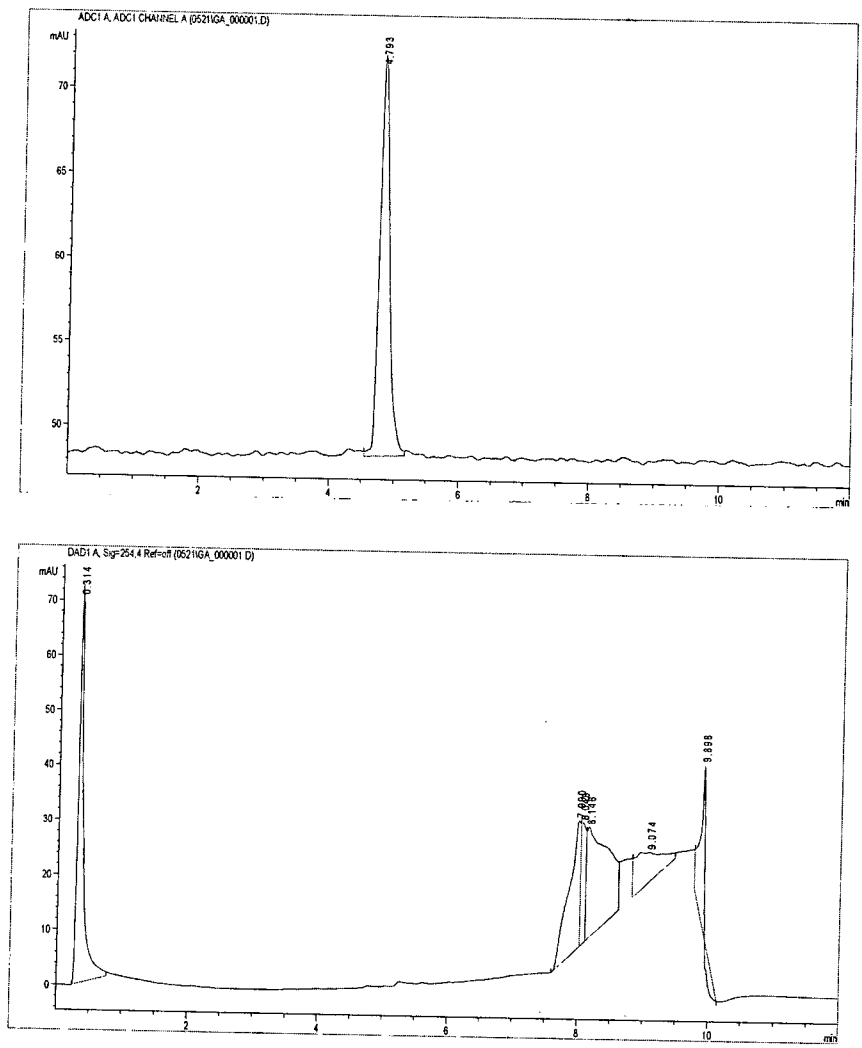


Fig. 9

125

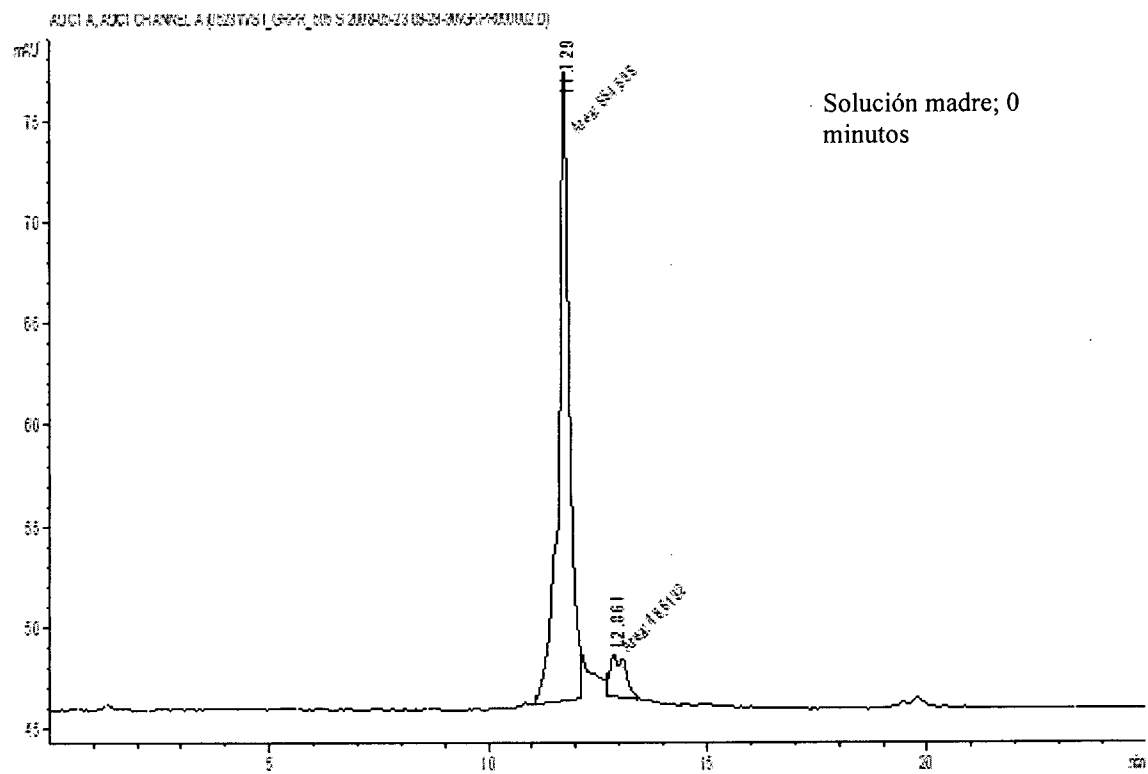


Fig. 10a

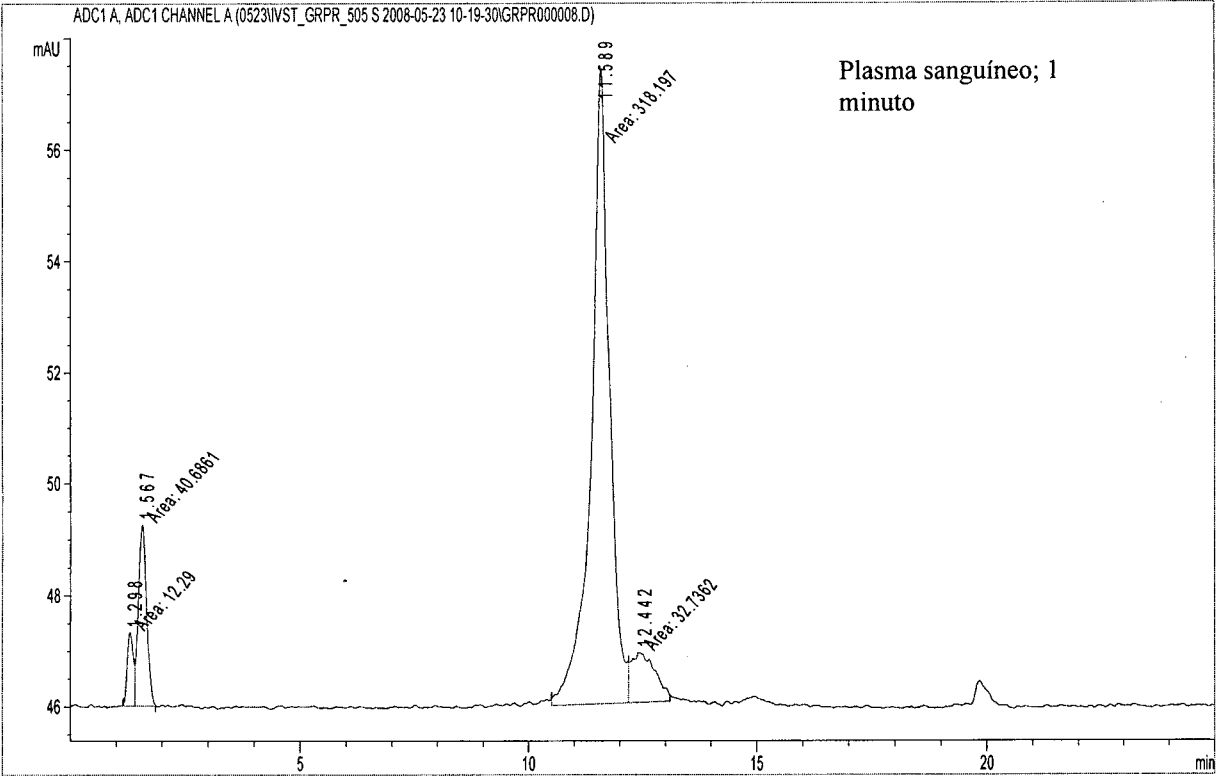


Fig. 10b

137

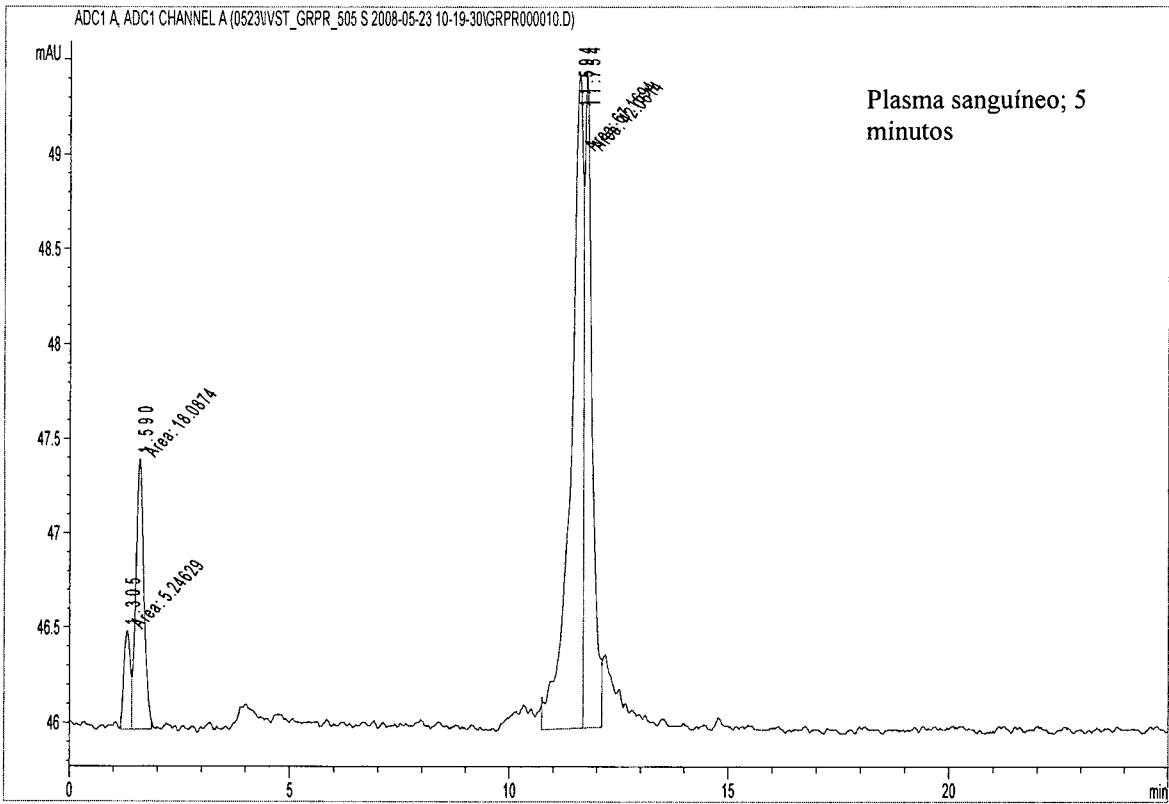


Fig. 10c

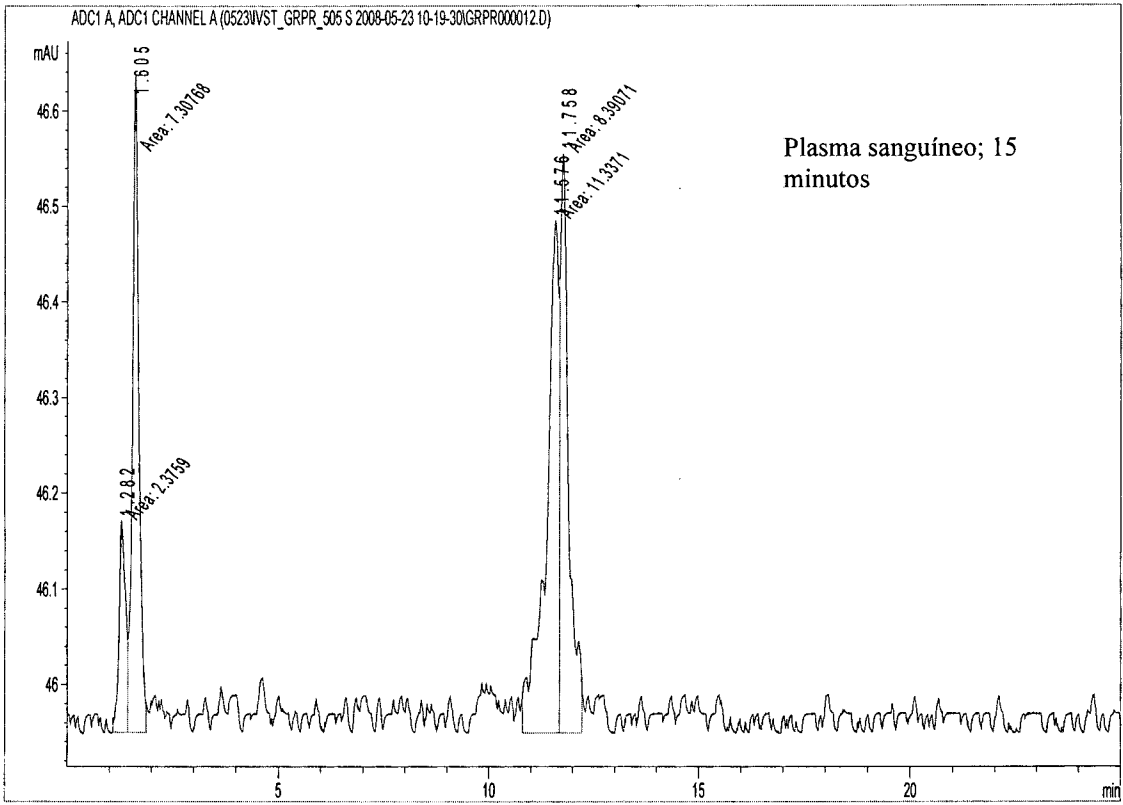


Fig. 10d

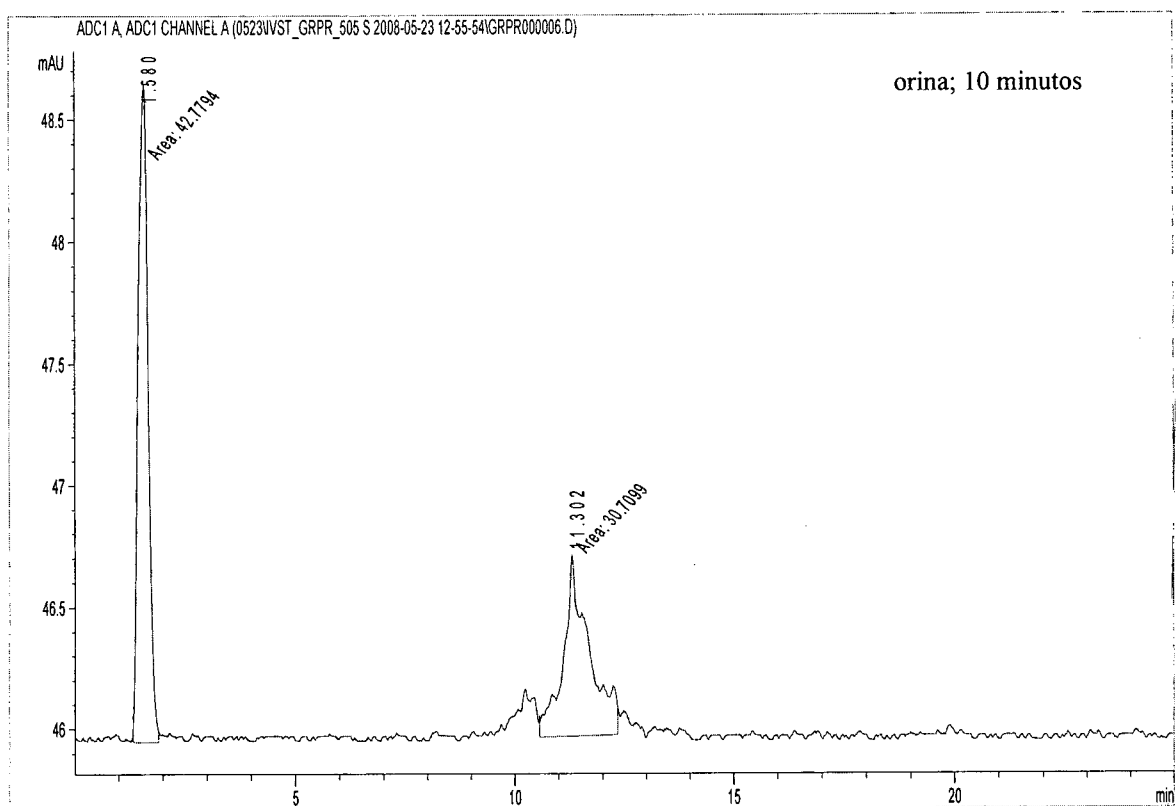


Fig. 10e

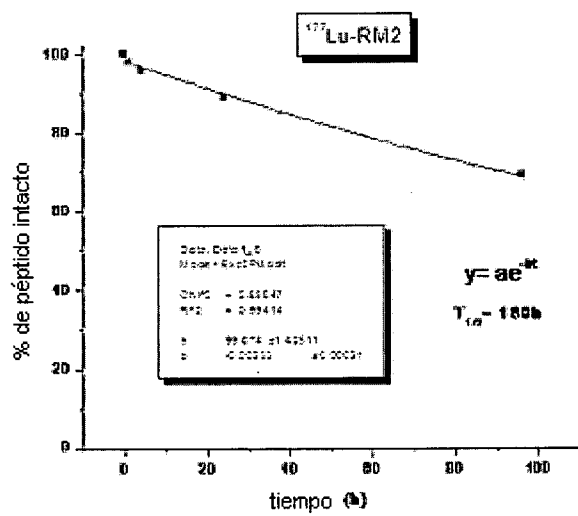


Fig. 11

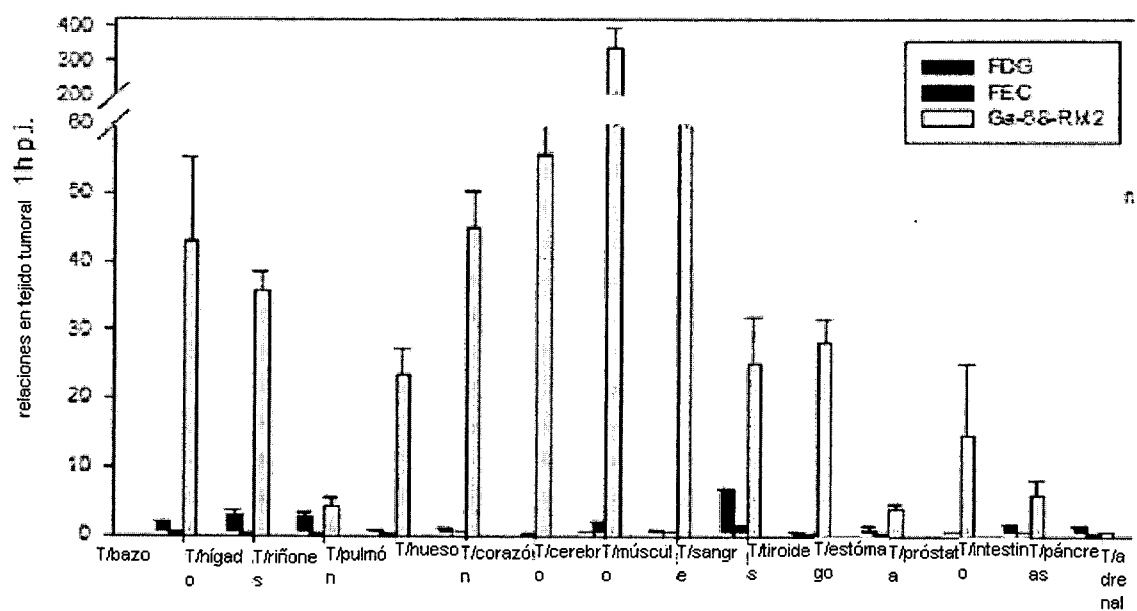


Fig 12

142

**TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES**

PCT
Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente <i>BSP53826A-WO</i>	PROCEDER Ver notificación formulario PCT/ISA/220, así como, en tanto corresponda, el punto 5.abajo	
Referencia Internacional <i>PCT/EP 2009/001403</i>	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) <i>27/02/2009</i>	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) <i>07/03/2008</i>
Solicitante <i>UNIVERSITÄTSSPITAL BERN</i>		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el Organismo de Búsqueda Internacional y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 5 hojas.

☒ Además se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica mencionados en este informe

1. Fundamentos del Informe

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo sobre la base de:

- ☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada
☐ una traducción de la solicitud internacional al _____, que es el idioma de una traducción suministrada a los fines de la búsqueda internacional (reglas 12.3(a) y 23.1 (b)).

b. ☐ Este informe de búsqueda internacional ha sido confeccionado teniendo en consideración la **rectificación de un error obvio**, autorizada por o notificada a este organismo según la regla 91 (regla 43.6bis(b))

c. ☐ Con respecto a los **nucleótidos y/o aminoácidos** revelados en la solicitud internacional, ver campo N° 1

2. ☐ **Determinadas reivindicaciones no eran investigables** (ver campo II).

3. ☐ **La invención carece de unidad** (ver campo III).

4. Con respecto al título,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al resumen,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo, de acuerdo con la regla 38.2 b), en la versión indicada en el campo IV. El solicitante puede presentar una posición ante el organismo durante el transcurso de un mes a partir de la fecha de envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. Con respecto a las ilustraciones

a. Con el resumen se debe publicar la siguiente figura de Las ilustraciones: figura N° —.

- ☐ sugerida por el solicitante.
☐ seleccionada por el organismo, dado que el mismo solicitante no sugiere ninguna figura.
☐ seleccionada por el organismo, dado que esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☒ con el resumen no se publica ninguna de las ilustraciones

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/EP 2009/001403

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. C07K7/08 A61K51/08

Según la clasificación internacional de patentes (IPC) o las clasificaciones nacional e IPC

B. ÁMBITOS INVESTIGADOS

Documentación mínima investigada (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación)

C07K A61K

Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado

Banco electrónico de datos consultado durante la búsqueda internacional (nombre del banco de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI DATA, PAJ, CHEM ABS DATA

C. ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación N°
X	CESCATO RENZO ET AL.: "Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting" JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 49, N° 2, febrero de 2008 (2008-02 páginas 318-326, xp002192469 ISSN: 0161-5505 mencionado en la solicitud	1, 2, 5, 9-19
Y	todo el documento	1-19
X	EP 1 181 926 A (N C S R DEMOKRITOS INST OF RAD [GR]) 27 de febrero de 2002 (2002-02-27) todo el documento: ver especialmente párrafos 34-35	1, 2, 5 9-19

☒ Otras publicaciones están listadas en la continuación del campo C☒ Ver familia de patentes en el anexo

"A" publicación que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante

"B" documento anterior pero publicado recién o después de la fecha de presentación internacional

"L" publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada)

"O" publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones

"P" publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada

"T" publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa

"X" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva

"Y" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista

"&" publicación que es miembro de la misma familia

Fecha de finalización de la búsqueda internacional

22 de junio de 2009

Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional

10/07/2009

Nombre y Dirección Postal del ISA SE

Oficina de Patentes Europea

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel (+31-70) 340-2040; Tx 31 651 epo nl.

Fax N° (+31-70) 340-3010

Funcionario Apoderado

Groenendijk, Matti

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/EP 2009/001403

Categoría*	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación N°
X	US 2008/008649 A1 (CAPPELLETTI ENRICO [IT]) 10 de enero de 2008 (2008-01-10) mencionado en la solicitud	1-3, 5-19
Y	todo el documento: ver, en particular, fig. 39	1-19
Y	TOKITA K ET AL.: "Molecular basis for selectivity off high affinity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US vol. 276, N° 39, 28 de septiembre de 2001 (2001-09-28) páginas 36652-36663, XP002325293 ISSN: 0021-9258 todo el documento	1-19
Y	MANTEY SAMUEL ET AL.: "Discovery of a high affinity rdioligand for the human orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US vol. 272, N° 41, 1 de enero de 2007 (2007-01-01) páginas 26062-26071, XP002186411 ISSN: 0021-9258 ver, en particular, la tabla IV	1-19
Y	RADULOVIC E A: "Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonona peptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi" INT. J. PEPTIDE PROTEIN RES., vol. 38, 1991, páginas 593-600, XP008095457 tabla 1	1-19
Y	COR D ET AL.: "SHORT CHAIN BOMBESIN PSEUDOPEPTIDES WITH POTENT BOMBESIN RECEPTOR ANTAGONIST ACTIVITY IN RAT AND GUINEA-PIG PANCREATIC ACINAR CELLS" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY vol. 190, N° 1-2, 1990, páginas 31-38, XP002492471 ISSN: 0014-2999 tabla 1	1-19

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/EP 2009/001403

Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación N°
Y	AZAY J ET AL.: "COMPARATIVE STUDY OF IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITIES OF BOMBESIN PSEUDOPEPTIDE ANALOGS MODIFIED ON THE C-TERMAL DIPEPTIDE FRAGMENT" PEPTIDES, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 10, N° 1, 1 de enero de 1998 (1998-01-01), páginas 57-63 XP001040335 ISSN: 0196-9781 tabla 1	1-19
P, X	WANG XUEJUAN ET AL.: "A new highly potente DOTA-conjugated bombesin antagonista for GRPr-positive tumor targeted imaging" JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, vol. 14, N°8, Suppl. S, agosto de 2008 (2008-08, página 154, XP002433350 & 30TH EUROPEAN PEPTIDE SYMPOSIUM); HELSINKI, FINLAND, AGOSTO 31 SEPTEMBER 05, 2008 ISSN: 1075+-2617 P41815-046	1-15, 19

145

146

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Detalle de publicaciones que pertenecen a la misma familia de patentes

Referencia Internacional
PCT/EP 2009/001403

Documentos de Patente citados en el Informe de Búsqueda			Fecha de la publicación	Miembros de la familia de patentes			Fecha de la publicación
EP	1181936	A	27-02-2002	GR	1003661	B1	05-09-2001
US	2008008649	A1	10-01-2008	WO	2007095443	A2	23-08-2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/001403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K7/08 A61K51/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CESCATO RENZO ET AL: "Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting" JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 49, no. 2, February 2008 (2008-02), pages 318-326, XP002492469 ISSN: 0161-5505 cited in the application	1,2,5, 9-19
Y	the whole document	1-19
X	EP 1 181 936 A (N C S R DEMOKRITOS INST OF RAD [GR]) 27 February 2002 (2002-02-27) The whole document: see especially par. 34-35	1,2,5, 9-19
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 2009

Date of mailing of the international search report

10/07/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Groenendijk, Matti

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/001403

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/008649 A1 (CAPPELLETTI ENRICO [IT] ET AL) 10 January 2008 (2008-01-10) cited in the application	1-3,5-19
Y	The whole document; see particularly fig.39	1-19
Y	TOKITA K ET AL: "Molecular basis for selectivity of high affinity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 276, no. 39, 28 September 2001 (2001-09-28), pages 36652-36663, XP002325293 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-19
Y	MANTEY SAMUEL A ET AL: "Discovery of a high affinity radioligand for the human orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 272, no. 41, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 26062-26071, XP002186411 ISSN: 0021-9258 See particularly Tab. IV	1-19
Y	RADULOVIC E.A.: "Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonona peptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi" INT. J. PEPTIDE PROTEIN RES., vol. 38, 1991, pages 593-600, XP008095457 table 1	1-19
Y	COY D ET AL: "SHORT CHAIN BOMBESIN PSEUDOPEPTIDES WITH POTENT BOMBESIN RECEPTOR ANTAGONIST ACTIVITY IN RAT AND GUINEA-PIG PANCREATIC ACINAR CELLS" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 190, no. 1-2, 1990, pages 31-38, XP002492471 ISSN: 0014-2999 table 1	1-19

-/--

148

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/001403

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AZAY J ET AL: "COMPARATIVE STUDY OF IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITIES OF BOMBESIN PSEUDOPEPTIDE ANALOGS MODIFIED ON THE C-TERMAL DIPEPTIDE FRAGMENT" PEPTIDES, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 19, no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 57-63, XP001040335 ISSN: 0196-9781 table 1	1-19
P,X	WANG XUEJUAN ET AL: "A new highly potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for GRPr-positive tumor targeted imaging" JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, vol. 14, no. 8, Suppl. S, August 2008 (2008-08), page 154, XP002533350 & 30TH EUROPEAN PEPTIDE SYMPOSIUM; HELSINKI, FINLAND; AUGUST 31 SEPTEMBER 05, 2008 ISSN: 1075-2617 P41815-046	1-15,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/001403

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 1181936	A	27-02-2002	GR	1003661 B1	05-09-2001
US 2008008649	A1	10-01-2008	WO	2007095443 A2	23-08-2007

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

Notificación de registro de
una modificación(regla PCT 92bis.1 e
Instrucciones Administrativas, sección 422)

A:

BURKERT, Frank
c/o Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft
Müllerstr. 178
13353 Berlin
ALEMANIA

Fecha de envío (día/mes/año):

06 de agosto de 2010 (06.08.2010)

Referencia del solicitante o del agente:

BSP53826A-WO

Solicitud Internacional N°:

PCT/EP 2009/001403

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Fecha de presentación (día/mes/año):

27 de febrero de 2009 (27.02.2009)

1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a:

☒ el solicitante☐ el inventor☐ el agente☐ el representante común

Nombre y dirección:

UNIVERSITÄTSSPITAL BERN
Hebelstrasse 32
CH-4031 Basilea
Suiza

País de
Nacionalidad
CHPaís de
Residencia
CH

Teléfono N°:

Facsimil N°:

Dirección de E-mail

2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación,
concerniente a:☐ la persona☒ el nombre☐ el domicilio☐ la nacionalidad☐ la residencia

Nombre y dirección:

UNIVERSITÄTSSPITAL BASEL
Hebelstrasse 32
CH-4031 Basilea
Suiza

País de
Nacionalidad
CHPaís de
Residencia
CH

Teléfono N°:

Facsimil N°:

Dirección de correo electrónico

☐ Notificaciones por E-mail
autorizadas

3. Otras observaciones, si son necesarias:

4. Se envía una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina receptora☐ el Organismo de Búsqueda Internacional☐ el Organismo especificado para búsquedas
suplementarias☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional☒ las Oficinas designadas concernientes☐ las Oficinas seleccionadas concernientes☐ otros:

La Oficina Internacional de WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Suiza

Funcionario autorizado:

Hewitson Anne
e-mail: pt05.pct@wipo.int

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT**Notificación de registro de
una modificación**(regla PCT 92bis.1 e
Instrucciones Administrativas, sección 422)

A:

BURKERT, Frank
c/o Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft
Müllerstr. 178
13353 Berlin
ALEMANIA

Fecha de envío (día/mes/año): 06 de agosto de 2010 (06.08.2010)	
Referencia del solicitante o del agente: BSP53826A-WO	NOTIFICACIÓN IMPORTANTE
Solicitud Internacional N°: PCT/EP 2009/001403	Fecha de presentación (día/mes/año): 27 de febrero de 2009 (27.02.2009)

1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a:		
☒ el solicitante	☒ el inventor	☐ el agente
☐ el representante común		
Nombre y dirección: MANSI, Rosalba Langackerstrasse 2 CH-4142 Münchenstein Suiza	País de Nacionalidad CH	País de Residencia CH
	Teléfono N°:	
	Facsímil N°:	
	Dirección de E-mail	
2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación, concerniente a:		
☐ la persona	☐ el nombre	☐ el domicilio
☒ la nacionalidad		
☐ la residencia		
Nombre y dirección: MANSI, Rosalba Langackerstrasse 2 CH-4142 Münchenstein Suiza	País de Nacionalidad IT	País de Residencia CH
	Teléfono N°:	
	Facsímil N°:	
	Dirección de correo electrónico ☐ Notificaciones por E-mail autorizadas	
3. Otras observaciones, si son necesarias:		
4. Se envía una copia de esta notificación a:		
☒ la Oficina receptora	☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional	
☐ el Organismo de Búsqueda Internacional	☒ las Oficinas designadas concernientes	
☐ el Organismo especificado para búsquedas suplementarias	☐ las Oficinas seleccionadas concernientes	
	☐ otros:	

La Oficina Internacional de WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Suiza

Funcionario autorizado:

Hewitson Anne
e-mail: pt05.pct@wipo.int



No. 10-110036- -00000-0000

Fecha: 2010-09-06 17:13:45

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 150

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
RAISBECK J. IAN
Apoderado(a) y/o Representante de
INIVERSITAT BERN

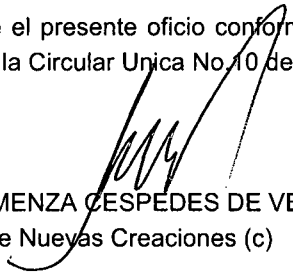
REFERENCIA	Radicación No.	10 110036
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/001403
	Fecha inicio fase nacional	07/10/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>12857</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

07 OCT. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
RAISBECK J. IAN
Apoderado(a) y/o Representante de
INIVERSITAT BERN

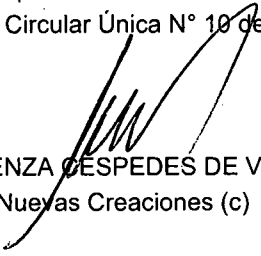
REFERENCIA	Radicación No.	10 110036
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/001403
	Fecha inicio fase nacional	07/10/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

NO 1 2858

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA GÓSPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

01 OCT. 2010