

Radiofármacos basados en el ácido

((R)-1-((6-hidrazinilnicotinoil)-D-alanil)pirrolidin-2-il)borónico (HYNIC-iFAP) para la detección de la sobreexpresión de la proteína de activación de fibroblastos

5 DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos radiofármacos basados en el inhibidor de
10 la proteína de activación de fibroblastos (iFAP) denominado ácido ((R)-1-((6-
hidrazinilnicotinoil)-D-alanil)pirrolidin-2-il)borónico (HYNIC-iFAP), donde los
nitrógenos de la hidracina del HYNIC actúan como grupos químicos favorables para
la interacción de la molécula HYNIC-iFAP con la fenilalanina (Phe-350 y Phe-351),
el ácido glutámico (Glu-203 y Glu-204) y con la serina (Ser-624), centro activo
15 esencial de la proteína de activación de fibroblastos (FAP), aunado al uso
convencional del HYNIC como un agente quelante para el radiometal ^{99m}Tc. En
particular, el nuevo radiofármaco HYNIC-iFAP marcado con ^{99m}Tc, detecta con alta
afinidad *in vivo*, a la FAP expresada en el microambiente tumoral mediante técnicas
de imagen molecular SPECT en medicina nuclear.

20

ANTECEDENTES

La proteína de activación de fibroblastos (FAP) es una serina proteasa de tipo II
que escinde los péptidos ubicados después de los residuos de prolina con
25 actividades de dipeptidil-peptidasa y endopeptidasa. La FAP se expresa en gran
medida en la superficie celular del fibroblasto estromal activado presente en la
mayoría de los tumores epiteliales humanos, pero no en los fibroblastos normales.
Los fibroblastos asociados al cáncer contribuyen hasta en un 90% a la masa tumoral
macroscópica [Hamson *et al.* *Understanding fibroblast activation protein (FAP)*:

substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. Proteomics Clin. Appl., 2014, 8, 454-463].

Los inhibidores específicos de FAP se desarrollaron por primera vez como posibles medicamentos contra el cáncer [Aertgeerts et al. *Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein α* . *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 19441–19444; Edosada et al. *Selective inhibition of fibroblast activation protein protease based on dipeptide substrate specificity*. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 7437-7444; Tran et al. *Synthesis and structure–activity relationship of N-acyl-Gly-, N-acyl-Sar- and N-blocked-boroPro inhibitors of FAP, DPP4, and POP*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 2007, 1438–1442]. De todos ellos, los más relevantes son dos grupos de compuestos altamente selectivos, uno basado en una estructura de quinolina-cianopirrolidina y otro basado en el ácido pirrolidina-borónico o también conocido como prolina-borónico (boroPro). Respecto al primer grupo, Jansen y cols. reportaron inicialmente la síntesis de 39 nuevos inhibidores de FAP para explorar la relación estructura-actividad del andamio de 4-quinolinoil-Gly-cianopirrolidina [Jansen et al. *Extended structure activity relationship and pharmacokinetic investigation of (4-quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine inhibitors of fibroblast activation protein* *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 3053-3074]. Los autores informaron que la FAP impone requisitos estructurales estrictos para poder formar enlaces covalentes entre la enzima y el grupo nitrilo presente en estas moléculas [Jansen et al. *Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a (4-quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine scaffold*. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2013, 4, 491-496]. También descubrieron que las N-piridinas dan lugar a inhibidores de FAP de alta selectividad hacia otras enzimas de escisión posterior a la prolina, como las dipeptidil-peptidasas (DPP) y la prolil-oligopeptidasa (PREP). Aunque el fragmento quinolinoílo confiere a la molécula una mayor afinidad por FAP, pues cuando este residuo fue reemplazado por otro sustituto azaheteroaromático, la afinidad por FAP disminuyó drásticamente. Además, se encontró que la adición de flúor o difluoro en el fragmento del anillo de cianopirrolidina mejora la afinidad y selectividad por la FAP. Cuando los autores reemplazaron el residuo de glicina con algunos otros

aminoácidos, la afinidad por PREP aumentó y la potencia de FAP disminuyó significativamente. Como resultado de este estudio, los autores identificaron el andamio de N-(4-quinolinoil)-glicil- (2-cianopirrolidina) como el mejor inhibidor de la FAP. Los estudios farmacocinéticos en ratones del inhibidor de la FAP
5 seleccionado, mostraron una alta biodisponibilidad después de la administración oral, con una semivida plasmática corta y una inhibición de la FAP *in vivo* de larga duración.

Al mismo tiempo, Poplawsky y cols. diseñaron y caracterizaron más de 20 inhibidores a base de prolina-borónico para FAP y PREP [Poplawski *et al.*
10 *Identification of selective and potent inhibitors of fibroblast activation protein and prolyl oligopeptidase. J. Med. Chem., 2013, 56, 3467-3477*]. Los autores informaron que la afinidad por FAP podría aumentarse usando un átomo de nitrógeno piridínico protonado, porque forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo del ácido glutámico (Glu-204) presente en FAP, pero ausente en PREP. Los autores
15 también encontraron que la actividad endopeptidasa de FAP tiene requisitos extremadamente estrictos, aceptando sólo pequeños aminoácidos como glicina o D-alanina. Aunque se prefiere la D-alanina porque el inhibidor retiene la potencia inhibidora FAP en el rango nanomolar y proporciona una selectividad 360 veces mayor para FAP sobre PREP. Con base en estos resultados, Poplawski y cols.
20 establecieron que el N-(piridina-4-carbonil)-D-Ala-boroPro era el mejor inhibidor de la proteína de activación de fibroblastos encontrado.

A pesar del gran número de inhibidores de FAP sintetizados y caracterizados, solo un número limitado de ellos se ha radiomarcado con fines médicos. En 2015, se reportó el primer inhibidor de FAP radiomarcado basado en ácido borónico con
25 yodo-125 (¹²⁵I-MIP-1232) para la formación de imágenes de placa aterosclerótica, aunque es importante aclarar que el I-125 no es un radionúclido útil para imagen por tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT) ni tomografía por emisión de positrones (PET) [Meletta y cols. *Evaluation of the radiolabeled boronic acid based FAP inhibitor MIP-1232 for atherosclerotic plaque imaging. Molecules,*
30 *2015, 20, 2081-2099*].

En 2018, Lindner y Loktev reportaron la conjugación del ácido 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacético (DOTA) con el armazón de 4-quinolinoil-Gly-cianopirrolidina, con el fin de marcarlo con radionúclidos adecuados con fines de obtención de imágenes diagnósticas o bien fines terapéuticos [Lindner et al. *Development of quinoline-based theranostic ligands for the targeting of fibroblast activation protein. J. Nucl. Med.*, 2018, 59, 1415-1422; Loktev et al. *A tumor-imaging method targeting cancer-associated fibroblasts. J. Nucl. Med.*, 2018, 59, 1423-1429]. Los autores desarrollaron quince derivados usando diferentes posiciones para conjugar DOTA al armazón de 4-quinolinoil-Gly-cianopirrolidina a fin de mejorar la captación tumoral y el tiempo de retención de los derivados inhibidores de FAP (FAPI). Los 15 diferentes FAPI se radiomarcaron con ^{177}Lu , ^{90}Y o ^{68}Ga . De todos los complejos de FAPI radiomarcados y notificados, el ^{68}Ga -FAPI-02 y el ^{68}Ga -FAPI-04 demostraron ser los agentes más adecuados para aplicaciones diagnósticas. Posteriormente, los mismos autores reportaron otros derivados del mismo armazón numerados consecutivamente desde FAPI-21 hasta FAPI-55 [Loktev et al. *Development of Fibroblast Activation Protein-Targeted Radiotracers with Improved Tumor Retention. J. Nucl. Med.*, 2019, 60, 1421-1429]. La sustitución del DOTA por el ácido 1,4,7-triazaciclononane-N,N',N''-triacético (NOTA) dio origen al derivado FAPI-74, el cual puede ser marcado con ^{68}Ga y con ^{18}F (^{18}F -AIF, en presencia de AlCl_3) [Giesel et al. *FAPI-74 PET/CT Using Either ^{18}F -AIF or Cold-Kit ^{68}Ga Labeling: Biodistribution, Radiation Dosimetry, and Tumor Delineation in Lung Cancer Patients. J. Nucl. Med.*, 2021, 62, 201-207]. En particular, el FAPI-35 fue desarrollado para su marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y posiblemente ^{188}Re [Lindner et al. *Design and Development of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled FAPI Tracers for SPECT Imaging and ^{188}Re Therapy. J. Nucl. Med.*, 2020, 61, 1507-1513].

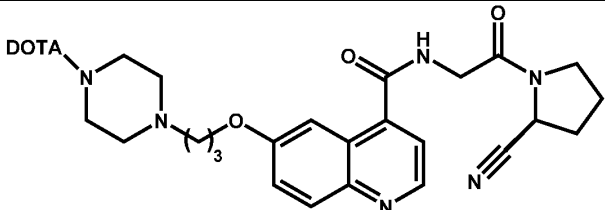
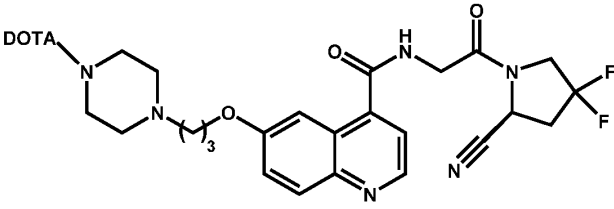
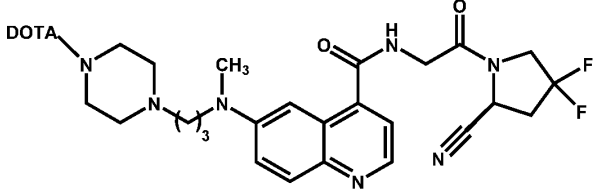
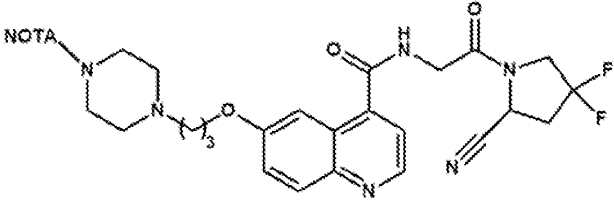
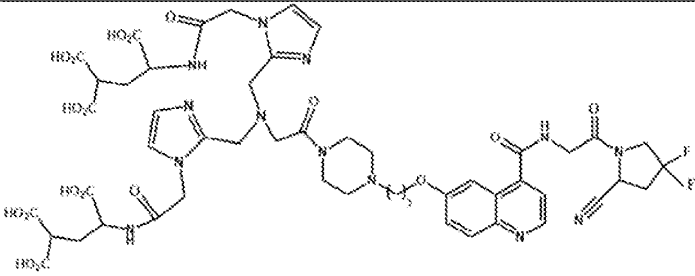
Los primeros inhibidores de la FAP utilizados en humanos para las exploraciones PET fueron ^{68}Ga -FAPI-02 y ^{68}Ga -FAPI-04 [Giesel et al. *^{68}Ga -FAPI PET/CT: biodistribution and preliminary dosimetry estimate of 2 DOTA-containing FAP-targeting agents in patients with various cancers. J. Nucl. Med.*, 2019, 60, 386-392;

Kratochwil et al. *⁶⁸Ga-FAPI PET/CT: Tracer Uptake in 28 Different Kinds of Cancer. J. Nucl. Med., 2019, 60, 801-805*].

Es interesante el par teranóstico ⁶⁴Cu-/²²⁵Ac-FAPI-04, el cual demostró su utilidad en el tratamiento del cáncer de páncreas que sobreexpresa FAP en modelos murinos. La terapia que se dirige a la proteína de activación de fibroblastos es eficaz en el tratamiento del cáncer y podría contribuir al establecimiento de nuevas estrategias de tratamiento [Watabe et al. *Theranostics Targeting Fibroblast Activation Protein in the Tumor Stroma: ⁶⁴Cu- and ²²⁵Ac-Labeled FAPI-04 in Pancreatic Cancer Xenograft Mouse Models. J. Nucl. Med., 2020, 61, 563–569*].

Sin embargo, antes de cualquier tratamiento radioterapéutico, debe evaluarse por imagen nuclear la captación del radiofármaco en los tumores o sus metástasis a fin de confirmar si el tratamiento será o no útil para el paciente, así como para determinar la actividad necesaria a administrar para impartir la dosis de radiación ablativa a los tumores, es decir, se practica la medicina personalizada. Para ello, es necesario utilizar radiofármacos diagnósticos inhibidores de FAP con la finalidad de obtener imágenes moleculares por PET o SPECT. De estas dos técnicas, el PET es la que presenta una mayor resolución espacial y una mayor sensibilidad, por lo que, como anteriormente se describió, los radiofármacos diagnósticos inhibidores de FAP hasta ahora desarrollados y aplicados en estudios clínicos, utilizan ⁶⁸Ga y ¹⁸F unidos a derivados de la 4-quinolinoil-Gly-cianopirrolidina, los cuales son radiofármacos para PET, y solamente en un estudio se ha utilizado un derivado de ^{99m}Tc también unido a la quinolina-cianopirrolidina (ver tabla 1). No obstante, a nivel nacional e internacional, los estudios por SPECT representan más de 70% del total en medicina nuclear por su menor costo y mayor disponibilidad de equipos y radionúclidos, ya que no es necesario tener un ciclotrón dentro de los Hospitales o cercano a éstos. Para imágenes SPECT, el radionúclido más utilizado es el ^{99m}Tc, y no existe publicación alguna dedicada a un estudio sobre radiofármacos para imagen de FAP basados en derivados del ácido pirrolidina-borónico o boro-Pro.

TABLA 1. Estructura química de radiofármacos de ^{68}Ga , ^{18}F y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ inhibidores de FAP hasta ahora desarrollados y utilizados en estudios clínicos por técnicas PET y SPECT.

ESTRUCTURA QUÍMICA	NOMBRE Y USO
	FAPI-02 Radiomarcado con ^{68}Ga Imagen PET
	FAPI-04 Radiomarcado con ^{68}Ga Imagen PET
	FAPI-46 Radiomarcado con ^{68}Ga Imagen PET
	FAPI-74 Radiomarcado con ^{68}Ga y ^{18}F Imagen PET
	FAPI-34 Radiomarcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Imagen SPECT

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se presenta con fines de patente nuevos radiofármacos inhibidores de la proteína de activación de fibroblastos (iFAP) basados en la molécula ácido ((R)-1-((6-hidrazinilnicotinoil)-D-alanil)pirrolidin-2-il)borónico (HYNIC-iFAP), donde los

5 nitrógenos de la hidracina del HYNIC actúan como grupos químicos favorables para la interacción de la molécula HYNIC-iFAP con la fenilalanina (Phe-350 y Phe-351), el ácido glutámico (Glu-203 y Glu-204) y con la serina (Ser-624) en el centro activo de la proteína de activación de fibroblastos (FAP), aunado al uso convencional del

10 HYNIC como un agente quelante para el radiometal ^{99m}Tc , donde el ácido etilendiaminodiacético (EDDA) es usado para completar la esfera de coordinación del radiometal. El nuevo radiofármaco de ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-iFAP (^{99m}Tc -HYNIC-iFAP) detecta, con alta afinidad *in vivo*, a la FAP expresada en el microambiente de tumores malignos de origen epitelial mediante técnicas de imagen molecular SPECT

15 en medicina nuclear. En la figura 1 se muestra esquemáticamente la estructura del radiofármaco de ^{99m}Tc a patentar basado en la estructura HYNIC-iFAP.

Basados en un estudio de acoplamiento molecular, se diseñó y sintetizó el derivado HYNIC-iFAP [((R)-1-((6-hidrazinilnicotinoil)-D-alanil)pirrolidin-2-il)borónico], el cual se comparó en afinidad y constante de inhibición (K_i) con dos de

20 las estructuras más representativas de boroPro reportadas en la literatura, el N-acyl-Gly-boroPro [*Tran et al. Synthesis and structure–activity relationship of N-acyl-Gly-, N-acyl-Sar- and N-blocked-boroPro inhibitors of FAP, DPP4, and POP. Bioorg. Med. Chem. Lett., 17, 2007, 1438–1442*] y el N-(piridina-4-carbonil)-D-Ala-boroPro [*Poplawski et al. Identification of selective and potent inhibitors of fibroblast*

25 *activation protein and prolyl oligopeptidase. J. Med. Chem., 2013, 56, 3467-3477*]. También se obtuvo la afinidad de otro derivado de la molécula HYNIC-iFAP, donde ésta se conjugó al S-2-(4-Isotiocianatobencil)-DOTA (DOTA-Bz-NCS-HYNIC-iFAP), a fin de estudiar si la afinidad de este derivado es adecuada para su potencial marcado con otros radiometales afines al DOTA, tales como el ^{68}Ga , ^{177}Lu , ^{64}Cu ,

30 ^{225}Ac , etc. Para ello, todas las estructuras fueron generadas en ChemDraw (formato

.cdx) y la estructura 3D se exportó en formato .pdb a través del software Chem3D. Empleando el editor molecular AVOGADRO 1.2.0 se optimizó la geometría molecular mediante un campo de fuerza universal (UFF), debido a la presencia de un átomo de boro en cada estructura, con un total de 10,000 pasos. Posteriormente se realizó una segunda optimización de la geometría usando el software semi-empírico de Química Cuántica MOPAC2016 con un nivel de teoría PM7 exportando la configuración espacial resultante a formato .pdb.

La estructura cristalina de la subunidad alfa de la proteína activadora de fibroblastos (FAP) se obtuvo a través de la base de datos RSCB Protein Data Bank (PDB ID: 1Z68). Para poder utilizarla como macromolécula receptora en los cálculos de acoplamiento molecular, se editó la molécula en BIOVIA Discovery Studio 2021 para eliminar moléculas de agua y residuos manifestados en la difracción de rayos X, dejando únicamente la cadena principal de aminoácidos en el fichero .pdb. Se eliminó también la cadena A del dímero representado en el modelo, dejando sólo la cadena B. Debido a que el modelo tridimensional de la macromolécula implica una resolución de 2.60 Å, se realizó un paso de modelado por homología a través de la plataforma en línea SWISS-MODEL. La estructura resultante se guardó en formato pdb para usarla como receptor. Tanto el receptor como las estructuras derivadas de HYNIC-iFAP se prepararon con la librería OPEN BABEL GUI 2006 indicando la adición de hidrógenos faltantes y su optimización molecular para un pH fisiológico (pH=7.4), generando nuevamente las estructuras en formato .pdb. La paquetería de software AutoDock Tools 1.5.6 se empleó para configurar al receptor como macromolécula y cada uno de los ligandos en archivos separados exportando los ficheros en extensión .pdbqt. La caja de búsqueda se configuró en el sitio hidrofóbico S1 entorno a la Ser-624 del receptor como lo sugiere Poplawsky y colaboradores en 2013, como centro se establecieron las coordenadas XYZ 18.948, 10.676, 28.989 respectivamente y un tamaño de 90 en cada eje de la caja. Respecto a los ligandos fue necesario modificar el archivo <<AD4_parameters.dat>> para agregar los parámetros para el átomo de Boro disponibles en <http://mgldev.scripps.edu/pipermail/autodock/2009-March/005439.html>.

La ejecución del acoplamiento molecular proteína-ligando, se realizó con la paquetería AutoDock 4.2.6 calculando previamente las cuadrículas necesarias .map con la herramienta AutoGrid 4.2.6. El archivo de registro con los resultados del acoplamiento molecular se visualizó en AutoDock Tools exportando a formato .pdb
5 el complejo con mejor puntuación de afinidad. La visualización y análisis de distancias e interacciones se realizó por medio de BIOVA Discovery Studio Visualizer 2021.

El cálculo de la constante de inhibición (K_i) se realizó a través de la ecuación:

$$K_i = e^{\left[\frac{\text{afinidad}}{RT}\right]}$$

10 Donde:

Afinidad: Corresponde al valor obtenido en la función de puntuación con AutoDock 4.2.6

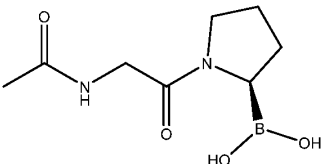
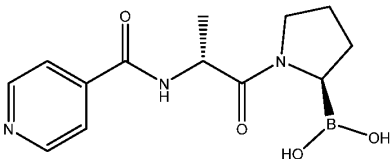
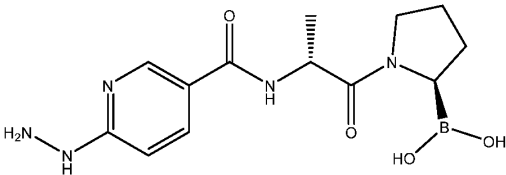
R: Corresponde al valor de la constante termodinámica de los gases ideales (0.00198179 kcal/mol K)

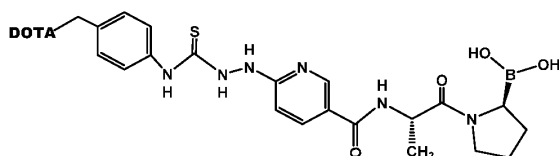
15 *T*: Corresponde al valor de temperatura en escala absoluta 298.15 K que maneja AutoDock 4.2.6 en los cálculos de acoplamiento molecular.

El valor de K_i se obtiene en unidades Molares (M). En la tabla 2 se presentan las puntuaciones de afinidad, las constantes de inhibición K_i , y distancia a la Ser624 para cada ligando. Como se evidencia en la tabla 2, la molécula HYNIC-iFAP mostró
20 una constante de inhibición 26 veces menor ($K_i=0.536$ nM) respecto al derivado N-(piridina-4-carbonil)-D-Ala-boroPro ($K_i=14.07$), lo que significa una mayor potencia inhibidora de HYNIC-iFAP por la FAP.

TABLA 2. Puntuaciones de afinidad determinadas por acoplamiento molecular (AutoDock), así como las constantes de inhibición (K_i), y distancia de interacción entre el residuo boro y la Serina 624 de la proteína de activación de fibroblastos (FAP) para cada ligando boroPro.

5

Ligando boroPro	Afinidad (kcal/mol)	K_i (nM)	Distancia Ser624-B (Å)
N-acyl-Gly-boroPro 	-4.80	296.46	3.398
N-(pyridine-4-carbonyl)-D-Ala-boroPro 	-6.60	14.07	3.657
HYNIC-iFAP 	-8.53	0.536	3.274
DOTA-Bz-NCS-HYNIC-iFAP	-8.89	0.292	4.496



En concordancia con el mapa de interacción del HYNIC-iFAP y los residuos de aminoácidos del centro activo de la FAP obtenidos en el estudio de acoplamiento molecular, el incremento de la afinidad de HYNIC-iFAP, respecto al N-(piridina-4-carbonil)-D-Ala-boroPro, se debe a la presencia de los nitrógenos de la hidracina del HYNIC, los cuales favorecen las interacciones del tipo van der Waals y puentes de hidrógeno de la molécula HYNIC-iFAP en su acoplamiento al centro activo de la FAP, principalmente con los residuos Glu-203, Glu-204, Phe-350 y Phe-351, así como una mayor cercanía para la interacción con la Ser-624 (mapa de interacción de residuos de aminoácidos de la FAP con el ligando HYNIC-iFAP, obtenido con la metodología de acoplamiento molecular antes descrita). La alta afinidad y potencia inhibidora de FAP del ligando DOTA-Bz-NCS-HYNIC-iFAP, indica su potencial para ser utilizado en la preparación de nuevos radiofármacos diagnósticos y terapéuticos, ya que podría ser un ligando útil para ser marcado con radionúclidos capaces de ser quelados por el macrociclo DOTA, tales como el ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{177}Lu y ^{225}Ac .

Método de preparación del radiofármaco de la invención

Para la síntesis de la molécula HYNIC-iFAP, se disolvió inicialmente el Boc-pirrolidina en éter etílico/TMEDA bajo una atmósfera de nitrógeno y a -40°C . Posteriormente se hizo reaccionar con una solución de s-BuLi (en ciclohexano) a 5°C . Se adicionó entonces $\text{B}(\text{OMe})_3$ y se realizó el proceso de purificación por extracción (primera extracción con NaOH 2M, seguido de acidificación con HCl 2M, extracción final con EtOAc y evaporación del solvente), obteniendo el ácido Boc-pirrolidina-borónico, al cual se le adicionó pinanediol y se obtuvo, mediante

separación por HPLC (columna microporasil), el diastereoisómero R. Después de la desprotección del Boc, se realizó el acoplamiento de la D-alanina seguido del acoplamiento del succinimidil-N-boc-HYNIC utilizando HATU/DIPEA. Finalmente, el compuesto se desprotegió con TFA, se purificó por HPLC de fase reversa y se
5 liofilizó. El producto final fue el ((R)-1-((6-hidrazinilnicotinoil)-D-alanil)pirrolidin-2-il)borónico (HYNIC-iFAP), el cual presentó el espectro de masas esperado: m/z 322 (calcd. 321) [M+H]⁺; m/z 642 (calcd. 321) 2×[M+H]⁺. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.5-6.7 (s, 1H, -CH⁶-, arom. piridina), 9.7 (s, 1H, -NH-NH-), 8.3 (s, 1H, -CH₂-NHCO), 3.1-3.3 (m, 1H, CH₂CHB).

10 El análisis por HPLC en fase reversa del sólido blanco liofilizado mostró una pureza química del compuesto del 95 %.

El HYNIC-iFAP (30 µg) se formuló como una forma farmacéutica liofilizada conteniendo 10 mg de EDDA, 20 mg de tricina, 20 µg de cloruro estanoso y 50 mg de manitol. Dicha formulación, al ser reconstituida con 1 mL de una solución de
15 buffer de fosfato 0.2 M, pH 7 y 1 mL de solución de pertecneciato de sodio (^{99m}TcO₄Na), obtenido *in situ* de un generador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, rinde el compuesto a patentar ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-iFAP (^{99m}Tc-HYNIC-iFAP) con una pureza radioquímica mayor al 98% determinada por HPLC de fase reversa.

El radiofármaco se mantiene estable con una pureza radioquímica mayor al 95%
20 después de 24 h de marcado. Las pruebas *in vitro* de estabilidad en suero humano muestran una unión a proteínas séricas de 2.1 ± 0.3 % y una alta estabilidad radioquímica (>95%). Para la evaluación de la especificidad *in vitro* del ^{99m}Tc HYNIC-iFAP, se utilizó el estroma tumoral (biopsia de pacientes) de dos subtipos moleculares de cáncer de mama diferentes: un luminal B, caracterizado
25 por una alta expresión de receptor de estrógeno (ER) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2), y un triple negativo (TNBC) debido a los niveles de expresión nulos de ER, del receptor de progesterona (PR) y de HER2. Elegimos estos estromas de tumores ya que en un estudio previo en diferentes fenotipos de tumores de mama, se demostró que los tumores TNBC
30 expresan los niveles más altos de FAP mientras que los luminal B expresan los

niveles más bajos de FAP [Park et al. Differential expression of cancer-associated fibroblast-related proteins according to molecular subtype and stromal histology in breast cancer *Breast. Cancer Res. Treat.*, 2015, 149, 727–741]. Los resultados mostraron una captación de ^{99m}Tc HYNIC-iFAP de $7.8 \pm 1.2\%$ de la radiactividad
5 adicionada al estroma de los tumores TNBC, lo cual fue significativamente mayor ($P < 0.05$, t-student) a la radiactividad captada por el estroma de los tumores luminal B ($2.3 \pm 0.3\%$ de la radiactividad adicionada).

El compuesto no presentó toxicidad ni efectos adversos cuando se administró a una dosis de 40 mg/Kg a ratones balb-C de laboratorio. Las pruebas de imagen en
10 micro-SPECT/CT del ^{99m}Tc -HYNIC-iFAP en ratones atímicos con tumores inducidos de cáncer de mama triple negativos (células MBCDF-T), mostraron una captación en los tumores de $9.2 \pm 1.4\%$ de la actividad administrada por gramo de tejido (%ID/g) (figura 2) con rápida eliminación principalmente vía renal.

La pruebas de biocinética y dosimetría en voluntarios sanos, muestran una rápida
15 depuración sanguínea con una mayor captación y excreción renal, y una dosis efectiva de 2.0 ± 0.5 mSv por 740 MBq administrados. La figura 3 muestra una imagen SPECT del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-iFAP obtenida en un voluntario sano a 1 h post-administración. La figura 4 muestra la imagen PET y SPECT del mismo paciente con cáncer de mama triple negativo al que se le administró tanto ^{18}F -FDG
20 (PET, radiofármaco control, estándar de oro para la detección del metabolismo tumoral) como ^{99m}Tc -HYNIC-iFAP (SPECT), mostrando que ambos radiofármacos detectan con alta sensibilidad tumores de cáncer de mama; La figura 5 muestra la imagen PET y SPECT del mismo paciente con cáncer de pulmón (adenocarcinoma de pulmón poco diferenciado con patrón predominantemente sólido) al que se le
25 administró tanto ^{18}F -FDG (PET, radiofármaco control, estándar de oro para la detección del metabolismo tumoral) como ^{99m}Tc -HYNIC-iFAP (SPECT), mostrando que ambos radiofármacos detectan con alta sensibilidad tumores de pulmón, aunque en el caso del ^{99m}Tc -HYNIC-iFAP, la alta captación está asociado al reconocimiento de la expresión de la FAP en el microambiente tumoral. Estas
30 imágenes confirman y son la principal evidencia de que, debido a sus propiedades

de inhibición de la actividad FAP incrementadas por los nitrógenos presentes en la hidracina del HYNIC, el ^{99m}Tc -HYNIC-iFAP es capaz de detectar lesiones tumorales de manera específica.

Concluyendo, el ^{99m}Tc -HYNIC-iFAP se obtiene con las siguientes características:

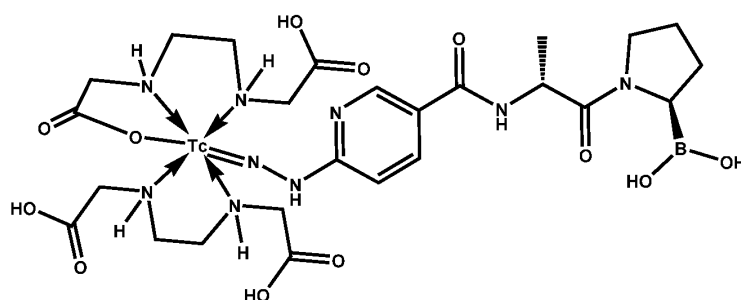
- 5 • Pureza radioquímica mayor al 98%
- Capacidad del radiofármaco para detectar *in vivo* y de forma específica, al microambiente de tumores que expresan la proteína de activación de fibroblastos por tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT) en medicina nuclear.
- 10 • Además del reconocimiento molecular del residuo boroPro, el radiofármaco a patentar basado en ^{99m}Tc , tiene la habilidad de captarse significativamente y detectar con alta sensibilidad el microambiente tumoral que expresa FAP, debido al incremento de la afinidad (bajo valor K_i ; $K_i=0.536$) conferido por la presencia de los nitrógenos de la hidracina en la molécula de HYNIC, lo que le permite interactuar de
- 15 forma eficaz en el acoplamiento con el sitio activo de la enzima FAP para su detección por imagen de SPECT.

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficientemente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes

5 cláusulas:

1.- El radiofármaco de la fórmula química ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-iFAP (^{99m}Tc -HYNIC-iFAP), que comprende la estructura:



2.- Una composición radiofarmacéutica, caracterizada porque comprende el

10 radiofármaco como el que se reclama en la reivindicación 1.

3.- El radiofármaco que se reclama en la reivindicación 1 para usarse como agente radiodiagnóstico.

15 4.- El ligando precursor de radiofármacos que comprenden la estructura:

