



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 299 884**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 31/18** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

**A61K 51/00** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **04798512 .2**

⑯ Fecha de presentación : **12.11.2004**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1682113**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

⑭ Título: **Agentes de formación de imágenes.**

⑯ Prioridad: **14.11.2003 GB 0326546**

⑮ Titular/es: **GE Healthcare Limited  
Amersham Place  
Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, GB**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOP: **01.06.2008**

⑯ Inventor/es: **Cuthbertson, Alan;  
Solbakken, Magne y  
Bjurgert, Emma**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente: **01.06.2008**

⑯ Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 299 884 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Agentes de formación de imágenes.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a agentes de formación de imagen diagnóstica para formación de imagen *in vivo*. Los agentes de formación de imagen comprenden un inhibidor de la metaloproteinasa marcado con un resto de formación de imagen adecuado para formación de imagen diagnóstica *in vivo*.

10 **Antecedentes de la invención**

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de al menos 20 endopeptidasas dependientes de cinc que median en la degradación o en la remodelación de la matriz extracelular (ECM) [Massova y col FASEB J 12 15 1075 (1998)]. Conjuntamente, los miembros de la familia MMP pueden degradar todos los componentes de la pared del vaso sanguíneo y juegan por tanto un papel principal en los episodios fisiológicos y patológicos que implican la degradación de los componentes de la ECM. Ya que las MMP pueden interferir con las interacciones célula-matriz que controlan el comportamiento celular, su actividad afecta a procesos tan diversos como la diferenciación, migración, 20 proliferación y apoptosis celular. Los controles reguladores negativos que regulan con precisión la actividad de las MMP en situaciones fisiológicas no siempre funcionan como deberían. Se cree que la expresión inapropiada de la actividad de las MMP forma parte del mecanismo patológico en varios estados de enfermedad. Las MMP son por tanto dianas para los inhibidores terapéuticos de las metaloproteinasas (MMPi) en muchas enfermedades inflamatorias, malignas y degenerativas [Whittaker y col Chem. Rev. 99, 2735 (1999)].

25 En consecuencia, se cree que los inhibidores sintéticos de las MMP pueden ser útiles en el tratamiento de muchas enfermedades inflamatorias, malignas y degenerativas. Además, se ha sugerido que los inhibidores de las MMP pueden ser útiles en el diagnóstico de estas enfermedades. El Documento WO 01/60416 describe conjugados de quelantes 30 con inhibidores de la metaloproteinasa de la matriz (MMP), y su uso en la preparación de complejos metálicos con metales diagnósticos. Los tipos específicos de inhibidores de las MMP descritos son hidroxamatos, de manera especial los succinil hidroxamatos. Los compuestos se proponen como de utilidad para el diagnóstico de las patologías cardio-vasculares asociadas con la degradación de la matriz extracelular tales como aterosclerosis, insuficiencia cardíaca y restenosis. Se describen en dicho documento los inhibidores, quelantes y ligantes preferidos de MMP. Un informe de 35 Zheng y col [Nucl. Med-Biol. 29 761-770 (2002)] documenta la síntesis de los inhibidores MMP marcados con los trazadores <sup>11</sup>C y <sup>18</sup>F para tomografía de emisión de positrones (PET). Los compuestos descritos en dicho documento se postulan como ser útiles en la formación de imagen no invasiva del cáncer de mama.

**La presente invención**

40 Se ha encontrado ahora que un tipo concreto de inhibidores de la metaloproteinasa de la matriz (MMPi) de sulfo-namida hidroxamato, marcado con un resto de formación de imagen son útiles como agentes de formación de imagen diagnóstica para la formación de imagen *in vivo* y diagnóstico del cuerpo del mamífero. Estos compuestos presentan actividad inhibitoria superior de la MMP con una Ki en el intervalo subnanomolar. Se pueden ajustar los perfiles de 45 excreción urinaria de los MMPi mediante el uso de grupos ligantes apropiados, de manera especial grupos ligantes de polietilenglicol (PEG).

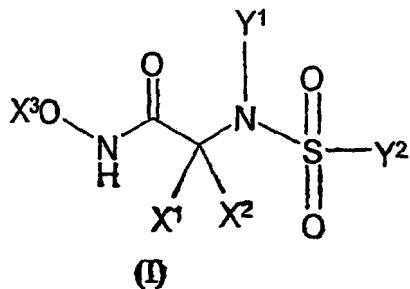
45 Los agentes de formación de imagen de la presente invención son útiles para la formación de imagen diagnóstica *in vivo* de un intervalo de estados de enfermedad (enfermedades inflamatorias, malignas y degenerativas) en las que se sabe que están implicadas metaloproteinasas de matriz específicas. Estas incluyen:

- 50 (a) aterosclerosis, en la que se sobreexpresan diversas MMP. Se han detectado niveles elevados de MMP-1, 3, 7, 9, 11, 12, 13 y MT1.MMP en placas ateroscleróticas humanas [S. J. George, Exp. Opin. Invest. Drugs, 9 (5), 993-1007 (2000) y referencias de las anteriores. Se ha informado también de la expresión de MMP-2 [Z. Li y col, Am. J. Pathol., 148, 121-128 (1996)] y MMP-8 [M. P. Herman y col, Circulation, 104, 1899-1904 (2001)] en ateroma humano;
- 55 (b) insuficiencia cardíaca crónica (Peterson, J. T. y col. Matrix metalloproteinase inhibitor development for the treatment of Herat failure, Drug Dev. Res. (2002), 55(1), 29-44 informa que MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13 y MMP-14 están sobreregulados en la insuficiencia cardíaca);
- 60 (c) cáncer [Vihinen y col, Int. J. Cancer 99, p 157-166 (2002) revisan las implicaciones de las MMP en los cánceres, y destaca particularmente MMP-2, MMP-3, MMP-7, y MMP-9];
- (d) artritis [Jacson y col, Inflamm. Res. 50(4), p 183-186 (2001) “Selective matrix metalloproteinase inhibition in rheumatoid arthritis-targeting gelatinase A activation”, se describe concretamente la MMP-2];
- 65 (e) esclerosis lateral amiotrópica [Lim y col, J. Neurochem, 67, 251-259 (1996); en la que están implicadas MMP-2 y MMP-9];

- (f) metástasis cerebral, en la que se ha informado de la implicación de MMP-2, MMP-9 y MMP-13 [Spinale, Circul. Res., 90 520-530 (2002)];
- 5 (g) metástasis cerebral; en la que se ha informado de la implicación de MMP-2 y MMP-9 [Lukes y col, Mol. Neurobol., 19, 267-284 (1999)];
- (h) enfermedad de Alzheimer, en la que se han identificado MMP-2 y MMP-9 en el tejido enfermo [Backstrom y col, J. Neurochem., 58, 983-992 (1992)];
- 10 (i) enfermedad neuroinflamatoria, en la que están implicadas MMP-2, MMP-3 y MMP-9 [Mun-Bryce y col, Brain. Res., 933, 42-49 (2002)];
- (j) COPD (es decir, enfermedad pulmonar obstructiva crónica) en la que se ha informado que MMP-1, MMP-2, MMP-8 y MMP-9 están sobrereguladas [Segura-Valdez y col, Chest, 117, 684-694 (2000)] entre otras;
- 15 (k) patología del ojo [Kurpakus-Wheater y col, Prog. Histo. Cytochem., 36(3), 179-259 (2001)];
- (l) enfermedades de la piel [Herouy, Y., Int. J. Mol. Med., 7(1), 3-12 (2001)].

20 **Descripción detallada de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un agente de formación de imagen que comprende un inhibidor de la metaloproteína de Fórmula (I) marcado con un resto de formación de imagen, en el que se puede detectar el resto de formación de imagen tras la administración de dicho agente de formación de imagen en el cuerpo del mamífero *in vivo*:



40 en la que:

Y<sup>1</sup> es H o -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-(C=O)-Z; en el que w es un número entero de valor de 1 a 6; y

45 Z es OH, alcoxilo C<sub>1-6</sub>, ariloxilo C<sub>4-10</sub> o NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan cada uno de manera independiente entre el grupo constituido por H, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, fluoroalquilo C<sub>1-6</sub> o arilo C<sub>4-10</sub>.

X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> junto con el átomo de carbono al cual están ligados, forman un anillo C<sub>3-10</sub> saturado que puede ser alicíclico o bicíclico, y puede incorporar de manera opcional 1 ó 2 heteroátomos escogidos entre O, N y S;

50 X<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1-3</sub> o fluoroalquilo C<sub>1-3</sub>;

55 Y<sup>2</sup> es un grupo de fórmula -[A<sup>1</sup>]<sub>p</sub>[O]<sub>q</sub>A<sup>2</sup> en el que p y q son 0 ó 1, y A<sup>1</sup> es alquieno C<sub>1-10</sub>, cicloalquieno C<sub>3-8</sub>, perfluoroalquieno C<sub>1-10</sub>, arileno C<sub>6-10</sub> o heteroarileno C<sub>2-10</sub>, y A<sup>2</sup> es H, alquilo C<sub>1-10</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> o heteroarilo C<sub>2-10</sub>, con la condición de que cuando p = 0 q es también 0 y A<sup>2</sup> no es H.

En la Fórmula (I), Y<sup>1</sup> es de manera preferible -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-(C=O)-Z, w es de manera preferible 1, 2 ó 3 y lo más preferible es 2 ó 3, idealmente 2. X<sup>3</sup> es de manera preferible H, CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>F, y lo más preferible es H o CH<sub>3</sub>, idealmente H. Y<sup>2</sup> es de manera preferible A<sup>2</sup>, en el que A<sup>2</sup> es arilo C<sub>6-10</sub> o heteroarilo C<sub>2-10</sub> o A<sup>1</sup>[O]<sub>q</sub>A<sup>2</sup>, en el que A<sup>1</sup> es arileno C<sub>6-10</sub> y A<sup>2</sup> es arilo C<sub>6-10</sub> o heteroarilo C<sub>2-10</sub>.

Z es de manera preferible NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, y lo más preferible es que se escoja de tal manera que uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> sea H, y el otro no sea H.

65 Los anillos monocíclicos adecuados formados por X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> junto con el átomo de carbono al cual están ligados incluyen: cicloalquieno (tal como ciclopentano o ciclohexano), piperidina, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, tetrahidrotiopheno y tetrahidropirano. Los anillos bicíclicos adecuados incluyen: biciclo[2.2.2]octano, biciclo[2.2.3]nonano

## ES 2 299 884 T3

y tetrahidropiranos bicíclicos que tienen puentes de etileno adicionales. Los anillos de X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> pueden comprender de manera opcional adicional uno o más sustituyentes hidroxilo, alcoxi C<sub>1-3</sub> o fluoroalquilo C<sub>1-3</sub>. Los anillos preferidos formados por X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> junto con el átomo de carbono al cual están ligados son cicloalquileno C<sub>4-6</sub>, o anillos de 4 a 6 miembros que incorporan un enlace éter único, los más preferible anillos de ciclopentano, ciclohexano o tetrahidropirano.

Los inhibidores sulfonamida hidroxamato de la metaloproteína de la matriz de la presente invención tienen un peso molecular adecuado comprendido entre 100 y 2.000 Dalton, de manera preferible un peso molecular comprendido entre 150 y 600 Dalton, y lo más preferible un peso molecular comprendido entre 200 y 500 Dalton. Se prefiere que el inhibidor sea de origen sintético.

El término “marcado con” significa que el propio MMPi comprende cualquiera de los restos de formación de imagen, o el resto de formación de imagen se liga como especie adicional, opcionalmente mediante un grupo ligante, tal como se describe para la Fórmula II siguiente. Cuando el propio MMPi comprende el resto de formación de imagen, esto significa que el “resto de formación de imagen” forma parte de la estructura química del MMPi y es un isótopo radioactivo o no radioactivo presente en un nivel significativamente superior al nivel de abundancia natural de dicho isótopo. Dichos niveles elevados o enriquecidos de isótopo son adecuados al menos 5 veces, de manera preferible al menos 10 veces, lo más preferible al menos 20 veces; e idealmente cualquiera de al menos 50 veces el nivel de abundancia natural del isótopo en cuestión, o que esté presente en un nivel tal que el nivel de enriquecimiento del isótopo en cuestión es del 90 al 100%. Se describen a continuación ejemplos de MMPi que comprenden el “resto de formación de imagen”, pero incluyen grupos CH<sub>3</sub> con niveles elevados de <sup>13</sup>C u <sup>11</sup>C y grupos fluoroalquilo con niveles elevados de <sup>18</sup>F, de tal manera que el resto de formación de imagen es el <sup>13</sup>C, <sup>11</sup>C u <sup>8</sup>F isotópicamente marcado dentro de la estructura química del MMPi. Los radioisótopos <sup>3</sup>H y <sup>14</sup>C no son restos de formación de imagen adecuados.

Se puede detectar el “resto de formación de imagen” bien externo al cuerpo del mamífero o mediante el uso de detectores diseñados para el uso *in vivo*, tales como detectores de radiación intravascular o detectores ópticos tales como endoscopios, o detectores de radiación diseñados para uso intraoperatorio. Los restos de formación de imagen preferidos son aquellos que se pueden detectar externamente de una manera no invasiva tras la administración *in vivo*. Los restos de formación de imagen más preferidos son radioactivos, de manera especial iones metálicos radioactivos, halógenos radioactivos que emiten radiaciones gamma y no metales radioactivos que emiten positrones, de manera concreta aquellos adecuados para formación de imagen mediante SPECT o PET.

El “resto de formación de imagen” se escoge de manera preferible entre:

- 35 (i) un ión metálico radioactivo;
- (ii) un ión metálico paramagnético;
- 40 (iii) un halógeno radioactivo que emita radiaciones gamma;
- (iv) un no metal radioactivo que emita positrones;
- 45 (v) un núcleo hiperpolarizado activo en RMN;
- (vi) un indicador adecuado para la formación de imagen *in vivo*;
- (vii) un emisor  $\beta$  adecuado para la detección intravascular.

50 Cuando el resto de formación de imagen es un ión metálico radioactivo, es decir, un radiometal, el término “radiometal” incluye los elementos radioactivos de transición más los lantánidos y actínidos, y los elementos metálicos del grupo principal. Se excluyen los semimetales arsénico, selenio y teluro. Los radiometales adecuados pueden ser cualquier emisor de positrones tal como <sup>64</sup>Cu, <sup>48</sup>V, <sup>52</sup>Fe, <sup>55</sup>CO, <sup>94</sup>mTc o <sup>68</sup>Ga; emisores  $\gamma$  tales como <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>113m</sup>In o <sup>67</sup>Ga. Los radiometales preferidos son <sup>99m</sup>Tc, <sup>64</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga y <sup>111</sup>In. Los radiometales más preferidos son emisores  $\gamma$ , de manera especial <sup>99m</sup>Tc.

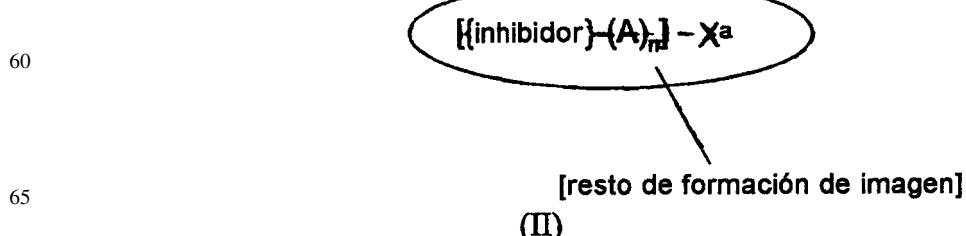
55 Cuando el resto de formación de imagen es un ión metálico paramagnético, dichos iones metálicos adecuados incluyen: Gd(III), Mn(II), Cu(II), Cr(III), Fe(III), Co(II), Er(II), Ni(II), Eu(III) o Dy(III). Los iones metálicos paramagnéticos preferidos son Gd(III), Mn(II) y Fe(III), siendo especialmente preferido Gd(III).

60 Cuando el resto de formación de imagen es un halógeno radioactivo que emite radiación gamma, el radiohalógeno se escoge de manera adecuada entre <sup>123</sup>I, <sup>131</sup>I o <sup>77</sup>Br. Un halógeno radioactivo preferido que emite radiación gamma es <sup>123</sup>I.

65 Cuando el resto de formación de imagen es un no metal radiactivo emisor de positrones, dichos emisores de positrones adecuados incluyen <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>17</sup>F, <sup>75</sup>Br, <sup>76</sup>Br ó <sup>124</sup>I. Los no metales radiactivos emisores de positrones preferidos son <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>124</sup>I, y <sup>18</sup>F, más especialmente <sup>18</sup>F.

## ES 2 299 884 T3

- Cuando el resto de formación de imagen es un núcleo hiperpolarizado activo en RMN, dichos núcleos activos en RMN tienen un spin nuclear no cero, e incluyen  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$ . De éstos, se prefiere  $^{13}\text{C}$ . Por el término “hiperpolarizado” se entiende la mejora del grado de polarización del núcleo activo en RMN respecto de su polarización en equilibrio. La abundancia natural de  $^{13}\text{C}$  (en relación a  $^{12}\text{C}$ ) es aproximadamente de un 1%, y los compuestos marcados con  $^{13}\text{C}$  adecuados están adecuadamente enriquecidos con una abundancia de al menos un 5%, de manera preferible de al menos un 50%, lo más preferible de al menos un 90% antes de ser hiperpolarizados. Al menos un átomo de carbono del inhibidor de la metaloproteinasa de la presente invención está adecuadamente enriquecido con  $^{13}\text{C}$ , que se hiperpolariza posteriormente.
- Cuando el resto de formación de imagen es un indicador adecuado para la formación de imagen *in vivo*, el indicador puede ser cualquier resto capaz de detección directa o indirecta con un procedimiento óptico de formación de imagen. El indicador puede ser un difusor de la luz (por ejemplo, una partícula coloreada o no coloreada), un absorbente de la luz o un emisor de luz. De manera más preferible el indicador es un colorante tal como un compuesto cromóforo o fluorescente. El colorante puede ser cualquier colorante que interactúe con la luz en el espectro electromagnético con longitudes de onda comprendidas entre la luz ultravioleta y el infrarrojo cercano. Lo más preferible, el indicador tiene propiedades fluorescentes.
- Los indicadores cromofóricos y fluorofóricos orgánicos preferidos incluyen grupos que tienen un sistema extensivo de electrones deslocalizados, por ejemplo, cianinas, merocianinas, indocianinas, ftalocianinas, naftalocianinas, trifenilmetinas, porfirinas, colorantes de pirilio, colorantes de tiapirilio, colorantes de escuarilio, colorantes de croconio, tientes de azuleno, indatrenos, ftaloilacridonas, trifenoquinonas, azocolorantes, colorantes intramoleculares e intermoleculares de transferencia de carga y complejos de colorantes, troponas, tetrazinas, complejos de bis(ditioleno), complejos de bis(benceno-ditiolato), colorantes de indoanilina, complejos de bis(S,O-ditioleno). Son también útiles las proteínas fluorescentes, tales como la proteína fluorescente verde (GFP) y las modificaciones de GFP que tienen diferentes propiedades de absorción/emisión. Se usan en algunos contextos los metales de tierras raras (por ejemplo, europio, samario, terbio o dispropósito), ya que son nanocristales fluorescentes (puntos cuánticos).
- Los ejemplos concretos de cromóforos que se pueden usar incluyen: fluoresceína, sulforodamina 101 (Rojo Texas), rodamina B, rodamina 6G, rodamina 19, verde de indocianina, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Azul Marino, Azul Pacífico, Verde Oregón 88, Verde Oregón 514, tetrametilrodamina, y Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, y Alexa Fluor 750.
- Particularmente preferidos son los colorantes que tienen máxima absorción en la región visible o el infrarrojo cercano, entre 400 nm y 3  $\mu\text{m}$ , concretamente entre 600 y 1300 nm.
- Las modalidades de formación de imagen óptica y las técnicas de medida incluyen, pero no se limitan a: formación de imagen por luminiscencia; endoscopia; endoscopia por fluorescencia; tomografía de coherencia óptica; formación de imagen mediante transmitancia, formación de imagen mediante transmitancia resuelta en el tiempo; formación de imagen confocal; microscopía no lineal; formación de imagen fotoacústica; formación de imagen acustoóptica; espectroscopía; espectroscopía de reflectancia; interferometría; interferometría de coherencia; tomografía óptica difusa y tomografía óptica difusa mediada por fluorescencia (onda continua, sistemas de dominio del tiempo y dominio de la frecuencia), y medida de difusión de la luz, absorción, polarización, luminiscencia, tiempo de vida de la fluorescencia, rendimiento cuántico y extinción.
- Cuando el resto de formación de imagen es un emisor  $\beta$  para la detección intravascular, dichos emisores  $\beta$  adecuados incluyen los radiometales  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{186}\text{Re}$  o  $^{192}\text{Ir}$ , y los no metales  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{38}\text{S}$ ,  $^{38}\text{Cl}$ ,  $^{39}\text{Cl}$ ,  $^{82}\text{Br}$  y  $^{83}\text{Br}$ .
- El resto de formación de imagen está ligado de manera preferible en las posiciones  $\text{Y}^1$ ,  $\text{Y}^2$ ,  $\text{X}^3$  o  $\text{X}^1/\text{X}^2$  del MMPi de Fórmula (I), y está ligado lo más preferible en las posiciones  $\text{Y}^1$  o  $\text{Y}^2$ , siendo la posición  $\text{Y}^1$  especialmente preferida cuando  $\text{Y}^1$  es  $-(\text{CH}_2)_w-(\text{C=O})-\text{Z}$ . Se prefiere de manera especial que el resto de formación de imagen esté ligado a o comprenda uno de los grupos  $\text{R}^1$  o  $\text{R}^2$  de un resto  $\text{Y}^1 = -(\text{CH}_2)_w-(\text{C=O})-\text{NR}^1\text{R}^2$ .
- Los agentes de formación de imagen de la presente invención son de manera preferible de Fórmula II:



en la que:

{inhibidor} es el inhibidor de la metaloproteinasa de Fórmula (I);

5  $-(A)_n$  es un grupo ligante en el que cada A es de manera independiente  $-CR_2-$ ,  $-CR=CR-$ ,  $-C=C-$ ,  $-CR_2CO_2-$ ,  
 $-CO_2CR_2-$ ,  $-NRCO-$ ,  $-CONR-$ ,  $-NR(C=O)NR-$ ,  $-NR(C=S)NR-$ ,  $-SO_2NR-$ ,  $-NRSO_2-$ ,  $-CR_2OCR_2-$ ,  $-CR_2SCR_2-$ ,  
 $-CR_2NRCR_2-$ , un grupo cicloheteroalquileno  $C_{4-8}$ , un grupo cicloalquileno  $C_{4-8}$ , un grupo arileno  $C_{5-12}$ , o un  
10 grupo heteroarileno  $C_{3-12}$ , un aminoácido, un azúcar o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG) mono-  
dispersado;

10 R se escoge de manera independiente entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ , alcoxialquilo  $C_{1-4}$  o  
hidroxialquilo  $C_{1-4}$ ;

15 n es un número entero de valor 0 a 10,

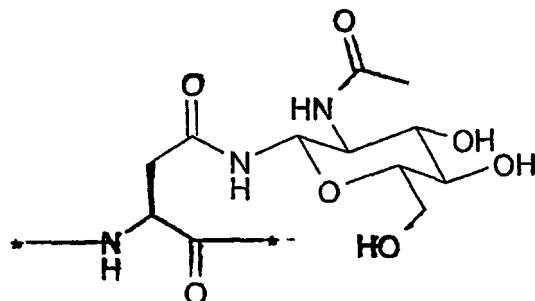
15 y  $X^a$  es H, OH,  $HaI$ ,  $NH_2$ , alquilo  $C_{1-4}$ , alcoxi  $C_{1-4}$ , alcoxialquilo  $C_{1-4}$ , hidroxialquilo  $C_{1-4}$  o  $X^a$  es el resto de  
formación de imagen.

20 Por el término “aminoácido” se entiende un aminoácido L o D, análogo de aminoácido (por ejemplo, naftilanina)  
o aminoácido mimético que se puede producir naturalmente o de origen puramente sintético, y puede ser ópticamente  
25 puro, es decir, un enantiómero único y por tanto quiral, o una mezcla de enantiómeros. De manera preferible, los  
aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros.

25 Por el término “azúcar” se entiende un mono, di o trisacárido. Los azúcares adecuados incluyen: glucosa, galactosa, maltosa, manosa, y lactosa. De manera opcional, se puede funcionalizar el azúcar para permitir el acoplamiento  
fácil con los aminoácidos. De esta manera, por ejemplo, se puede conjugar un derivado de glucosamina con otros  
aminoácidos mediante enlaces péptidos. El derivado de glucosamina de la asparagina (comercialmente disponible de  
Novabiochem) es un ejemplo de esto:

30

35



40

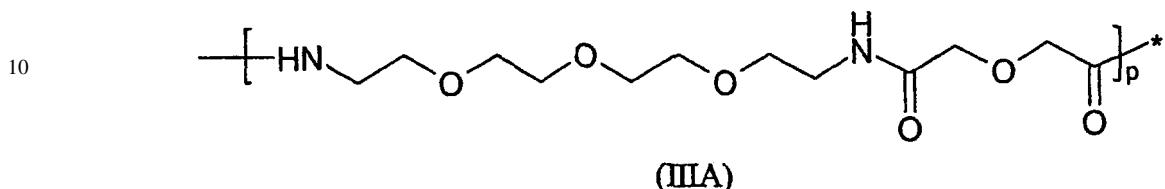
45

En la Fórmula II,  $X^a$  es de manera preferible el resto de formación de imagen. Esto tiene la ventaja de que el  
grupo ligante  $-(A)_n-$  de Fórmula II aleja el resto de formación de imagen desde el emplazamiento activo del inhibidor  
50 de la metaloproteinasa. Esto es particularmente importante cuando el resto de formación de imagen es relativamente  
voluminoso (por ejemplo, un complejo metálico o un átomo de radioyodo), de tal manera que el enlace del inhibidor  
con el enzima de la MMP no está afectado. Se puede conseguir esto mediante una combinación de flexibilidad (por  
ejemplos, cadenas simples de alquilo) con el fin de que el grupo voluminoso tenga libertad en la propia posición lejos  
de del emplazamiento activo y/o rigidez tal como un espaciador de cicloalquilo o arilo que orienta el complejo metálico  
lejos del emplazamiento activo.

55 Se puede usar también la naturaleza del grupo ligante para modificar la biodistribución del agente de formación  
de imagen. De esta manera, por ejemplo, la introducción de grupos éter en el ligante ayudará a minimizar  
el enlace plasma proteína. Cuando  $-(A)_n-$  comprende un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG) o una  
60 cadena péptida de 1 a 10 residuos de aminoácidos, el grupo ligante puede funcionar para modificar la farmaco-  
cinética y las velocidades de aclaramiento de la sangre del agente de formación de imagen *in vivo*. Dichos gru-  
pos ligantes “biomodificadores” pueden acelerar o reducir el aclaramiento del agente de formación de imagen del  
tejido básico, tal como músculo o hígado, y/o de la sangre, proporcionando de esta manera un mejor diagnóstico  
65 por imagen debido a una menor interferencia del fondo; cuando se usa para aumentar el tiempo de permanencia  
de la sangre esto es beneficioso para maximizar la probabilidad de que el agente de formación de imagen inter-  
actúe con el biomarcador diana en el emplazamiento de la patología. Se puede usar también un grupo ligante  
biomodificador para favorecer una ruta concreta de excreción, por ejemplo, *vía* los riñones en oposición a *vía* el  
hígado

Cuando  $-(A)_n-$  comprende una cadena péptida de 1 a 10 residuos de aminoácidos, los residuos de aminoácidos se escogen de manera preferible de glicina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico o serina. Cuando  $-(A)_n-$  comprende un resto PEG, éste comprende de manera preferible unidades derivadas de la oligomerización de las estructuras PEG-Uke monodispersadas de las Fórmulas IIIA o IIIB:

5



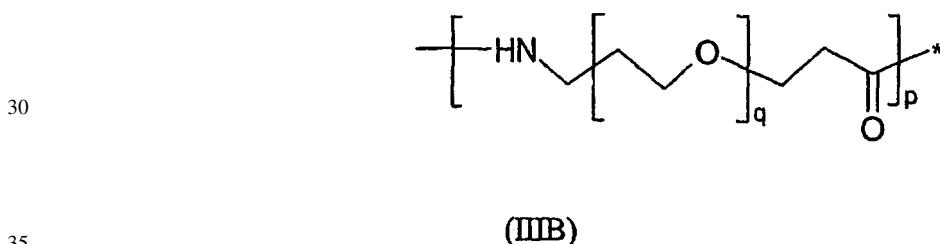
15

ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de Fórmula IIIA

20

en el que  $p$  es un número entero entre 1 y 10 y en el que la unidad C-terminal (\*) está conectada con el resto de formación de imagen. De manera alternativa, se puede usar una estructura similar a PEG basada en un derivado de ácido propiónico de Fórmula IIIB:

25



35

en la que  $p$  es tal como se ha definido para la Fórmula IIIA

40

y  $q$  es un número entero entre 3 y 15

En la Fórmula III,  $p$  es de manera preferible 1 ó 2, y  $q$  es de manera preferible 5 a 12.

45

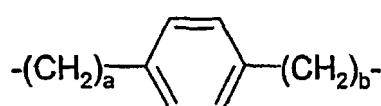
Cuando el grupo ligante no comprende PEG o una cadena péptida, los grupos  $-(A)_n-$  preferidos tienen una cadena básica de átomos enlazados que componen el resto  $-(A)_n$  de 2 a 10 átomos, lo más preferible de 2 a 5 átomos, siendo especialmente preferido de 2 ó 3 átomos. Una cadena básica con un grupo ligante mínimo de 2 átomos confiere la ventaja de que el resto de formación de imagen está bien separado del inhibidor de la metaloproteína de tal manera que se minimiza cualquier interacción.

50

Los grupos ligantes no péptidos tales como los grupos alquíleno o los grupos aríleno tienen la ventaja de que no presentan interacciones significativas de enlace de hidrógeno con el inhibidor MMP conjugado, de tal manera que el ligante no se enrolla alrededor del inhibidor MMP. Los grupos espaciadores de alquíleno preferidos son  $-(CH_2)_q-$  en el que  $q$  es de 2 a 5. Los espaciadores de aríleno preferidos son de fórmula:

55

60



65

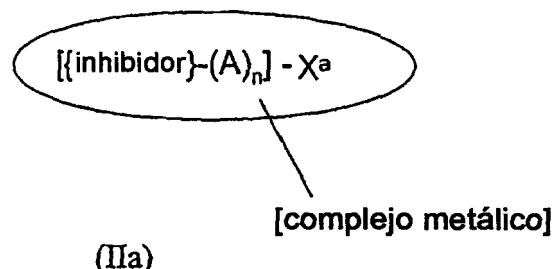
en la que:  $a$  y  $b$  son de manera independiente 0, 1 ó 2.

# ES 2 299 884 T3

El grupo ligante  $-(A)_n-$  comprende de manera preferible un resto de ácido diglicólico, un resto maleimida, un ácido glutámico, ácido succínico, una unidad basada en polietilenglicol o una unidad similar a PEG de Fórmula IIIA.

Cuando el resto de formación de imagen comprende un ión metálico, el ión metálico está presente en forma 5 de complejo metálico. Dichos conjugados del inhibidor de la metaloproteinasa con iones metálicos son por tanto adecuadamente de Fórmula IIa:

10



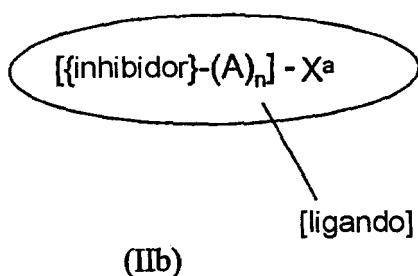
20

en la que: A, n y X<sup>a</sup> son tal como se ha definido para la Fórmula II anterior.

Por el término “complejo metálico” se entiende un complejo de coordinación del ión metálico con uno o más 25 ligandos. Se prefiere fuertemente que el complejo metálico sea cinéticamente estable y por tanto “resistente a la transquelación”, es decir, no experimente fácilmente el intercambio del ligando con otros ligandos potencialmente competentes respecto de los emplazamientos de coordinación metálica. Los ligandos potencialmente competentes incluyen el propio resto MMPi del ácido hidroxámico más otros excipientes en la preparación *in vitro* (por ejemplo, 30 radioprotectores o conservantes antimicrobianos usados en la preparación), o compuestos endógenos *in vivo* (por ejemplo, glutatión, transferrina o proteínas de plasma).

Los complejos metálicos de Fórmula IIa se derivan de los conjugados de los ligandos de Fórmula IIb:

35



40

45

en la que: A, n y X<sup>a</sup> son tal como se ha definido para la Fórmula II anterior.

50 Los ligandos adecuados para uso en la presente invención que forman complejos metálicos resistentes a la transquelación incluyen: agentes quelantes, en el que los átomos donantes metálicos 2-6, de manera preferible 2-4, se disponen de tal manera que dan como resultado anillos de quelato de 5 ó 6 miembros (que tienen un esqueleto no coordinante tanto de átomos de carbono como de heteroátomos no coordinantes que enlazan los átomos donantes metálicos); o ligandos monodentados que comprenden átomos donantes que enlazan fuertemente con el ión metálico, tales como isonitrilos, fosfinas o diazenidas. Los ejemplos de tipos de átomos donantes que enlazan bien con metales como parte de agentes quelantes son: aminas, tioles, amidas, oximas y fosfinas. Las fosfinas forman dichos complejos metálicos fuertes que incluso forman complejos metálicos adecuados de fosfinas monodentadas o bidentadas. La geometría lineal de los isonitrilos y diazenidas es tal que no se prestan fácilmente por sí mismos a la incorporación en agentes quelantes, y se usan normalmente por tanto como ligandos monodentados. Los ejemplos de isonitrilos adecuados incluyen alquil isonitrilos simples tales como terc-butilisonitrido, e isonitrilos sustituidos con éter tales como mibi (es decir, 1-isociano-2-metoxi-2-metilpropano). Los ejemplos de fosfinas adecuadas incluyen Tetrofosmin, y fosfinas monodentadas tales como *tris*(3-metoxipropil)fosfina. Los ejemplos de diazenidas adecuadas incluyen la serie HYNIC de ligandos, es decir, piridinas sustituidas con hidracina o 55 nicotinamidas.

60

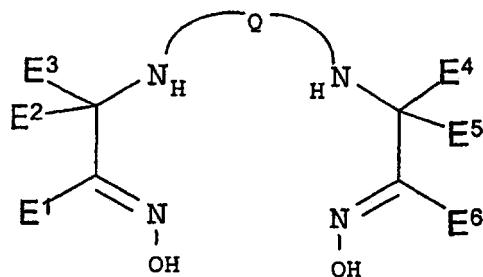
Los ligandos preferidos son los agentes quelantes, y los ligandos monodentados que forman complejos metálicos cinéticamente estables tales como fosfinas, isonitrilos y diazenidas. Los ligandos más preferidos son los agentes quelantes, tal como se ha definido anteriormente.

# ES 2 299 884 T3

Los ejemplos de agentes quelantes adecuados para el tecnecio que forman complejos metálicos resistentes a la transquelación incluyen, pero no se limitan a:

(i) diaminadioximas de fórmula:

5



en la que E<sup>1</sup>-E<sup>6</sup> son cada uno de manera independiente un grupo R';

20 cada R' es H o alquilo C<sub>1-10</sub>, alquil arilo C<sub>3-10</sub>, alcoxialquilo C<sub>2-10</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-10</sub>, fluoroalquilo C<sub>1-10</sub>, carboxialquilo C<sub>2-10</sub> o aminoalquilo C<sub>1-10</sub>, o dos o más grupos R' junto con los átomos a los cuales están ligados forman un anillo carbocíclico, heterocíclico, saturado o insaturado, y en el que uno o más de los grupos R' está conjugado con el inhibidor MMP;

25 y Q es un grupo puente de fórmula -(J)<sub>f</sub>-

en el que f es 3, 4, ó 5 y cada J es de manera independiente -O-, -NR'- o -C(R')<sub>2</sub>- proporcionando que -(J)<sub>f</sub>- contenga un máximo de un grupo J que es -O- o NR'-

30 Los grupos Q preferidos son como sigue:

Q = -(CH<sub>2</sub>)(CHR')(CH<sub>2</sub>)- es decir, propileneamina oxima o los derivados de PnAO;

35 Q = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CHR')(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- es decir, pentileneamina oxima o los derivados de PentAO;

Q = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NR'(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-.

40 E<sup>1</sup> y E<sup>6</sup> se escogen de manera preferible entre: alquilo C<sub>1-3</sub>, alquilaril alcoxialquilo, hidroxialquilo, fluoroalquilo, carboxialquilo o aminoalquilo. Lo más preferible, cada grupo E<sup>1</sup> y E<sup>6</sup> es CH<sub>3</sub>.

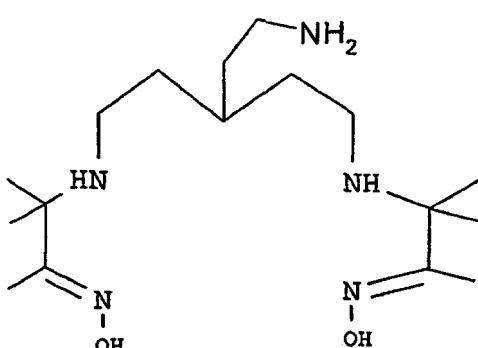
45 El inhibidor MMP se conjuga de manera preferible en cualquier grupo E<sup>1</sup> ó E<sup>6</sup>, o un grupo R' del resto Q. Lo más preferible, el inhibidor MMP se conjuga con un grupo R' del resto Q. Cuando el inhibidor MMP se conjuga con un grupo R' del resto Q, el grupo R' está de manera preferible en la posición de cabeza de puente. En este caso, Q es de manera preferible

-(CH<sub>2</sub>)(CHR')(CH<sub>2</sub>)-

-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CHR')(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NR'(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, lo más preferible -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CHR')(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-.

50 Un quelante de diaminadioxima bifuncional especialmente preferido tiene la fórmula:

55



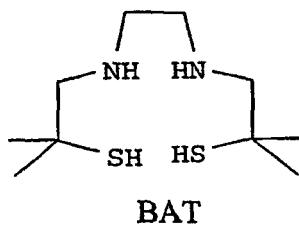
60 65 (Quelante 1)

de tal manera que el inhibidor MMP se conjuga mediante el grupo -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> cabeza de puente.

- 5 (ii) los ligandos  $N_3S$  que tienen un grupo donante de tioltriamida tal como  $MAG_3$  (mercaptoacetiltriglicina) y los ligandos relacionados; o que tienen un grupo donante de diaminapiridinatiol tal como Pica;
- 10 (iii) los ligandos  $N_2S_2$  que tienen un grupo donante de diaminaditiol tal como BAT o ECD (es decir, un dímero de etilcisteinato), o un grupo donante de amidaaminaditiol tal como MAMA;
- 15 (iv) los ligandos  $N_4$  que son ligandos de cadena abierta o macrocíclicos que tienen un grupo donante de tetramina, amidatriamina o diamidadiamina, tal como ciclam, monoxiclam o dioxociclam.
- 20 (v) los ligandos  $N_2O_2$  que tienen un grupo donante de diaminadifenol.

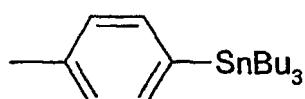
Los ligandos anteriormente descritos son particularmente adecuados para complejar el tecnecio, por ejemplo,  $^{94m}Tc$  o  $^{99m}Tc$ , y se describen de manera más completa por Jurisson y col [Chem. Rev., 99 2205-2218 (1999)]. Los ligandos son también útiles para otros metales tales como cobre ( $^{64}Cu$  o  $^{67}Cu$ ), vanadio (por ejemplo,  $^{48}V$ ), hierro (por ejemplo,  $^{52}Fe$ ), o cobalto (por ejemplo,  $^{55}Co$ ). Se describen otros ligandos adecuados en el Documento WO 91/01144 de Sandoz, que incluye ligandos que son particularmente adecuados para el indio, itrio y gadolinio, de manera especial los ligandos macrocíclicos de aminocarboxilato y ácido aminofósfónico. Se conocen y se describen en el Documento US 4885363 los ligandos que forman complejos metálicos no iónicos (es decir, neutros) de gadolinio. Cuando el ión radiometálico es tecnecio, el ligando es de manera preferible un agente quelante que es tetradentado. Los agentes quelantes preferidos para el tecnecio son las diaminadioximas, o aquellos que tienen un grupo donante  $N_2S_2$  o  $N_3S$  tal como se ha descrito anteriormente.

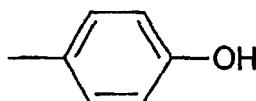
25 Se conocen los ácidos hidroxámicos polidentados que son agentes quelantes por formar complejos metálicos con radiometales, que incluyen  $^{99m}Tc$  [Safavy y col, Bioconj. Chem., 4, 194-198 (1993)]. Los presentes inventores han, sin embargo, encontrado que los ácidos hidroxámicos monodentados tales como cuando  $X^3$  es H en la Fórmula (1), el MMPi del ácido hidroxámico puede competir de manera efectiva con el ligando conjugado del radiometal. Por tanto, cuando  $X^3$  es H, se necesita un cuidado particular en la selección del ligando, es decir, es necesario escoger un ligando que compita de manera efectiva con el MMPi del ácido hidroxámico por el radiometal, para evitar la formación de complejos metálicos indeseables [ácido hidroxámico]-[radiometal]. Dichos ligandos adecuados incluyen: fosfinas; 30 isonitrilos; agentes quelantes  $N4$  que tienen un grupo donante de tetramina, amidatriamina o diamidadiamina; agentes quelantes  $N_3S$  que tienen un grupo donante de tioltriamida o donante de diaminapiridinatiol; o agentes quelantes  $N_2S_2$  que tienen un grupo donante de diaminaditiol tales como BAT o un grupo donante de amidaaminaditiol tal como MAMA. Dichos ligandos preferidos incluyen; los agentes quelantes  $N4$ ,  $N_3S$  y  $N_2S_2$  descritos anteriormente, lo más preferible, los agentes quelantes  $N4$  tetramina y  $N_2S_2$  diaminaditiol o diamidadiitiol, de manera especial el quelante  $N_2S_2$  diaminaditiol conocido como BAT:



50 Se prefiere fuertemente que el inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz esté enlazado con el complejo metálico de tal manera que el enlace no experimente un metabolismo fácil en la sangre ya que podría dar como resultado que el complejo metálico se rompa antes de que el inhibidor de la metaloproteinasa marcado alcance el emplazamiento diana deseado *in vivo*. El inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz está por tanto preferiblemente enlazado de manera covalente con los complejos metálicos de la presente invención mediante enlaces que no se metabolizan fácilmente.

55 Cuando el resto de formación de imagen es un halógeno radioactivo, tal como yodo, el inhibidor MMP se escoge de manera adecuada para incluir: un átomo de halógeno no radioactivo tal como yoduro o bromuro de arilo (para permitir el intercambio de radioyodo); un anillo de arilo activado (por ejemplo, un grupo fenol); un compuesto precursor organometálico (por ejemplo, trialquilestaño o trialquilsilicio); un precursor orgánico tal como triazenos o un grupo saliente bueno para la sustitución nucleófila tal como una sal de yodo. Se describen por Bolton [J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002)] los procedimientos para introducir halógenos radioactivos (que incluyen  $^{123}I$  y  $^{18}F$ ). Se proporcionan a continuación ejemplos de grupos arilo adecuados a los cuales se pueden ligar halógenos radioactivos, especialmente yodo:





5

Ambos contienen sustituyentes que permiten una fácil sustitución del radioyodo en el anillo aromático. Se pueden sintetizar sustituyentes alternativos que contienen yodo radioactivo por yodación directa *mediante* intercambio de radiohalógeno, por ejemplo

10

20

Cuando el resto de formación de imagen es un isótopo radioactivo de yodo, el átomo de radioyodo se liga de manera preferible *mediante* un enlace covalente directo a un anillo aromático tal como un anillo de benceno, o un grupo vinilo ya que se conoce que los átomos de yodo que enlazan con sistemas alifáticos saturados son propensos al metabolismo *in vivo* y por tanto a la pérdida del radioyodo.

25

Cuando el resto de formación de imagen comprende un isótopo radioactivo de flúor (por ejemplo,  $^{18}\text{F}$ ), puede llevarse a cabo la radiohalogenación *mediante* marcado directo usando la reacción de  $^{18}\text{F}$ -fluoruro con un precursor adecuado que tenga un grupo saliente bueno, tal como bromuro de alquilo, mesilato de alquilo o tosilato de alquilo. Se puede introducir también  $^{18}\text{F}$  mediante la N-alquilación de precursores de amina con agentes alquilantes tales como  $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_3\text{OMs}$  (en el que Ms es mesilato) para dar  $\text{N}-(\text{CH}_2)_3^{18}\text{F}$ , o la O-alquilación de grupos hidroxilo con  $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_3\text{OMs}$  o  $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_3\text{Br}$ . Se puede introducir también  $^{18}\text{F}$  mediante la alquilación de grupos N-haloacetilo con un reactivo  $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ , para dar derivados de  $-\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_3^{18}\text{F}$ . Para sistemas arilo, el desplazamiento nucleófilo del  $^{18}\text{F}$ -fluoruro desde una sal de aril diazonio, compuesto de nitroarilo o una sal de arilo de amonio cuaternario son rutas adecuadas para los derivados de aril- $^{18}\text{F}$ .

35

Se pueden marcar también los MMPi de Fórmula (I) que contienen aminas primarias con  $^{18}\text{F}$  mediante aminación reductiva usando  $^{18}\text{F-C}_6\text{H}_4\text{-CHO}$  como muestran Kanhn y col [J. Lab. Comp. Radiopharm. 45, 1045-1053 (2002)] y Borch y col [J. Am. Chem. Soc. 93, 2897 (1971)]. Esta solución puede aplicarse también de manera útil a las arilaminas primarias tales como los compuestos que comprenden grupos fenil-NH<sub>2</sub> o fenil-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.

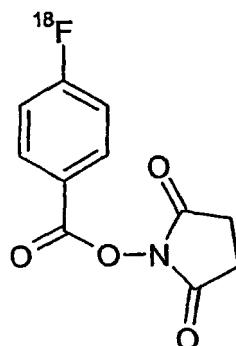
40

Se pueden marcar también los inhibidores MMP de Fórmula (I) que contienen aminas con  $^{18}\text{F}$  mediante la reacción con ésteres activos marcados con  $^{18}\text{F}$  tales como:

45

50

55

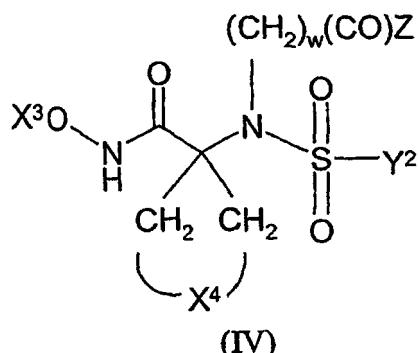


60

para dar productos ligados enlazados con amida. El éster de N-hidroxisuccinimida mostrado y su uso para marcar péptidos se enseñan Vaidyanathan y col [Nucl. Med. Biol., 19(3), 275-281 (1992)] y Johnstrom y col [Clin. Sci., 103 (Suppl. 48), 45-85 (2002)]. Se describen detalles adicionales de rutas sintéticas de derivados marcados con  $^{18}\text{F}$  en Bolton, J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002).

Se puede conseguir la introducción de marcas de radioisótopo para PET en la posición  $X^3$  mediante, por ejemplo, la O-alquilación de los derivados de ácido hidroxámico correspondientes ( $X^1 = H$ ) con derivados de triflato tales como  $^{11}\text{CH}_3\text{OSO}_2\text{CF}_3$  como muestran Fei y col [J. Lab. Comp. Radiopharm., 46, 343-351 (2003)], o Zheng y col [Nucl. Med. Biol., 30, 753-760 (2003)], o los reactivos  $^{18}\text{F}$  O-alquilantes descritos anteriormente. Se pueden introducir las radiomarcas  $^{11}\text{C}$  para PET mediante el uso del derivado de triflato anterior para alquilar los grupos hidroxilo fenólicos como muestran Zheng y col [Nucl-Med Biol, 31, 77-85 (2004)]. Se muestran procedimientos adicionales de marcado con  $^{11}\text{C}$  por Antoni y col [Capítulo 5 páginas 141-194 en el "Handbook of Radiopharmaceuticals", M. J. Welch y C. S. Redvanly (Eds.), Wiley (2003)].

10 Los inhibidores de la metaloproteinasa de la matriz preferidos de la presente invención son de Fórmula IV:



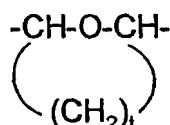
30 en la que

$\text{Y}^2$ ,  $w$  y  $Z$  son tal como se ha definido anteriormente;

35  $\text{X}^3$  es  $H$ ,  $\text{CH}_3$  o  $\text{CH}_2\text{F}$ ;

$\text{X}^4$  es  $-(\text{CH}_2)_m-$  en el que  $m$  es 1, 2 ó 3,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2$  o  $\text{X}^5$  en el que  $\text{X}^5$  es

40



45

en el que  $t$  es 2 ó 3

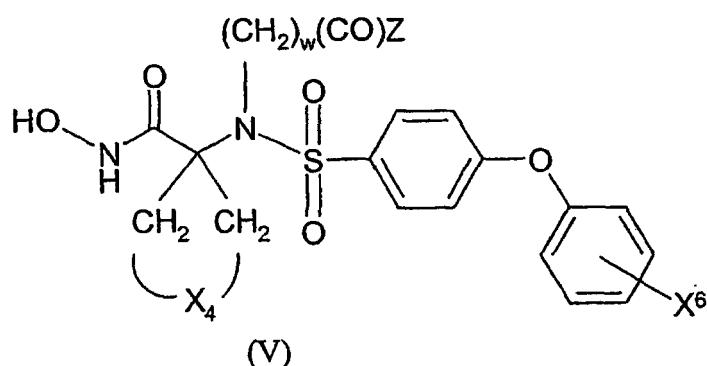
50 En la Fórmula (IV),  $\text{X}^3$  es de manera preferible  $H$  o  $\text{CH}_3$ , lo más preferible  $H$ .  $\text{X}^4$  es de manera preferible  $-(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$  o un grupo  $\text{X}^6$  con  $t$  igual a 2.  $\text{X}^4$  es lo más preferible  $-(\text{CH}_2)_2-$  o  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ . Los grupos  $\text{Y}^2$ ,  $x$  y  $Z$  de la Fórmula (IV) son tal como se ha descrito para la Fórmula (I) anterior.

55 Cuando el agente de formación de imagen comprende un inhibidor MMP de Fórmula IV, y el resto de formación de imagen es un halógeno radioactivo que emite radiación gamma, el resto de formación de imagen se liga de manera preferible a cualquiera de los sustituyentes  $\text{Y}^2$ ,  $Z$  o  $\text{X}^4$ , lo más preferible, los sustituyentes  $\text{Y}^2$  o  $Z$ . Cuando el resto de formación de imagen es un no metal radioactivo que emite positrones, éste está ligado de manera preferible en los sustituyentes  $\text{X}^3$ ,  $\text{X}^4$ ,  $\text{Y}^2$  o  $Z$ , lo más preferible las posiciones  $\text{X}^4$  o  $Z$ . Cuando  $\text{X}^3$  es  $H$ , el no metal radioactivo que emite positrones está ligado lo más preferible en las posiciones  $Z$  o  $\text{X}^4$ , lo más preferible la posición  $Z$ .

65 Cuando el resto de formación de imagen es un ión metálico radioactivo o paramagnético, uno de los sustituyentes  $\text{X}^4$  o  $Z$  se liga de manera preferible a o comprende el resto de formación de imagen. Lo más preferible, el sustituyente  $Z$  de Fórmula IV se liga de manera preferible a o comprende el resto de formación de imagen del ión metálico radioactivo o paramagnético.

Los inhibidores de la metaloproteinasa de la matriz preferidos de la presente invención son de Fórmula V:

5



10

15

20

en la que  $X^6$  es Hal,  $R^1$  u  $OR^1$ , en el que  $R^1$  es alquilo o fluoroalquilo  $C_{1-3}$

25 Los grupos  $X^4$ ,  $w$  y  $Z$  preferidos de Fórmula (V) son tal como se han descrito para la Fórmula (IV) anterior. Lo más preferible,  $w$  es 2,  $X^6$  es de manera preferible F, lo más preferible 4-fluoro.

30 Se pueden preparar los compuestos inhibidores de MMP de la presente invención tal como se resume en el Esquema 1 (a continuación).

35 Se proporciona en el Documento EP 0895988 A1 y en el Ejemplo 5 la síntesis del compuesto MMPi 27 análogo. Se proporcionan referencias adicionales a la síntesis en la revisión de Skiles y col [Curr. Med. Chem., 8 425-474 (2001)].

40 Cuando el agente de formación de imagen de la presente invención comprende un ión metálico radioactivo o paramagnético, el ión metálico está presente de manera adecuada en forma de complejo metálico. Dichos complejos metálicos se preparan de manera adecuada mediante la reacción del conjugado de Fórmula IIb con el ión metálico apropiado. Se pueden preparar el ligando conjugado o el quelante conjugado del inhibidor MMP de Fórmula IIb mediante la solución de quelato bifuncional. De esta manera, se conoce bien la preparación de ligandos o agentes quelantes que tienen ligados a ellos un grupo funcional (“ligantes bifuncionales” o “quelatos bifuncionales” de manera respectiva. Los grupos funcionales que se han ligado incluyen: amina, tiocianato,

45

(Esquema pasa a página siguiente)

50

55

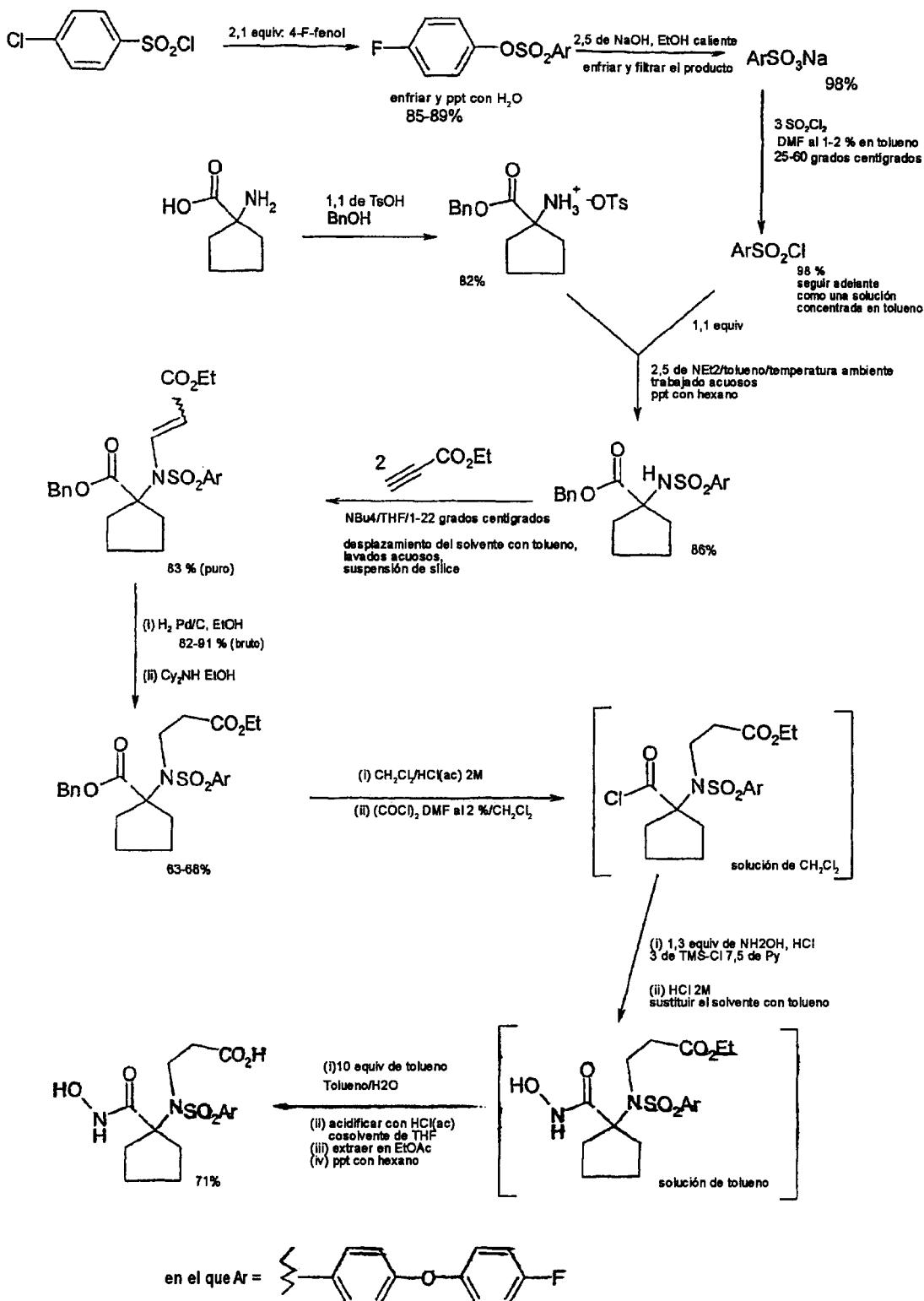
60

65

Esquema 1

## Síntesis del Compuesto I

5



65

ésteres de maleimida y activos tales como N-hidroxisuccinimida o pentafluorofenol. El quelante 1 de la presente invención es un ejemplo de un quelato bifuncional funcionalizado con amina. Se describen en Baidoo y col [Bioconj. Chem., 5, 114-118 (1994)] los quelatos bifuncionales basados en tiolactonas, que se pueden usar para preparar conjugados del

quelante BAT. Se describen en Stichelberger y col [Versatile synthetic approach to new bifunctional chelating agents tailor made for labeling with the fac-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> core (M = Tc, <sup>99m</sup>Tc, Re) synthesis, *in vitro*, and *in vivo* behavior of the model complex [M(APPA)(CO)<sub>3</sub>] (appa = [(5-amino-pentyl)-pyridin-2-yl-methyl-amino]-acetic acid); Nucl. Med. Biol., 30, 465-470 (2003)] los quelatos bifuncionales adecuados para la complejación en un núcleo de tecnecio o de tricarbonil renio. Se describen en Edwards y col [Bioconj. Chem., 8, 146 (1997)] los ligandos HYNIC bifuncionales. Se pueden hacer reaccionar dichos quelatos bifuncionales con grupos funcionales adecuados en el inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz para formar el conjugado deseado. Dichos grupos funcionales adecuados en el inhibidor incluyen:

10 carboxilos (para la formación del enlace amida con un quelante funcionalizado con amina); aminas (para la formación del enlace amida con un quelante bifuncional funcionalizado con carboxilo o éster activo);  
 halógenos, mesilatos y tosilatos (para la N-alquilación de un quelante bifuncional funcionalizado con amina) y tioles (para la reacción con un quelante bifuncional funcionalizado con maleimida)

15 Se puede llevar a cabo de manera conveniente el radiomarcado de los inhibidores MMP de la presente invención usando “precursores”. Cuando el resto de formación de imagen comprende un ión metálico, dichos precursores comprenden de manera adecuada “conjugados” del inhibidor MMP con un ligando, tal como se describe en la cuarta forma de realización a continuación. Cuando el resto de formación de imagen comprende un radioisótopo no metálico, es decir, un halógeno radioactivo que emite radiación gamma o un no metal radioactivo que emite positrones, dichos “precursores” comprenden de manera adecuada un material no radioactivo que se diseña de tal manera que la reacción química con una forma química conveniente del radioisótopo no metálico deseado se puede llevar a cabo en el número mínimo de etapas (idealmente una etapa única) y sin necesidad de purificación significativa (idealmente sin purificación adicional) para dar el producto radioactivo deseado. Se pueden obtener dichos precursores de manera 20 conveniente con buena pureza química, suministrados opcionalmente en forma estéril. Se prevee que los “precursores” (que incluyen ligandos conjugados) para el radiomarcado de los inhibidores MMP de la presente invención se puedan preparar como sigue:

30 Se puede convertir el grupo -OH terminal de un derivado -N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH o -N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH en un grupo tosilo o mesilo o derivado de bromo, que se puede usar a continuación para conjugar un quelante funcionalizado con amino. Se pueden desplazar de manera alternativa dichos grupos tosilato, mesilato o bromo de los precursores descritos con [<sup>18</sup>F]fluoruro para dar el agente de formación de imagen PET marcado con <sup>18</sup>F.

35 Se pueden preparar derivados de radioyodo a partir de los precursores fenólicos correspondientes. Se pueden usar derivados de bromuro de alquilo para la N-alquilación de un quelante funcionalizado con amina. Se pueden convertir los derivados de yoduro de fenilo en precursores organometálicos de los compuestos de radioyodación, tales como los precursores de trialquilestaño o aril trimetilsililo (TMS). Se pueden convertir también los derivados de yoduro de fenilo en un precursor de aril yodonio para la radiofluoración con <sup>18</sup>F-fluoruro.

40 Se pueden hacer reaccionar los inhibidores MMP funcionalizados con aminas primarias con anhídridos ácidos para dar precursores funcionalizados con N del tipo -N(CO)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H que se pueden conjugar a continuación con ligandos que contienen aminas bifuncionales. Se pueden preparar dichos MMPi sustituidos con aminas primarias mediante la alquilación de los derivados de bromo con bencilamina, seguido por la eliminación del grupo protector bencilo bajo condiciones estándar usando un catalizador de paladio sobre carbón activo.

45 Se pueden conjugar directamente los MMPi funcionalizados con aminas con un quelante bifuncional funcionalizado con carboxilo o éster activo, o mediante un ligante. Se pueden hacer reaccionar también dichos compuestos con un agente alquilante adecuado para el marcado con <sup>18</sup>F tal como <sup>18</sup>F(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OTS (en el que Ts es un grupo tosilato) o <sup>18</sup>F(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OMs (en el que Ms es un grupo mesilato), para dar el derivado de amina funcionalizada con N correspondiente 50 que tiene un sustituyente N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub><sup>18</sup>F. De manera alternativa, puede hacerse reaccionar en primer lugar la amina con cloruro de cloroacetilo para dar la amida derivatizada con -N(CO)CH<sub>2</sub>CIN, seguido por la reacción con HS(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub><sup>18</sup>F o HO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub><sup>18</sup>F para dar los productos -N(CO)CH<sub>2</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub><sup>18</sup>F y -N(CO)CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub><sup>18</sup>F de manera respectiva.

55 Se pueden preparar los complejos radiometálicos de la presente invención mediante la reacción de una solución del radiometal en el estado de oxidación apropiado con el ligando conjugado de Fórmula IIa al pH apropiado. La solución puede contener de manera preferible un ligando que compleja débilmente con el metal (tal como gluconato o citrato), es decir, se prepara el complejo metálico mediante intercambio o trasquelación del ligando. Dichas condiciones son útiles para suprimir reacciones secundarias indeseables tales como la hidrólisis del ión metálico. Cuando el ión radiometálico es <sup>99m</sup>Tc, el material de partida usual es pertecnetato de sodio procedente de un generador de <sup>99</sup>Mo. El tecnecio está presente en el <sup>99m</sup>Tc-pertecnetato en el estado de oxidación Tc(VII), que relativamente no reactivo. La preparación de los complejos de tecnecio de bajo estado de oxidación Tc(I) o Tc(V) requiere por tanto usualmente la adición de un agente reductor adecuado farmacéuticamente aceptable tal como ditionito de sodio, bisulfito de sodio, ácido ascórbico, ácido formamidina sulfínico, ión estannoso, Fe(II) o Cu(I) para facilitar la complejación. El agente reductor farmacéuticamente aceptable es de manera preferible una sal estannosa, lo más preferible cloruro estannoso, fluoruro estannoso o tartrato estannoso.

60 Cuando el resto de formación de imagen es un núcleo hiperpolarizado activo en RMN, tal como un átomo de <sup>13</sup>C hiperpolarizado, se puede preparar el compuesto hiperpolarizado deseado mediante intercambio de polarización

# ES 2 299 884 T3

a partir de un gas hiperpolarizado (tal como  $^{129}\text{Xe}$  o  $^3\text{He}$ ) y un derivado de ácido hidroxámico enriquecido con  $^{13}\text{C}$  adecuado.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el agente de formación de imagen tal como se ha descrito anteriormente, junto con un vehículo biocompatible, en una forma adecuada para la administración en mamíferos. El “vehículo biocompatible” es un fluido, especialmente un líquido, en el que se puede suspender o disolver el agente de formación de imagen, de tal manera que la composición sea fisiológicamente tolerable, es decir, se pueda administrar al cuerpo del mamífero sin toxicidad ni malestar indebido. El vehículo biocompatible es de manera adecuada un vehículo inyectable líquido tal como estéril, de agua libre de pirógeno para inyección; una solución acuosa tal como solución salina (que se puede equilibrar de manera ventajosa de tal manera que el producto final para la inyección sea cualquiera de isotónico o no hipotónico); una solución acuosa de una o más sustancias que ajustan la tonicidad (por ejemplo, sales de cationes en plasma con contrapones biocompatibles), azúcares (por ejemplo, glucosa o sacarosa), alcoholes de azúcares (por ejemplo, sorbitol o manitol), glicoles (por ejemplo, glicerol), u otros materiales poliolicos no iónicos (por ejemplo, polietilenglicoles, propilenglicoles y similares).

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición radiofarmacéutica que comprende el agente de formación de imagen tal como se ha descrito anteriormente en la que el resto de formación de imagen es radioactivo, junto con un vehículo biocompatible (tal como se ha definido anteriormente), en una forma adecuada para la administración en un mamífero. Dichas composiciones radiofarmacéuticas se suministran de manera adecuada en un contenedor que se proporciona con un cierre hermético que es adecuado para un pinchazo único o múltiple con una aguja hipodérmica (por ejemplo, un septum engastado con cierre hermético) que mantiene a la vez la integridad estéril. Dichos contenedores pueden contener dosis únicas o múltiples para el paciente. Los contenedores de dosis múltiples preferidos comprenden un vial de volumen único (por ejemplo, de 10 a 30  $\text{cm}^3$  de volumen) que contiene dosis múltiples para el paciente, por tanto, las dosis únicas para el paciente pueden retirarse de esta manera en jeringas de calidad clínica en diversos intervalos de tiempo durante el tiempo de vida viable de la preparación que convenga a la situación clínica. Las jeringas prerrellenas se diseñan para contener una dosis humana única, y son por tanto preferiblemente una jeringa desecharable u otras adecuadas para el uso clínico. Se puede proporcionar de manera opcional la jeringa prerrellena con un blindaje protector de la jeringa para proteger al operador de la dosis radioactiva. Se conocen en la técnica dichos blindajes protectores de jeringa radiofarmacéutica adecuados y comprenden de manera preferible cualquiera de plomo o tungsteno.

Cuando el resto de formación de imagen comprende  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , un contenido adecuado de radioactividad para un diagnóstico radiofarmacéutico por imagen está en el intervalo de 180 a 1500 MBq de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , dependiendo del emplazamiento que se va a diagnosticar por imagen *in vivo*, la captación y la relación diana a fondo.

Se pueden preparar las composiciones radiofarmacéuticas de la presente invención a partir de kits, tal como se describe en la quinta y sexta formas de realización a continuación. De manera alternativa, se pueden preparar las composiciones radiofarmacéuticas bajo condiciones asepticas de fabricación para dar el producto estéril deseado. Se pueden preparar también las composiciones radiofarmacéuticas bajo condiciones no estériles, seguidas por la esterilización terminal usando, por ejemplo, irradiación gamma, autoclavado; calor seco o tratamiento químico (por ejemplo, con óxido de etileno). De manera preferible, las composiciones radiofarmacéuticas de la presente invención se preparan a partir de kits.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un conjugado del inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz de Fórmula (I) con un ligando. Dichos ligandos conjugados son útiles para la preparación de inhibidores de la metaloproteinasa de la matriz marcados con cualquiera de un ión metálico radioactivo o un ión metálico paramagnético. De manera preferible, el ligando conjugado es de Fórmula IIa, tal como se ha definido anteriormente. Lo más preferible, el inhibidor MMP del ligando conjugado es de Fórmula IV, tal como se ha definido anteriormente. El ligando del conjugado del cuarto aspecto de la invención es de manera preferible un agente quelante. De manera preferible, el agente quelante tiene una diaminadioxima,  $\text{N}_2\text{S}_2$  o grupo donador  $\text{N}_3\text{S}$ .

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un kit no radioactivo para la preparación de la composición radiofarmacéutica descrita anteriormente en el que el resto de formación de imagen comprende un radiometal que comprende un conjugado de un ligando con el inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz de Fórmula (I). Cuando el radiometal es  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , el kit comprende adicionalmente de manera adecuada un reductor biocompatible. Se describen en la cuarta forma de realización anterior los ligandos conjugados, y los aspectos preferidos de los mismos.

Dichos kits se diseñan para proporcionar productos radiofarmacéuticos estériles adecuados para la administración a un ser humano, por ejemplo, mediante la inyección directa en la corriente sanguínea. Para  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , el kit se liofiliza de manera preferible y se diseña para reconstituirse con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteconato estéril ( $\text{TcO}_4^-$ ) a partir de un generador de radioisótopo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  para dar una solución adecuada para la administración a un ser humano sin manipulación adicional. Los kits adecuados comprenden un contenedor sellado que permite el mantenimiento de la integridad estéril y/o la seguridad radioactiva, más opcionalmente una cámara de aire con un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón), que permita a la vez la adición y la retirada de soluciones mediante jeringa. Dicho contenedor preferido es un vial sellado con un septo, cuyo cierre hermético al gas se engasta en una cápsula (normalmente de aluminio). Dichos contenedores tienen la ventaja adicional de que el cierre puede soportar el vacío si se desea, por ejemplo, cambiar el gas de la cámara de aire o desgasificar las soluciones. El kit comprende el ligando o el quelante conjugado en cualquier forma de base

5 libre o sal de ácido, junto con un reductor biocompatible tal como ditionito de sodio, bisulfito de sodio, ácido ascórbico, ácido formamidina sulfónico, ión estannoso, Fe(II) o Cu(I). El reductor biocompatible es, de manera preferible, una sal estannosa tal como cloruro estannoso o tartrato estannoso. De manera alternativa, el kit puede contener de manera opcional un complejo metálico que, tras la adición de un radiometal, experimenta la transmetalación (es decir, el intercambio metálico) dando el producto deseado

10 Los kits no radioactivos pueden comprender adicionalmente de manera opcional componentes adicionales tales como un transquelante, radioprotector, conservante antimicrobiano, agente de ajuste del pH o relleno. El “transquelante” es un compuesto que reacciona rápidamente para formar un complejo débil con tecnecio, que a continuación se desplaza mediante el ligando. Esto minimiza el riesgo de formación de tecnecio hidrolizado reducido (RHT) debido a la reducción rápida de pertecnetato competente con el tecnecio de complejación. Dichos transquelantes adecuados son sales de un ácido orgánico débil, es decir, un ácido orgánico que tiene un pKa en el intervalo de 3 a 7, con un catión biocompatible. Dichos ácidos orgánicos débiles adecuados son el ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido glucoheptónico, ácido benzoico, ácidos fenólicos o fosfónicos. Por tanto, las sales adecuadas 15 son los acetatos, citratos, tartratos, gluconatos, glucoheptonatos, benzoatos, fenolatos o fosfonatos. Dichas sales preferidas son tartratos, gluconatos, glucoheptonatos, benzoatos, o fosfonatos, lo más preferible fosfonatos, lo más especial difosfonatos. Dicho transquelante preferido es una sal de MDP, es decir, ácido metilenodifosfónico, con un catión biocompatible. Por el término “catión biocompatible” se entiende un contrión cargado positivamente que forma una sal con un grupo aniónico ionizado cargado negativamente, en el que dicho contrión cargado positivamente es también 20 no tóxico y por tanto adecuado para la administración en el cuerpo del mamífero, de manera especial el cuerpo humano. Los ejemplos de cationes biocompatibles adecuados incluyen: los metales alcalinos sodio o potasio; los metales alcalinotérreos calcio y magnesio; y el ión amonio. Los cationes biocompatibles preferidos son sodio y potasio, lo más preferible sodio.

25 30 Por el término “radioprotector” se entiende un compuesto que inhibe las reacciones de degradación, tales como los procesos redox, atrapando radicales libres altamente reactivos, tales como radicales libres que contienen oxígeno que surgen de la radiolisis del agua. Los radioprotectores de la presente invención se escogen de manera adecuada entre: ácido ascórbico, ácido paraaminobenzoico (es decir, ácido 4-aminobenzoico), ácido gentísico (es decir, ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y las sales de los mismos con un catión biocompatible tal como se ha descrito anteriormente.

35 Por el término “conservante antimicrobiano” se entiende un agente que inhibe el crecimiento de microorganismos potencialmente perjudiciales tales como bacterias, levaduras u hongos. El conservante antimicrobiano puede presentar también algunas propiedades bactericidas dependiendo de la dosis. El papel principal del(de los) conservante(s) antimicrobiano(s) de la presente invención es inhibir el crecimiento de cualquiera de dichos microorganismos en la composición radiofarmacéutica después de la reconstitución, es decir, en el propio producto radioactivo de diagnóstico. El conservante antimicrobiano puede, sin embargo, usarse también de manera opcional para inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente perjudiciales en uno o más componentes del kit no radioactivo de la presente invención antes de la reconstitución. El(los) conservante(s) antimicrobiano(s) adecuado(s) incluye(n): los parabenos, 40 es decir, metil, etil, propil o butil parabeno o las mezclas de los mismos; alcohol bencílico; fenol; cresol; cetrimida y tiomersal. El(los) conservante(s) antimicrobiano(s) preferido(s) son los parabenos.

45 50 El término “agente de ajuste del pH” significa un compuesto o una mezcla de compuestos útiles para asegurar que el pH del kit reconstituido está comprendido dentro de los límites aceptables (aproximadamente pH 4,0 a 10,5) para la administración a un ser humano o a un mamífero. Los agentes de ajuste de pH adecuados incluyen tampones farmacéuticamente aceptables, tales como tricita, fosfato o *TRIS* [es decir, *tris*(hidroximetil)aminometano], y bases farmacéuticamente aceptables tales como carbonato de sodio, bicarbonato de sodio o las mezclas de los mismos: cuando se emplea el conjugado en forma de sal de ácido, se puede proporcionar opcionalmente el agente de ajuste del pH en un vial o contenedor separado, de tal manera que el usuario del kit puede ajustar el pH como parte de un procedimiento multietapa.

55 Por el término “relleno” se entiende un agente de volumen farmacéuticamente aceptable que puede facilitar la manipulación del material durante la producción y liofilización. Los rellenos adecuados incluyen sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, y azúcares o alcoholes de azúcares solubles en agua tales como sacarosa, maltosa, manitol o trehalosa.

60 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona kits para la preparación de preparaciones radiofarmacéuticas en las que el resto de formación de imagen comprenden un radioisótopo no metálico, es decir, un halógeno radioactivo que emite radiación gamma o un no metal radioactivo que emite positrones: Dichos kits comprenden un “precursor”, tal como se ha descrito anteriormente, de manera preferible en forma estéril no pirogénica, de tal manera que la reacción con una fuente estéril del radioisótopo proporciona la composición radiofarmacéutica deseada con el número mínimo de manipulaciones. Dichas consideraciones son particularmente importantes para las composiciones radiofarmacéuticas en las que el radioisótopo tiene una semivida relativamente corta, y para facilitar la manipulación y por tanto, reducir la dosis de radiación del radiofarmacéutico. Por tanto, el medio de reacción para la reconstitución 65 de dichos kits es preferiblemente acuoso, y en una forma adecuada para la administración en mamíferos. El precursor se proporciona de manera preferible en un contenedor hermético, tal como se ha descrito para la cuarta forma de realización anterior.

El “precursor” comprende de manera adecuada un derivado no radioactivo del material inhibidor de la metaloproteína de la matriz, en forma estéril apirogénica, que se diseña de tal manera que la reacción química con una forma química conveniente del radioisótopo no metálico deseado se puede llevar a cabo en el mínimo número de etapas (idealmente una etapa única), y sin la necesidad de purificación significativa (idealmente sin purificación adicional) 5 para dar el producto radioactivo deseado. Se pueden obtener de manera conveniente dichos precursores con buena pureza química. Los precursores adecuados se derivan de los ejemplos descritos en Bolton, J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002).

10 Los precursores preferidos de esta forma de realización comprenden un derivado que experimenta halogenación electrófila o nucleófila; experimenta alquilación fácil con un agente alquilante escogido entre un haluro de alquilo o fluoroalquilo, tosilato, triflato (es decir, trifluorometanosulfonato) o mesilato; o restos tioalquilados que forman enlaces tioéter. Los ejemplos de la primera categoría son:

- 15 (a) derivados organometálicos tales como trialquilestannano (por ejemplo, trimetilestannilo o tributilestannilo), o un trialquilsilano (por ejemplo, trimetilsililo);
- (b) yoduro de alquilo o bromuro de alquilo no radioactivo para el intercambio de halógeno y alquil tosilato, mesilato o triflato para la halogenación nucleófila;
- 20 (c) anillos aromáticos activados hacia la halogenación electrófila (por ejemplo, fenoles) y anillos aromáticos activados hacia la halogenación nucleófila (por ejemplo, aril yodonio, aril diazonio, nitroarilo).

25 Los derivados preferidos que experimentan alquilación fácil son los alcoholes, grupos fenoles o amina, especialmente fenoles y aminas primarias o secundarias estéricamente obstaculizadas.

Los derivados preferidos reactivos de radioisótopos que contienen tioles alquilados son los grupos N-haloacetilo, especialmente los derivados de N-cloroacetilo y N-bromoacetilo.

30 Se pueden emplear precursores bajo condiciones asépticas de fabricación para dar el material estéril no pirogénico deseado. Se pueden emplear también precursores bajo condiciones no estériles, seguido por la esterilización terminal usando, por ejemplo, irradiación gamma, autoclavado, calor seco o tratamiento químico (por ejemplo, con óxido de etileno). De manera preferible, los precursores se emplean en forma estéril no pirogénica.

35 Cuando X<sup>3</sup> en la Fórmula I es H, los precursores adecuados para los MMPi de Fórmula I pueden comprender por tanto un derivado en el que X<sup>3</sup> es un grupo protector (PG) del resto del ácido hidroxámico. Por el término “grupo protector” se entiende un grupo que inhibe o suprime las reacciones químicas indeseables, pero que se diseña para que sea lo suficientemente reactivo para que pueda separarse del grupo funcional en cuestión bajo condiciones suficientemente suaves que no modifiquen el resto de la molécula. Después se obtiene la desprotección del grupo deseado. Se conocen bien por aquellas personas expertas en la técnica los grupos protectores y se escogen de manera adecuada entre, para 40 los grupos amina: Boc (en el que Boc es terc-butoxicarbonilo), Fmoc (en el que Fmoc es fluorenilmethoxycarbonilo), trifluoroacetilo, aliloxicarbonilo, Dde [es decir, 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etil] o Npys (es decir, 3-nitro-2-piridina sulfenilo); y para los grupos carboxilo: éster de metilo, éster de terc-butilo o éster de bencilo. Para los grupos hidroxilo, los grupos protectores adecuados son: bencilo, acetilo, benzoflo, tritilo (Trt) o trialquilsililo tal como tetrabutildimetsililoso. Para los grupos tiol, los grupos protectores adecuados son: tritilo y 4-metoxibencilo. Los grupos protectores preferidos para el grupo hidroxilo de un resto de ácido hidroxámico son: bencilo o trialquilsililo. Se 45 describe en “Protective Groups in Organic Synthesis”, Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, (John Wiley & Sons, 1991) el uso de grupos protectores adicionales.

50 Las formas químicas convenientes preferidas del radioisótopo no metálico deseado incluyen:

- (a) iones haluro (por ejemplo <sup>123</sup>I-yoduro o <sup>18</sup>F-fluoruro), especialmente en medio acuoso, para las reacciones de sustitución;
- (b) compuestos de <sup>11</sup>C-metil yoduro o <sup>18</sup>F-fluoroalqueno que tengan un grupo saliente bueno, tal como bromuro, mesilato o tosilato;
- (c) HS(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub><sup>18</sup>F para las reacciones de S-alquilación con precursores alquilantes tales como derivados de N-cloroacetilo o N-bromoacetilo.

60 Los ejemplos de dichos “precursores” adecuados, y los procedimientos para su preparación se describen en la primera forma de realización (más arriba).

65 El “precursor” del kit se suministra de manera preferible ligado covalentemente a una matriz de soporte sólido. De esta manera, el producto radiofarmacéutico deseado se forma en solución, mientras que los materiales de partida y las impurezas permanecen enlazados con la fase sólida. Se describen en el Documento WO 03/002489 los precursores para la fluoración electrófila de la fase sólida con <sup>18</sup>F-fluoruro. Se describen en el Documento WO 03/002157 los precursores para la fluoración nucleófila de la fase sólida con <sup>18</sup>F-fluoruro. El kit puede contener por tanto un cartucho que se puede introducir en un sintetizador automatizado adaptado de manera adecuada. El cartucho puede contener,

aparte del precursor enlazado con el soporte sólido, una columna para eliminar el ión fluoruro no deseado, y un recipiente apropiado conectado de tal manera que permite a la mezcla de reacción evaporarse y deja al producto que se va a formular tal como se requiere. Los reactivos y solventes y otros consumibles requeridos para la síntesis pueden también incluirse con un disco compacto que soporta el software que permite que se opere el sintetizador de tal manera

5 que se cumplan las necesidades del cliente para la concentración radioactiva, volúmenes, tiempo de liberación, etc. De manera conveniente, todos los componentes del kit son desechables para minimizar la posibilidad de contaminación entre análisis y que serán estériles y con calidad asegurada.

En un octavo aspecto, la presente invención describe el uso del agente de formación de imagen inhibidor de la 10 metaloproteinasa de la matriz descrito anteriormente para el diagnóstico por imagen de la aterosclerosis, especialmente las placas vulnerables inestables.

En un aspecto adicional, la presente invención describe el uso del agente de formación de imagen inhibidor de la 15 metaloproteinasa de la matriz descrito anteriormente para el diagnóstico por imagen de otras enfermedades inflamatorias, cáncer, o enfermedades degenerativas,

En un aspecto adicional, la presente invención describe el uso del agente de formación de imagen inhibidor de la 20 metaloproteinasa de la matriz descrito anteriormente para la detección intravascular de la aterosclerosis, especialmente las placas vulnerables inestables, usando la detección por proximidad. Se puede conseguir dicha detección por proximidad usando dispositivos intravasculares tales como catéteres o intraoperatoriamente usando detectores con dispositivos portátiles (por ejemplo, detectores gamma). Dicha detección intravascular es particularmente útil cuando el resto de formación de imagen es un grupo indicador adecuado para la formación de imagen óptica o un emisor  $\beta$  *in vivo*, ya que dichos restos pueden no detectarse fácilmente fuera del cuerpo del mamífero, pero son adecuados para la 25 detección por proximidad.

Se ilustra la invención mediante los Ejemplos no limitantes detallados a continuación. El Ejemplo 1 describe la síntesis del compuesto 1,1,1-*tris*(2-aminoethyl)metano. El Ejemplo 2 proporciona una síntesis alternativa de 1,1,1-*tris*(2-aminoethyl)metano que evita el uso de intermedios de azida potencialmente peligrosos. El Ejemplo 3 describe la síntesis 30 de un precursor de cloronitrosoalcano. El Ejemplo 4 describe la síntesis de una diaminadioxima bifuncional sustituida con amina preferida de la presente invención (Quelante 1).

El Ejemplo 5 proporciona una síntesis de un MMPi de la invención, el Compuesto 27. El Ejemplo 6 proporciona la síntesis de un precursor de MMPi sustituido con fenol adecuado para la radiohalogenación (Compuesto 23). El Ejemplo 7 describe la síntesis de un precursor de yodoanilina adecuado para la radiohalogenación (Compuesto 26). El 35 Ejemplo 9 proporciona la síntesis de un quelante conjugado de un MMPi de la invención. El Ejemplo 10 proporciona la síntesis de un MMPi funcionalizado con un grupo ligante PEG. El Ejemplo 11 describe la síntesis de un quelante conjugado que tiene un grupo ligante PEG. El Ejemplo 12 proporciona la síntesis de un precursor de cloroacetilo adecuado para el radiomarcado PET. El Ejemplo 13 proporciona la síntesis de derivados de MMPi de fluoroalquilo 40 enlazados con tioéter. El Ejemplo 14 proporciona un intervalo de aminoácidos y/o MMPi enlazados con PEG para permitir la modificación de las propiedades biológicas.

Los Ejemplos 15 y 16 proporcionan la síntesis de compuestos marcados con  $^{18}\text{F}$  adecuados para el radiomarcado de MMPi con  $^{18}\text{F}$ . El Ejemplo 17 proporciona la síntesis de los compuestos 45 a 48. El Ejemplo 18 describe ensayos *in vitro* que muestran que los derivados de MMPi de la presente invención retienen la actividad biológica como inhibidores MMP. El Ejemplo 19 proporciona un procedimiento general de radiomarcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  para los quelantes conjugados. El Ejemplo 20 proporciona un procedimiento de radioyodación para los precursores adecuados de la invención. El Ejemplo 21 proporciona una preparación de derivados con  $^{18}\text{F}$  específicos de la invención. El Ejemplo 22 proporciona evidencias de que los derivados radioyodados de la invención presentan estabilidad en plasma adecuada para funcionar como agentes de formación de imagen *in vivo*. El Ejemplo 23 describe la captación de agentes de 45 formación de imagen radioyodados de la invención en modelos tumorales *in vivo*. Esto muestra que se puede modificar la biodistribución usando los grupos ligantes de la invención. El Compuesto 20A (es decir, el Compuesto 24A con un espaciador PEG3) mostró un tiempo de permanencia similar en sangre, pero un aumento de un 10% en la excreción urinaria y una disminución del 10% correspondiente en HBS en comparación con el Compuesto 24A. Por tanto, la adición de un biomodificador dio como resultado un cambio en la farmacocinética. La captación en el tumor fue 50 ligeramente inferior a la observada para el Compuesto 24A, pero la retención aumentó ligeramente. El Compuesto 32A mostró una elevada retención inicial en sangre, que se aclaró con el tiempo. Se observaron una buena captación y retención tumoral hasta 1 hora después de la inyección. Se observaron una elevada excreción urinaria y una baja excreción GI. Estas farmacocinéticas son más deseables y significativamente diferentes de las del compuesto sin el biomodificador (es decir, el Compuesto 24A), demostrando los efectos beneficiosos de la biomodificación con estos 55 compuestos sin pérdida en la potencia de inhibición.

El Ejemplo 24 describe la captación de agentes de formación de imagen marcados con  $^{18}\text{F}$  de la invención en modelos tumorales *in vivo*. El Ejemplo 25 describe la captación de los agentes de formación de imagen de la invención en un modelo *in vivo* de la aterosclerosis. El Ejemplo 26 proporciona evidencias autoradiográficas de que los agentes 60 de la invención se absorben en los emplazamientos de la aterosclerosis *in vivo*. El Ejemplo 27 describe la formación de imagen tumoral en modelos tumorales.

La Figura 1 muestra las estructuras químicas de diversos compuestos de la invención, que incluyen un MMPi a partir del cual se derivan (Compuesto 1). La Figura 2 muestra las estructuras químicas de 3 MMPi de la invención. La Figura 3 muestra imágenes obtenidas del Ejemplo 27.

5

### Ejemplo 1

#### *Síntesis de 1,1,1-tris(2-aminoetil)metano*

10 Etapa a

##### *Dimetiléster del ácido 3-(metoxicarbonilmetileno)glutárico*

15 El carbometoximetilenotrienilfosforano (167 g, 0,5 mol) en tolueno (600 ml) se trató con 3-oxoglutarato de dímetilo (87 g, 0,5 mol) y se calentó la reacción a 100°C en un baño de aceite a 120°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 36 h: A continuación se concentró la reacción *a vacío* y se trituró el residuo aceitoso con éter de petróleo 40/60/dielíster 1:1.600 ml. Se separó mediante precipitación el óxido de trienilfosfina y se eliminó el líquido sobrenadante por decantación/filtración. Se destiló el residuo en la evaporación *a vacío* según Kugelrohr bajo Bpt de alto vacío (temperatura del horno 180-200°C a 0,2 torr; 0,026 kPa) para dar el dimetiléster del ácido 3-(metoxicarbonilmetileno) 20 glutárico (89,08 g, 53%).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 3,31 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 3,7 (9H, s, 3XOCH<sub>3</sub>), 3,87 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5,79 (1H, s, =CH), ppm.

25 RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>), δ 36,56, CH<sub>3</sub>, 4,87, 2 x CH<sub>3</sub>, 52,09 y 52,5 (2 x CH<sub>2</sub>); 122,3 y 146,16 C=CH; 165,9, 170,0 y 170,5 3 x COO ppm.

Etapa b

##### *Hidrogenación del dimetiléster del ácido 3-(metoxicarbonilmetileno)glutárico*

30 Se agitó el dimetiléster del ácido 3-(metoxicarbonilmetileno)glutárico (89 g, 267 mmol) en metanol (200 ml) con (paladio al 10% sobre carbón activo: agua al 50%) (9 g) bajo atmósfera de hidrógeno gas (3,5 bar; 3,5 x 10<sup>5</sup> N/m<sup>2</sup>) durante (30 h). Se filtró la solución mediante kieselguhr y se concentró *a vacío* para dar dimetiléster del ácido 3-(metoxicarbonilmetil)glutárico en forma de aceite, rendimiento (84,9 g, 94%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>), δ 2,48 (6H, d, J = 8 Hz, 3 X CH<sub>2</sub>), 2,78 (1H, sexteto, J = δ Hz CH), 3,7 (9H, s, 3 X CH<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>), δ 28,6, CH; 37,50, 3 X CH<sub>3</sub>; 51,6, 3 X CH<sub>2</sub>; 172,28 X COO.

40 Etapa c

##### *Reducción y esterificación de trimetil éster al triacetato*

45 Bajo atmósfera de nitrógeno y en un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 2L, se trató con precaución hidruro de aluminio y litio (20 g, 580 mmol) en tetrahidrofuran (400 ml) con *tris*(metoxicarbonilmetil)metano (40 g, 212 mmol) en tetrahidrofuran (200 ml) durante 1 h. Se produjo una reacción muy exotérmica, provocando que el solvente experimentara un fuerte reflujo. Se calentó la reacción en un baño de aceite a 90°C a reflujo durante 3 días. Se detuvo rápidamente la reacción mediante la adición con precaución gota a gota de ácido acético (100 ml) hasta que cesó la evolución del hidrógeno. La mezcla de reacción agitada se trató con precaución con solución de anhídrido acético (500 ml) a una tal velocidad para provocar un suave reflujo. Se equipó el matraz para la destilación y se agitó y a 50 continuación se calentó a 90°C (temperatura del baño de aceite) para eliminar el tetrahidrofuran por destilación. Se añadió una porción adicional de anhídrido acético (300 ml), la reacción retornó a la configuración de reflujo y se agitó y calentó en un baño de aceite a 140°C durante 5 h. Se dejó enfriar la reacción y se filtró. Se lavó el precipitado de óxido de aluminio con acetato de etilo y los filtrados combinados se concentraron en un evaporador rotatorio en un baño de agua a una temperatura de 50°C *a vacío* (5 mm de Hg) para dar como resultado un aceite. Se capturó el aceite en acetato de etilo (500 ml) y se lavó con solución saturada de carbonato de potasio acuoso. Se separó la solución de acetato de etilo, se secó con sulfato de sodio, y se concentró *a vacío* para dar como resultado un aceite. Se destiló el aceite según Kugelrohr en alto vacío para dar *tris*(2-acetoxietil)metano (45,3 g, 96%) en forma de aceite. Punto de ebullición 220°C a 0,1 mm de Hg.

60 RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>), δ 1,66 (7H, m, 3 x CH<sub>2</sub>, CH), 208 (1H, s, 3 x CH<sub>3</sub>); 4,1 (6H, t, 3 X CH<sub>2</sub>O). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>), δ 20,9, CH<sub>3</sub>; 29,34; CH; 32,17, CH<sub>2</sub>; 62,15, CH<sub>2</sub>O; 171, CO.

Etapa d

##### *Eliminación de grupos acetato a partir del triacetato*

Se calentó *Tris*(2-acetoxietil)metano (45,3 g 165 mM) en metanol (200 ml) y amonio 880 (10 ml) en un baño de aceite a 80°C durante 2 días. Se trató la reacción con una porción adicional de amonio 880 (50 ml) y se calentó a 80°C

## ES 2 299 884 T3

en un baño de aceite durante 24 h. Se añadió una porción adicional de amonio 880 (50 ml) y se calentó la reacción a 80°C durante 24 h. A continuación se concentró la reacción *a vacío* para eliminar todos los solventes para dar un aceite. Este se capturó en amoniaco 880 (150 ml) y se calentó a 80°C durante 24 h. A continuación se concentró la reacción *a vacío* para eliminar todos los solventes para dar un aceite. La destilación Kugelrohr proporcionó 0,2 mm de acetamida con punto de ebullición de 170-180 Se lavaron los bulbos que contenían la acetamida limpia y la destilación continuó. Se destilaron 0,2 mm de *Tris*(2-hidroxietil)metano (22,5 g, 92%) con punto de ebullición de 220°C

10 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  1,45 (6H, q, 3 x  $\text{CH}_2$ ), 2,2 (1H, quintete, CH); 3,7 (6H, t 3 x  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 5,5 (3H, brs, 3 x OH).  
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  22,13, CH; 33,95, 3 X  $\text{CH}_2$ ; 57,8 3 X  $\text{CH}_2\text{OH}$ .

Etapa e

### 15 *Conversión del triol en el tris(metanosulfonato)*

A una solución agitada enfriada en hielo de *tris*(2-hidroxietil)metano (10 g, 0,0676 mol) en diclorometano (50 ml) se le añadió gota a gota lentamente una solución de cloruro de metanosulfonilo (40 g, 0,349 mol) en diclorometano (50 ml) bajo nitrógeno a una velocidad tal que la temperatura no aumentó por encima de 15°C. A continuación se añadió gota a gota piridina (21,4 g, 0,27 mol, 4 eq) disuelta en diclorometano (50 ml) a una velocidad tal que la temperatura no aumentó por encima de 15°C, reacción exotérmica. Se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente durante 24 h y a continuación se trató con solución de ácido clorhídrico 5N (80 ml) y se separaron las capas. Se extrajo la capa acuosa con más diclorometano (50 ml) y se secaron los extractos combinados sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron *a vacío* para dar *tris*[2-metilsulfoniloxi]etil]metano contaminado con cloruro de metano sulfonilo en exceso. El rendimiento teórico fue de 25,8 g.

20 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  4,3 (6H, t, 2 x  $\text{CH}_2$ ), 3,0 (9H, s, 3 X  $\text{CH}_3$ ), 2 (1H, hextete, CH), 1,85 (6H, q, 3 X  $\text{CH}_2$ ).

25 Etapa f

### 30 *Preparación de 1,1,1-tris(2-azidoetil)metano*

Una solución agitada de *tris*[2-(metilsulfoniloxi)etil]metano [de la Etapa 1(e), contaminada con exceso de cloruro de metilsulfonilo] (25,8 g, 67 mmol, teórico) en DMF seco (250 ml) bajo nitrógeno, se trató con azida de sodio (30,7 g, 0,47 mol) en porciones durante 15 minutos. Se observó exotermia y se enfrió la reacción en un baño de hielo. Tras 30 minutos, se calentó la mezcla de reacción en un baño de aceite a 50°C durante 24 h. La reacción se volvió de color marrón. Se dejó enfriar la reacción, se trató con solución diluida de carbonato de potasio (200 ml) y se extrajo tres veces con de éter de petróleo 40/60/dietiléter 10:1 (3 x 150 ml). Se lavaron los extractos orgánicos con agua (2 x 150 ml), se secaron con sulfato de sodio y se filtraron. Se añadió etanol (200 ml) a la solución de petróleo/éter para conservar la triazida en solución y el volumen reducido *a vacío* hasta no menos de 200 ml: Se añadió etanol (200 ml) y se volvió a concentrar *a vacío* para eliminar las últimas trazas de petróleo dejando no menos de 200 ml de solución etanólica. La solución de etanol de la triazida se usó directamente en la Etapa 1 (g).

45 **ADVERTENCIA: NO ELIMINAR TODO EL SOLVENTE YA QUE LA AZIDA ES POTENCIALMENTE EXPLOSIVA Y DEBERÍA MANTENERSE EN SOLUCIÓN DILUIDA EN TODO MOMENTO.**

Se evaporaron a vacío menos de 0,2 ml de la solución para eliminar el etanol y un análisis de RMN en esta pequeña muestra: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  3,35 (6H, t, 3 x  $\text{CH}_2$ ), 1,8 (1H, septete, CH), 1,6 (6H, q, 3 x  $\text{CH}_2$ ).

50 Etapa g

### 55 *Preparación de 1,1,1-tris(2-aminoetil)metano*

Se trató *Tris*(2-azidometil)metano (15,06 g, 0,0676 ml), (suponiendo un rendimiento del 100% en la reacción anterior) en etanol (200 ml) con paladio al 10% sobre carbón activo (2 g, agua al 50%) y se hidrogenó durante 12 h. Se evacuó el recipiente de reacción cada 2 horas para eliminar el nitrógeno desprendido de la reacción y se volvió a llenar con hidrógeno. Se tomó una muestra para el análisis de RMN para confirmar la conversión completa de la triazida en la triamina. **Precaución:** la azida sin reducir podría hacer explosión en la destilación. Se filtró la reacción a través de un parche de Celite para eliminar el catalizador y se concentró *a vacío* para dar *tris*(2-aminoetil)metano en forma de aceite. Se purificó éste de manera adicional mediante la destilación de Kugelrohr punto de ebullición 180-200°C a 0,4 mm de Hg para dar un aceite incoloro (8,1 g, rendimiento global de un 82,7% a partir del triol).

60 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), 272 (6H, t, 3 x  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 1,41 (H, septete, CH), 139 (6H, q, 3 x  $\text{CH}_2$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  39,8 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 38,2 (CH<sub>2</sub>), 31,0 (CH).

## Ejemplo 2

*Preparación alternativa de 1,1,1-tris(2-aminoetil)metano*

## 5      Etapa a

*Amidación del trimetiléster con p-metoxi-bencilamina*

Se disolvió *Tris*(metiloxicarbonilmetil)metano [2 g, 8,4 mmol, preparado como en la Etapa 1 (b)] en *p*-metoxi-bencilamina (25 g, 178,6 mmol). Se dispuso el equipo para la destilación y se calentó a 120°C durante 24 h bajo flujo de nitrógeno. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante la cantidad de metanol recogido. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se añadieron 30 ml de acetato de etilo, a continuación se agitó durante 30 min el producto de triamida precipitado. Se aisló la triamida mediante filtración y se lavó la torta del filtro varias veces con cantidades suficientes de acetato de etilo para eliminar el exceso de *p*-metoxi-bencilamina. Tras el secado, se obtuvieron 4,6 g, 100%, de un polvo blanco. Se uso el producto muy insoluble directamente en la etapa siguiente sin purificación o caracterización adicional.

## Etapa b

20     *Preparación de 1,1,1-tris[2-(p-metoxibencilamino)etil]metano*

A un matraz de fondo redondo de 1000 ml de 3 bocas enfriado en un baño de agua con hielo se añadió cuidadosamente la triamida de la etapa 2 (a) (10 g, 17,89 mmol) a 250 ml de solución de borano 1M (3,5 g, 244,3 mmol). Tras la adición completa, se retiró el baño de agua con hielo y se calentó lentamente la mezcla de reacción a 60°C. Se agitó la mezcla de reacción a 60°C durante 20 h. Se retiró una muestra de la mezcla de reacción (1 ml), y se mezcló con 0,5 ml de HCl 5N y se dejó reposar durante 30 min. Se añadieron a la muestra 0,5 ml de NaOH 50, seguido por 2 ml de agua y se agitó la solución hasta que se disolvió todo el precipitado blanco. Se extrajo la solución con éter (5 ml) y se evaporó. Se disolvió el residuo en acetonitrilo a una concentración de 1 mg/ml y se analizó mediante MS. Si en el espectro MS se observan mono y diamidas ( $M+H/z = 520$  y 534), la reacción no está completa. Para completar la reacción, se añadieron 100 ml más de una solución de borano 1M en THF y se agitó la mezcla de reacción durante 6 h más a 60°C y se retiró una nueva muestra siguiendo el procedimiento de muestreo anterior. Se continuó tanto como fue necesario la adición suplementaria de solución THF en borano 1M hasta que se completó la conversión en la triamina.

Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se añadió lentamente HCl 5N, [ADVERTENCIA: Se produce una formación vigorosa de espuma!]. Se añadió HCl hasta que no se observó más evolución del gas. Se agitó la mezcla durante 30 min y se evaporó a continuación. Se suspendió la torta en solución acuosa de NaOH (20-40%; 1:2 p/v) y se agitó durante 30 minutos. A continuación se diluyó la mezcla con agua (3 volúmenes). A continuación se extrajo la mezcla con dietiléter (2 x 150 ml) [ADVERTENCIA: no usar solventes halogenados]. A continuación se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (1 x 200 ml), salmuera (150 ml) y se secaron con sulfato de magnesio. 40 Rendimiento tras la evaporación 7,6 g, 64% en forma de aceite.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 1,45, (6H, m, 3 x  $\text{CH}_2$ ); 1,54 (1H, septete,  $\text{CH}$ ); 2,60 (6H, t, 3 x  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 3,68 (6H, s,  $\text{ArCH}_2$ ); 3,78 (9H, s, 3 x  $\text{CH}_3\text{O}$ ); 6,94 (6H, d, 6 x Ar), 7,20 (6H, d, 6 x Ar).

45     RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 32,17, CH; 34,44,  $\text{CH}_2$ ; 47,00,  $\text{CH}_2$ ; 53,56,  $\text{ArCH}_2$ ; 55,25,  $\text{CH}_3\text{O}$ ; 113,78, Ar; 129,29, Ar; 132,61, Ar; 158,60, Ar;

## Etapa c

50     *Preparación de 1,1,1-tris(2-aminoetil)metano*

Se disolvió 1,1,1-tris[2-(*p*-metoxibencilamino)etil]metano (20,0 gramos, 0,036 mol) en metanol (100 ml) y se añadió  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  (5,0 gramos). Se hidrogenó la mezcla (3 bar;  $3 \times 10^5 \text{ N/m}^2$ , 100°C, en un autoclave) y se agitó durante 5 horas. Se añadió  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  en dos porciones más (2 x 5 gramos) tras 10 y 15 horas de manera respectiva. Se filtró la mezcla de reacción y se lavó el filtrado con metanol. Se evaporó la fase orgánica combinada y se destiló el residuo bajo vacío ( $1 \times 10^{-2}$ , 110°C) para dar 2,60 gramos (50%) de 1,1,1-tris(2-aminoetil)metano idéntico con el Ejemplo 1 anteriormente descrito.

## 60    Ejemplo 3

*Preparación de 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano*

Se enfrió a -30°C una mezcla de 2-metilbut-2-eno (147 ml, 1,4 mol) y nitrito de isoamilo (156 ml, 1,16 mol) en un baño de hielo seco y metanol y se agitó vigorosamente con un agitador de aire vertical y se trató gota a gota con ácido clorhídrico concentrado (140 ml, 1,68 mol) a una velocidad tal que la temperatura se mantuvo por debajo de -20°C. Esto requiere aproximadamente 1 h ya que existe una exotermia significativa y debe tenerse cuidado en evitar el sobrecalentamiento. Se añadió etanol (100 ml) para reducir la viscosidad de la suspensión que se había formado al

## ES 2 299 884 T3

final de la adición y se agitó la reacción a -20°C y -10°C durante 2 h más para completar la reacción. Se capturó el precipitado mediante filtración bajo vacío y se lavó con 4 x 30 ml de etanol frío (-20°C) y 100 ml de agua fría con hielo, y se secó a vacío para dar 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano en forma de un sólido de color blanco. Se combinaron el filtrado de etanol y los lavados, y se diluyeron con agua (200 ml) y se dejaron reposar durante 1 h a -10°C momento 5 en el que se separó por cristalización cosecha adicional de 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano. Se capturó el precipitado mediante filtración y se lavó con el mínimo de agua y se secó *a vacío* para dar un rendimiento total de 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano (115 g, 0,85 mol, 73%) con una pureza > del 98% según RMN.

10 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ). Como una mezcla de isómeros (isómero 1, 90%) 1,5 d, (2H,  $\text{CH}_3$ ), 1,65 d, (4H, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 5,85, q, y 5,95, q, junto con 1H (isómero 2, 10%), 1,76 s (6H, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 2,07 (3H,  $\text{CH}_3$ ).

### Ejemplo 4

#### 15 Síntesis de *bis[N-(1,1-dimetil-2-N-hidroximina propil)2-aminoetil]-2)aminoetil)metano (Quelante 1)*

A una solución de *tris(2-aminoetil)metano* (4,047 g, 27,9 mmol) en etanol seco (30 ml) se le añadió carbonato de potasio anhidro (7,7 g, 55,8 mmol, 2 eq) a temperatura ambiente con agitación vigorosa bajo atmósfera de nitrógeno. Se disolvió una solución de 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano (7,56 g, 55,8 mol, 2 eq) en etanol seco (100 ml) y se hicieron gotear lentamente 75 ml de esta solución en la mezcla de reacción. Se siguió la reacción mediante TLC sobre gel de sílice [se analizaron las placas en diclorometano, metanol, amoniaco concentrado (0,8 s); 100/30/5 y se desarrolló la placa de TLC mediante pulverización con ninhidrina y calentamiento]. Se observaron los productos mono, di y trialquilados con el incremento de RF en este orden. Se llevó a cabo la analítica mediante HPLC usando una columna RPR en fase inversa en un gradiente de de acetonitrilo al 7,5-75 % en amonio acuoso al 3%. Se concentró la 20 reacción a vacío para eliminar el etanol y se volvió a suspender en agua (110 ml). Se extrajo la suspensión acuosa con éter (100 ml) para eliminar alguno de los compuestos trialquilados y las impurezas lipofílicas quedando el producto mono y dialquilado deseado en la capa de agua. Se tamponó la solución acuosa con acetato de amonio (2 eq, 4,3 g, 55,8 mmol) para asegurar una buena cromatografía. Se almacenó la solución acuosa a 4°C durante la noche antes de 25 purificar mediante HPLC conservativa automatizada.

30 Rendimiento (2,2 g, 6,4 mmol, 23%)

Espectrometría de masas; Ión positivo voltaje del cono 10 V. Encontrado: 334; calculado  $\text{M}+\text{H} = 334$

35 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  1,24 (6H, s 2 x  $\text{CH}_3$ ), 1,3 (6H, s, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 1,25-1,75 (7H, m, 3 x  $\text{CH}_2$ , CH), (3H, s, 2 x  $\text{CH}_2$ ), 2,58 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2,88 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{N}_2$ ), 5,0 (6H, s,  $\text{NH}_2$ , 2 x  $\text{NH}$ , 2 x OH).

RMN  $^1\text{H}$  (( $\text{CD}_3$ )<sub>2</sub>SO)  $\delta$  1,1 4 x CH; 1,29, 3 x  $\text{CH}_2$ ; 2,1 (4H, t, 2 x  $\text{CH}_2$ );

40 RMN  $^{13}\text{C}$  (( $\text{CD}_3$ )<sub>2</sub>SO),  $\delta$  9,0 (4 x  $\text{CH}_3$ ), 25,8 (2 x  $\text{CH}_3$ ), 31,0 2 x  $\text{CH}_2$ , 34,6  $\text{CH}_2$ , 56,8 2 x  $\text{CH}_2\text{N}$ ; 160,3, C=N

Condiciones de la HPLC; caudal 8 ml/min usando una columna PRP de 25 mm A = solución de amonio al 3% (sp.gr = 0,88)/agua; B = Acetonitrilo

45	Tiempo	% de B
	0	7,5
	15	75,0
	20	75,0
50	22	7,5
	30	7,5

Cargar 3 ml de solución acuosa por análisis, y recoger en una ventana temporal de 12,5-13,5 min.

55

### Ejemplo 5

#### 60 Síntesis de ácido 3-1(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)-(I-hidroxicarbamoilciclopentil)amino]propiónico (Compuesto 27; Técnica anterior)

##### Etapa A

A una solución de la sal del ácido p-toluenulfónico del éster bencílico del ácido 1-aminociclopentanocarboxílico 65 (12,1 gramos, 30,9 mmol) y trietilamina (10,0 ml, 72 mmol) en agua (150 ml) y 1,4-dioxano (150 ml) se le añadió cloruro de 4'-fluorobifenil-4-sulfonilo (8,8 gramos, 32,5 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas y a continuación se eliminó la mayor parte del solvente mediante evaporación bajo vacío. Se diluyó la

mezcla con acetato de etilo y se lavó sucesivamente con solución diluida de ácido clorhídrico, agua y salmuera. Se secó la solución con sulfato de magnesio y se concentró para dejar el éster bencílico del ácido 1-(4'-fluorobifenil-4-sulfonilamino) ciclopantanocáboxílico en forma de un sólido, 12,33 gramos (76%).

5      Etapa B

A una solución del éster bencílico del ácido 1-(4'-fluorobifenil-4-sulfonilamino) ciclopantanocáboxílico (23,0 gramos, 50,7 mmol) en DMF seco (500 ml) a temperatura ambiente, se le añadió hexametildisalizida de potasio (12,2 gramos, 61,1 mmol) y, tras 45 minutos, terc-butil-(3-yodopropoxi)dimetilsilano (18,3 gramos, 60,9 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 16 horas. A continuación se añadieron más hexametildisalizida de potasio (3,0 gramos, 15 mmol) y terc-butil-(3-yodopropoxi)dimetilsilano (4,5 gramos, 15 mmol). Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 5 horas más. Se detuvo rápidamente la mezcla mediante la adición de solución saturada de cloruro de amonio. Se eliminó el DMF mediante evaporación bajo vacío. Se capturó el residuo en dietil éter y se lavó sucesivamente con agua, solución acuosa diluida de ácido clorhídrico y salmuera. Tras el secado sobre sulfato de magnesio, se evaporó el dietil éter para dar como resultado un aceite de color amarillo. Se añadió a este hexano y cloruro de metileno para inducir la cristalización del material de partida, que se recuperó mediante filtración. La evaporación de los solventes a partir del filtrado dio como resultado el éster bencílico del ácido 1-[(3-terc-butil-dimetilsilanoloxi)propil)-(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)amino]ciclopantanocáboxílico bruto en forma de aceite de color ámbar (27,35 gramos).

20     Etapa C

A una solución de 1-[(3-terc-butil-dimetilsilanoloxi)propil)-(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)amino]ciclopantanocáboxílico bruto (27,35 gramos) en cloruro de metileno (450 ml) a temperatura ambiente, se le añadió trifluoruro eterato de boro (11 ml, 89,4 mmol). Tras 45 minutos, se detuvo rápidamente la reacción mediante la adición secuencial de solución saturada de cloruro de amonio y agua. Se separó la fase orgánica, se lavó con agua y salmuera y se secó con sulfato de magnesio. La evaporación del solvente bajo vacío proporcionó el éster bencílico del ácido 1-[(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)-(3-hidroxipropil)amino]-ciclopantanocáboxílico bruto en forma de aceite de color ámbar (22,1 gramos).

30     Etapa D

Una solución del éster bencílico del ácido 1-[(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)-(3-hidroxipropil)amino]-ciclopantanocáboxílico bruto (22,1 gramos) en acetona (400 ml) se enfrió en un baño de hielo y se trató con reactivo de Jones (aproximadamente 20 ml) hasta que persistió un color naranja. Se agitó la mezcla entre 0°C y la temperatura ambiente durante 2 horas. Tras detener rápidamente el exceso de oxidante con isopropanol (1 ml), se añadió Celite® y se filtró la mezcla. Se concentró el filtrado bajo vacío. Se capturó el residuo en acetato de etilo, se lavó con agua y salmuera, se secó con sulfato de magnesio y se concentró para dar como resultado el éster bencílico del ácido 1-[(2-carboxietil)-(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)amino]ciclopantanocáboxílico bruto en forma de aceite (21,4 gramos).

40     Etapa E

A una solución del éster bencílico del ácido 1-[(2-carboxietil)-(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)amino]ciclopantanocáboxílico bruto (21,4 gramos) en DMF (500 ml) a temperatura ambiente, se le añadió carbonato de potasio (22,5 gramos, 163 mmol) y yoduro de metilo (3,7 ml, 59,4 mmol). Se agitó la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente y a continuación se concentró bajo vacío. Se capturó el residuo en agua y se acidificó usando solución acuosa de cloruro de hidrógeno 6N. Se extrajo la mezcla resultante con una mezcla de dietil éter y acetato de etilo. Se lavó el extracto orgánico con agua y salmuera, se secó con sulfato de magnesio. Tras la concentración en un aceite ámbar, se aisló el éster bencílico del ácido 1-[(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)-(2-metoxicarboniletíl)amino]-ciclopantanocáboxílico (12,6 gramos), un sólido blanco, mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 15% en hexano.

Etapa F

55     Una solución del éster bencílico del ácido 1-[(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)-(2-metoxicarboniletíl)amino]-ciclopantanocáboxílico (12,1 gramos, 22,4 mmol) en metanol (270 ml) se trató con paladio al 10% sobre carbón activo y se hidrogenó en un agitador Parr® a 3 atmósferas ( $3,039 \times 10^5 \text{ N/m}^2$ ) de presión durante 3,5 horas. Tras la filtración a través de nylon (tamaño de poro  $0,45 \mu\text{m}$ ) para eliminar el catalizador, se evaporó el solvente para dar como resultado el ácido 1-[(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)-(2-metoxicarboniletíl)amino]ciclopantanocáboxílico como una espuma de color blanco (10,1 gramos, 100%).

Etapa G

65     Se añadieron secuencialmente diisopropiletilamina (4,3 ml, 24,6 mmol) y hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris-dimetilamino)fosfonio (11,0 gramos, 24,9 mmol) a una solución de ácido 1-[(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)-(2-metoxicarboniletíl)amino]ciclopantanocáboxílico (10,1 gramos, 22,4 mmol) en N,N-dimetilformamida (170 ml). Se agitó la mezcla durante 4 horas. A continuación se añadieron más diisopropiletilamina (7,8 ml, 44,6 mmol) y clorhidrato de O-bencilhidroxilamina (4,64 gramos, 29,1 mmol) y se agitó la mezcla resultante a 60°C durante 16

horas. Tras concentración bajo vacío, se capturó el residuo en agua y se acidificó con solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N. Se extrajo la mezcla con acetato de etilo y se lavó el extracto secuencialmente con agua, solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y salmuera. Se secó la solución con sulfato de magnesio y se concentró para dar un sólido que tras trituración con 3:1 de hexano/acetato de etilo/cloruro de metileno proporcionó el éster metílico 5 del ácido 3-[(1-benciloxicarbamoilciclopentil)-(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)amino]propiónico en forma de un sólido cristalino de color blanco (10,65 gramos, 86%).

#### Etapa H

10 Se trató una solución de éster metílico del ácido 3-[(1-benciloxicarbamoilciclopentil)-(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)amino]propiónico (10,65 gramos, 19,2 mmol) en metanol (250 ml) con paladio al 5% sobre sulfato de bario y se hidrogenó en un agitador Parr® a 3 atmósferas ( $2,65 \times 10^5 \text{ N/m}^2$ ) de presión durante 3 horas. Tras la filtración a través de nylon (tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ ), para eliminar el catalizador, se evaporó el solvente para dar como resultado el éster metílico del ácido 3-[(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)-(1-hidroxicarbamoilciclopentil)amino]propiónico como una espuma de color blanco (8,9 gramos, 100%).

$^1\text{H RMN}$  (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8,80 (br s, 1H), 7,85-7,75 (m, 6H), 732-725 (m, 2H), 354 (s, 3H), 3,52-3,48 (m, 2H), 2,73-2,69 (m, 2H), 2,24-2,21 (m, 2H), 1,86-1,83 (m, 2H), 1,60-1,40 (m, 4H).

#### Etapa I

20 Se trató una solución del éster metílico del ácido 3-[(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)-(1-hidroxicarbamoilciclopentil)amino]propiónico (8,9 gramos, 19,2 mmol) en metanol (500 ml) con solución acuosa de hidróxido de sodio 1N (95 ml, 95 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 5,5 horas. Se concentró la mezcla para eliminar el metanol, 25 se diluyó con agua, se acidificó con solución acuosa de ácido clorhídrico 6N y se extrajo con acetato de etilo. Tras el lavado con agua y salmuera se secó el extracto orgánico sobre sulfato de magnesio y se concentró para dar como resultado el ácido 3-[(4'-fluorobifenil-4-sulfonil)-(1-hidroxicarbamoilciclopentil)amino]propiónico como una espuma de color blanco que se cristalizó a partir de acetato de etilo (6,74 gramos, 78%). Punto de fusión: 163-164°C.

30  $^1\text{H RMN}$  (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12,30 (br s, 1H), 10,40 (br s, 1H), 7,77 (br s, 1H), 7,89-7,74 (m, 6H), 7,31-7,27 (m, 2H), 3,51-3,44 (m, 2H), 2,64-2,60 (m, 2H), 2,24-2,22 (m, 2H), 1,86-1,83 (m, 2H), 1,60-1,40 (m, 4H). MS 449 (M-1)

#### Ejemplo 6

##### Síntesis del Compuesto 23

35 A una solución agitada del Compuesto 1, tetrafluoroborato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluro-40 nio o TBTU y -N-metilmorfolina en DMF se le añadió tiramina. Se dejó reaccionar la mezcla de reacción durante 24 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte. Se monitorizó la reacción mediante HPLC. Tras la finalización se concentró la solución de color amarillo claro y se secó bajo vacío elevado durante cuatro horas. Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa y dio como resultado un 88% de un sólido de color blanquecino.

45  $^1\text{RMN}$  (DMSO):  $\delta$  10,5 (1H, s, NH); 9,3 (1H, s, NH); 8,8 (1H, s, OH); 8 (1H, s, OH); 7,8 (2H,  $J = 8,8 \text{ Hz}$ , d, Har); 7,3 (2H,  $J = 8 \text{ Hz}$ , t, Har); 7,2 (2H, d,  $J = 8 \text{ Hz}$ , Har); 7,1 (2H,  $J = 8,8 \text{ Hz}$ , d, Har); 7 (2H,  $J = 8,8 \text{ Hz}$ , d, Har); 6,7 (2H,  $J = 8,8 \text{ Hz}$ , d, 2H); 3,4 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 3,1 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 2,7 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,6 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 2,2-1,9 (4H, m, CH<sub>2</sub>); 1,5 (4H, m, CH<sub>2</sub>)

50 MS: (ESI) 586,2 (MH<sup>+</sup>) y 608,2 (MNa<sup>+</sup>)

HPLC: pureza del 98%.

#### Ejemplo 7

##### Síntesis del Compuesto 26

55 A una solución agitada del compuesto 1, hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxy)tripirrolidinofosfonio (PyAOP) y N-metilmorfolina en DMF se le añadió yodoanilina. Se dejó reaccionar la mezcla de reacción durante 3 días a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte. Se monitorizó la reacción mediante HPLC. Tras la finalización, se concentró la solución y se secó bajo vacío elevado durante cuatro horas. Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa y dio como resultado un 21% de sólido.

60 MS: (ESI) 668 (MH<sup>+</sup>) y 690 (MNa<sup>+</sup>)

HPLC: pureza del 100%.

## Ejemplo 8

*Síntesis del Compuesto 24*

## 5 Etapa A

*Preparación de 3-yodotiramina*

10 Se añadió lentamente solución de yodo (1M, 2 ml) a temperatura ambiente a 20 ml de una solución de tiramina (50 mM en amonio al 30%). Tras 5 horas se concentró la solución en 5 ml y se dejó durante la noche a 0°C. Se filtró el precipitado blanquecino formado y se lavó con agua fría. Se secó el sólido durante la noche bajo vacío elevado.

15  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).  $\delta$  2,7 (2H, t,  $J$  = 7 Hz); 2,9 (2H, t,  $J$  = 7 Hz); 6,7 (1H, d,  $J$  = 8,1 Hz); 7,1 (1H, dd,  $J$  = 2,2 Hz, 8 Hz); 7,5 (1H, d,  $J$  = 2,2 Hz).

## Etapa B

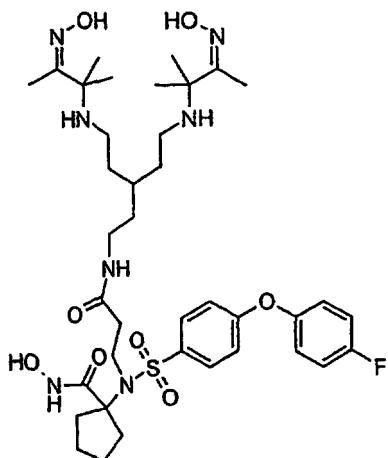
20 A una solución agitada del Compuesto 1, tetrafluoroborato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluro-  
25 nio (TBTU) y N-metilmorfolina en DMF se le añadió 3-yodotiramina (de la Etapa A). Se dejó reaccionar la mezcla de reacción durante 24 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte. Se monitorizó la reacción mediante HPLC. Tras la finalización, se concentró la solución de color amarillo claro y se secó bajo vacío elevado durante cuatro horas. Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa y dio como resultado un 10% de un sólido blanquecino (Compuesto 24).

25 MS (ESI): 712 ( $\text{MH}^+$ ) 734 ( $\text{MNa}^+$ )

## Ejemplo 9

*Síntesis de un quelante-MMPi conjugado (Compuesto 2)*

35



Compuesto 2

40

45

50

55

60

65

55 Se disolvieron el Compuesto 1 (5,1 mg), PyAOP (6,0 mg) y N-metilmorfolina (2  $\mu\text{l}$ ) en dimetilformamida (0,5 ml) y se agitó la mezcla durante 2 minutos. Se añadió el Quelante 1 (3,4 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. Se añadió acetonitrilo al 20%/agua (8 ml) y se purificó el producto usando HPLC preparativa (columna: Phenomenex Luna 10  $\mu\text{C18}$  (2) 250 x 10 mm, detección: 230 nm, solvente A:  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$  al 0,1%, solvente B:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$  al 0,1%, flujo: 5 ml/min, gradiente: 20-60% de B durante 30 min,  $t_{\text{R}}$ : 17 min). Tras la liofilización se obtuvo 1 mg de material puro y se caracterizó mediante LC-MS (columna: Phenomenex Luna 5  $\mu\text{C18}$  (2) 250 x 4,6 mm, detección: 214 nm, solvente A:  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$  al 0,1%, solvente B:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$  al 0,1%, flujo: 1 ml/min, gradiente: 20-60 de B durante 20 min,  $t_{\text{R}}$ : 14,32 min, encontrado m/z: 792,5, esperado  $\text{MH}^+$ : 792,4).

## Ejemplo 10

*Síntesis de un MMPi derivatizado del ligante amino-PEG (Compuesto 4)*

## 5      Etapa (a)

*1,11-diazido-3,6,9-trioxaundecano*

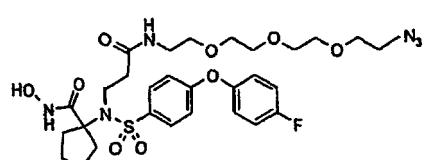
Una solución de tetraetilenglicol seco (19,4 g, 0,100 mol) y cloruro de metanosulfonilo (25,2 g, 0,0220 mol) en THF seco (100 ml) se mantuvo bajo argón y se enfrió a 0°C en un baño de agua con hielo. Se añadió al matraz una solución de trietilamina (22,6 g, 0,220 mol) en THF seco (25 ml) gota a gota durante 45 min. Tras una hora, se retiró el baño de enfriamiento y se continuó la agitación durante 4 h. se añadió agua (60 ml). Se añadió a la mezcla hidrógeno carbonato de sodio (6 g, a pH 8) y azida de sodio (14,3 g, 0,220 mmol), en este orden. Se eliminó el THP mediante destilación y se mantuvo a refljo la solución acuosa durante 24 h (dos capas formadas). Se enfrió la mezcla y se añadió éter (100 ml). Se saturó la fase acuosa con cloruro de sodio. Se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con éter (4 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (2 x 50 ml) y se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ). La filtración y la concentración proporcionaron 22,1 g (91%) de aceite de color amarillo. Se usó el producto en la siguiente etapa sin purificación adicional.

## 20     Etapa (b)

*11-azido-3,6,9-trioxaundecanamina*

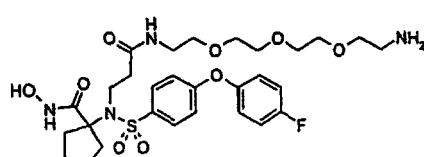
A una suspensión agitada mecánicamente de manera vigorosa de 1,11-diazido-3,6,9-trioxaundecano (20,8 g, 0,085 mol) en ácido clorhídrico al 5% (200 ml) se le añadió una solución de trifenilfosfina (19,9 g, 0,073 mol) en éter (150 ml) durante 3 h a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción durante 24 h más. Se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con diclorometano (3 x 40 ml). Se enfrió la fase acuosa en un baño de agua con hielo y se ajustó el pH hasta circa 12 mediante la adición de KOH. Se extrajo el producto en diclorometano (5 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas ( $\text{MgSO}_4$ ). La filtración y la evaporación proporcionaron 14,0 g (88%) de un aceite de color amarillo. El análisis mediante espectroscopía de masas MALDI-TOF (matriz: ácido  $\square$ -ciano-4hidroxicinámico) proporcionó un pico  $\text{M}+\text{H}$  a 219 tal como se esperaba. La caracterización adicional usando espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) verificó la estructura.

## 35     Etapa (c)

*Síntesis del (Compuesto 1)-PEG(3)- $N_3$* 

45     A una solución del Compuesto 1 (41 mg, 87  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (5 ml) se le añadieron 11-azido-3,6,9-trioxaundecanamina (19 mg, 87  $\mu\text{mol}$ ), HATU (Applied Biosystems, 33 mg, 87  $\mu\text{mol}$ ) y DIEA (Fluka, 30  $\mu\text{l}$ , 174  $\mu\text{mol}$ ). Tras un tiempo de reacción de una hora, se concentró la mezcla y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna C18(2) 5  $\mu\text{m}$  21,2 x 250 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 30-60% de B durante 60 min; flujo 10,0 ml/min, detección UV a 214 nm), proporcionando 33,9 mg (59%) de producto tras la liofilización, análisis mediante LC-MS (columna Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu\text{m}$  50 x 4,60 mm, solventes: A = agua/TEA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 20-100% de B durante 10 min; flujo 1 ml/min, detección UV a 214 nm, ESI-MS) proporcionando un pico a 4,88 min con  $m/z$  667,4 ( $\text{MH}^+$ ) tal como se esperaba.

## 55     Etapa (d)

*Síntesis del Compuesto 4*

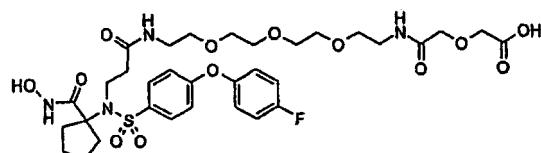
65     **Compuesto 4**

5 A una solución de (Compuesto 1)-PEG(3)-N<sub>3</sub> (4,7 mg, 7  $\mu$ mol) en metanol (4 ml) se le añadió Pd/C (Koch-Light, circa 10 mg). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno (1 atm; 1,015 x 10<sup>5</sup> N/m<sup>2</sup>) durante 10 min. Se filtró la mezcla y se concentró. Análisis mediante LC-MS (columna Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu$ m 50 x 4,60 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 20-100% de B durante 10 min; flujo 1 ml/min, detección UV a 214 nm, ESI-MS) proporcionó un pico a 4,17 min con m/z 641,4 (MH<sup>+</sup>) tal como se esperaba. Se usó el producto directamente en las etapas posteriores sin purificación adicional.

## 10 Ejemplo 11

15 *Síntesis del quelante conjugado con el espaciador PEG(3)-diglicolil (Compuesto 3)*

## Etapa (a)

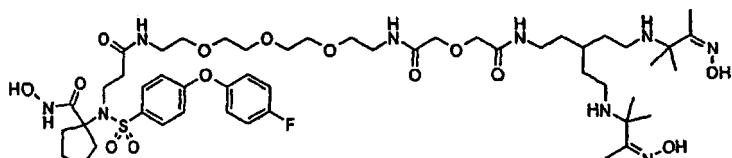
20 *Síntesis del (Compuesto 1)-PEG(3)-ácido diglicólico*

25

30 A una solución del (Compuesto 1)-PEG(3)-NH<sub>2</sub> (Ejemplo 6, 25 mg, 39  $\mu$ mol) en DMF (4 ml) se le añadió anhídrido diglicólico (Acres, 9 mg, 78  $\mu$ mol). Tras agitar durante 1,5 h, se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna C18(2) 5  $\mu$ m 212 x 250 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 20-80% de B durante 60 min; flujo 10,0 ml/min, detección UV a 214 nm), proporcionando 14,9 (51%) de material liofilizado. Se analizó el producto mediante LC-MS (columna Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu$ m 50 x 4,60 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 20-100% de B durante 10 min; flujo 1 ml/min, detección UV a 214 nm, ETS-MS) proporcionando un pico a 4,15 min con m/z 757,3 (MH<sup>+</sup>) que corresponde al producto. Se llevó a cabo la caracterización adicional usando espectroscopía de RMN.

35

## Etapa (b)

40 *Síntesis del Compuesto 3*50 **Compuesto 3**

55

60 A una solución del (Compuesto 1)-PEG(3)-ácido diglicólico (6,6 mg, 9  $\mu$ mol) en DMF (3 ml) se añadieron el Quelante 1 (3,1 mg, 9  $\mu$ mol), HATU (Applied Biosystems, 3,4 mg, 9  $\mu$ mol) y DIEA (Fluka, 3,1  $\mu$ l, 18  $\mu$ mol). Tras 20 min de tiempo de reacción, se concentró la mezcla y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna C18(2) 5  $\mu$ m 21,2 x 250 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 10-80% de B durante 60 min; flujo 10,0 ml/min, detección UV a 214 nm), proporcionando 4,2 mg (23%) de producto liofilizado. Análisis mediante LC-MS (columna Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu$ m 50 x 4,60 nun, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 20-100% de B durante 10 min; flujo 1 ml/min, detección UV a 214 nm, ESI-MS; t<sub>R</sub> = 4,17 min, m/z 1082,5 (MH<sup>+</sup>)) y la espectroscopía de RMN confirmó la estructura.

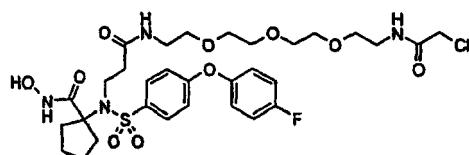
65

## Ejemplo 12

*Síntesis del derivado de cloroacetilo para la formación de imagen mediante PET (Compuesto 5)*

5

10



## Compuesto 5

15 Se añadieron anhídrido cloroacético preparado de nuevo (52 mg, 0,30 mmol) y DIEA (51  $\mu$ l, 0,30 mmol) a una solución del Compuesto 4 (Ejemplo 10 etapa d, circa 0,15 mmol) en DMF (10 ml). Tras 1 h, se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna C18(2) 10  $\mu$ m 50 x 250 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 30-40% de B durante 60 min; flujo 50,0 ml/min, detección UV a 214 nm), proporcionando 25,8 mg (24%) de producto tras la liofilización. Análisis mediante LC-MS (columna Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu$ m 50 x 4,60 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 20-100% de B durante 10 min; flujo 1 ml/min, detección UV a 214 nm, ESI-MS) proporcionó un pico a 6,01 min con m/z 717,5 ( $MH^+$ ) tal como se esperaba.

20

## 25 Ejemplo 13

*Conjugación de 3-fluoropropiltiol en el compuesto cloroacetilado (Compuesto 6)*

30

## Etapa (a)

35

*Síntesis de 3-triethylsulfanil-propan-1-ol[ $Ph_3C-S(CH_2)_3OH$ ]*

Se añadió trifenilmetanol (390,6 mg, 1,5 mmol) en TFA (10 ml) gota a gota a una solución agitada de alcohol 3-mercaptopropílico (129,6  $\mu$ l, 1,5 mmol) en TFA (10 ml). Tras la adición, se evaporó el TFA bajo presión reducida y se purificó de manera inmediata el producto bruto mediante cromatografía preparativa en fase inversa (columna Phenomenex Luna C18, 00G-4253-V0; solventes A = agua/TFA al 0,1% y B =  $CH_3CN/TFA$  al 0,1%; gradiente 70-80% de B durante 60 min; flujo 50 ml/minuto; detección a 254 nm), dando como resultados 372 mg (74%) de compuesto puro. (HPLC analítica: columna Vydac C18, 218TP54; solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B =  $CH_3CN/TFA$  al 0,1%; gradiente 70-80% de B durante 20 min; flujo 1,0 ml/minuto; tiempo de retención 5,4 minutos detectado a 214 y 254 nm). Se verificó la estructura mediante espectroscopía de RMN.

40

## Etapa (b)

45 *Síntesis del éster 3-triethylsulfanil-propílico del ácido metanosulfónico [ $Ph_3C-S(CH_2)_3O-Ms$ ]*

A una solución de 3-triethylsulfanil-propan-1-ol (372,0 mg, 1,11 mmol) en THF (10 ml) se le añadió trietilamina (151,7 mg, 209  $\mu$ l, 1,5 mmol) y cloruro de mesilo (171,9 mg, 116,6  $\mu$ l, 1,5 mmol). Tras un tiempo de reacción de 1 h, se eliminó el precipitado mediante filtración. Se concentró la solución y se purificó el residuo mediante HPLC en fase inversa (columna Phenomenex Luna C18, 00G-4253-V0; solventes A = agua/TFA al 0,1% y B =  $CH_3CN/TFA$  al 0,1%; gradiente 80-100% de B durante 60 min; flujo 50 ml/minuto; detección a 254 nm), dando como resultado 318 mg (69%) de compuesto puro (HPLC analítica: columna Vydac C18, 218TP54; solventes: A = agua/TEA al 0,1% y B =  $CH_3CN/TFA$  al 0,1%; gradiente 60-70% de B durante 20 min; flujo 1,0 ml/minuto; tiempo de retención 18,7 minutos detectado a 214 y 254 nm). Se verificó la estructura mediante espectroscopía de RMN.

55

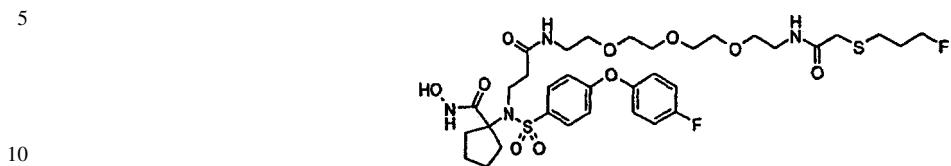
## Etapa (c)

55 *Síntesis de (3-fluoro-propilsulfanil)trifenilmetano [ $Ph_3C-S(CH_2)_3F$ ]*

60 Se disolvieron fluoruro de potasio (1,4 mg, 0,024 mmol) y Kryptofix 222 (9,0 mg, 0,024 mmol) en acetonitrilo (0,2 ml) (calentamiento). Se añadió una solución de éster 3-triethylsulfanil-propílico del ácido metanosulfónico (5 mg, 0,012 mmol) en acetonitrilo (0,2 ml). Se calentó la mezcla de reacción a 80°C durante 90 min. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía preparativa en fase inversa (columna C18 Vydac, 218TP1022; solventes A = agua/TFA al 0,1% y B =  $CH_3CN/TFA$  al 0,1%; gradiente 40-90% de B durante 40 min; flujo 10 ml/minuto; detección a 254 nm). Se obtuvo un resultado de 2 mg (50%) de material purificado (HPLC analítica: columna Phenomenex Luna C18, 00B-4251-E0; solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B =  $CH_3CN/TFA$  al 0,1%; gradiente 40-80% de B durante 10 min; flujo 2,0 ml/minuto; tiempo de retención de 8,2 minutos detectado a 214 y 254 nm). Se confirmó la estructura mediante el análisis de RMN.

### Etapa (d)

### *Síntesis del Compuesto 6*



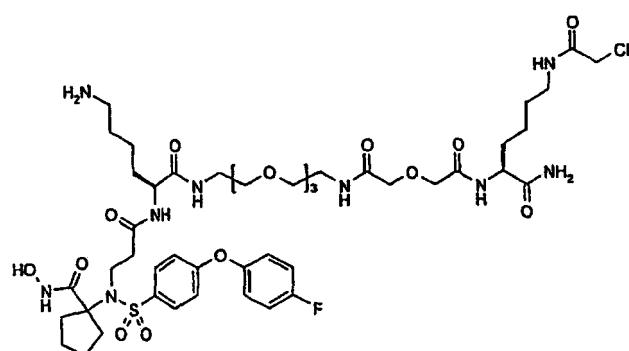
## Compuesto 6

15 Se agitó 3-fluoro-trilisulfanil-propano (1,4 mg, 4  $\mu$ mol) en una mezcla de TFA (50  $\mu$ l) y agua (5  $\mu$ l). Se añadió la mezcla a una solución del Compuesto 5 (1,5 mg, 2  $\mu$ mol) en una mezcla 1:1 de agua y acetonitrilo (800  $\mu$ l). Se ajustó el pH a 10 añadiendo  $K_2CO_3$  acuoso (200  $\mu$ l, 0,5 g/ml) y se calentó la mezcla a 60°C durante 25 min. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna C18(2) 5  $\mu$ m 10,0 x 250 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 30-50% de B durante 60 min; flujo 5,0 ml/min, detección UV a 214 nm), proporcionando 0,9 mg (58%) de producto. Análisis mediante LC-MS (columna Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu$ m 50 x 4,60 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 10-80% de B durante 10 min; flujo 1 ml/min, detección UV a 214 nm, ESI-MS;  $t_R$  = 6,25 min, m/z 775,4 ( $M^+$ ) confirmó la estructura.

## 25 Ejemplo 14

## Derivados cloroacetilados, de aminoácido y PEG para formación de imagen mediante PET (Compuestos 7 a 22)

[Compuesto 1]-Lys-Peg(4)-Diglicolil-Lys(cloroacetil)-NH<sub>2</sub> (Compuesto 7)



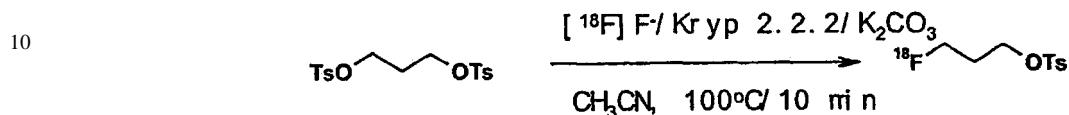
### Compuesto 7

Se sintetizó el compuesto 7 usando un equipo manual de burbujeo de nitrógeno en una escala de 0,05 mmol usando la resina MBHA de la amida de Rink protegida con F-moc (Novabiochem), Fmoc-Lys(Dde)-OH (Novabiochem), Fmoc-Lys(Boc)-OH (Novabiochem), ácido Fmoc-amino-PEG-diglicólico (Polypure AS) y CP-471358 (Pfizer). Se acoplaron todos los aminoácidos y CP-471358 usando HATU/DIEA como reactivos de acoplamiento. Se analizaron las etapas de la reacción mediante el ensayo de Kaiser. Tras el acoplamiento de la cadena secundaria del compuesto CP se rompió el grupo Dde de la lisina C terminal mediante tratamiento estándar con hidracina. Se acopló el ácido cloroacético (Fluka) mediante anhídrido simétrico preparado de nuevo. Se llevó a cabo la eliminación simultánea de producto de la resina y la rotura del grupo protector Boc de la cadena secundaria en TFA que contenía H<sub>2</sub>O al 2,5% y triisopropilsilano al 2,5% durante 2 horas. Se precipitó el material bruto a partir del éter y se purificó mediante HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna C18(2) 10  $\mu$ m 250 x 10 mm; solventes A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 20-40% de B durante 60 min; flujo 5,0 ml/min; detección UV a 214 nm) para dar 5,0 mg de un sólido de color blanco.

El análisis mediante LC-MS (columna Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu$ m 2,0 x 50 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 10-80% de B durante 10 min; flujo 0,3 ml/min, detección UV a 214 y 254 nm, ESI-MS modo positivo) proporcionó un pico a 5,9 min con m/z 1088 tal como se esperaba para  $\text{MH}^+$ .

Usando la metodología de la síntesis de péptidos en fase sólida, se prepararon los Compuestos 8 a 22 de la misma manera y se caracterizaron mediante MS.

## Ejemplo 15

Síntesis del derivado marcado con  $^{18}\text{F}$  para N-alquilación5 Síntesis del 3- $[^{18}\text{F}]$ fluoropropil tosilato

15

Se transfirieron mediante una llave de dos vías Kryptofix 222 (10 mg) en acetonitrilo (300  $\mu\text{l}$ ) y carbonato de potasio (4 mg) en agua (300  $\mu\text{l}$ ), preparado en un vial de vidrio, usando una jeringa de plástico (1 ml) en un vaso de precipitados de vidrio al carbono introducido en un calentador de latón. Se añadió a continuación  $^{18}\text{F}$ -fluoruro (185-370 MBq) en el agua objetivo (0,5-2 ml) mediante la llave de dos vías. Se ajustó el calefactor a 125°C y se puso en marcha el cronómetro. 15 min después se añadieron 3 alícuotas de acetonitrilo (0,5 ml) en intervalos de 1 min. El  $^{18}\text{F}$ -fluoruro se secó tras un total de 40 min. Tras 40 min, el calefactor se enfrió con aire comprimido, se abrió la tapa del bote y se añadieron 1,3-propanodiol-di-p-tosilato (15-12 mg) y acetonitrilo (1 ml). Se volvió a colocar la tapa del bote y se cerraron las tubuladuras con tapones. Se ajustó el calefactor a 100°C y se marcó a 100°C/10 min. Tras el marcado, se aisló el tosilato de 3- $[^{18}\text{F}]$  fluoropropilo mediante HPLC en fase inversa de Gilson usando las siguientes condiciones:

Columna	u-bondapak C18 7,8 x 300 mm
30 Eluyente	Agua (bomba A): acetonitrilo (bomba B)
Tamaño del bucle	1 ml
Velocidad de la bomba	4 ml/min
35 Longitud de onda	254 nm
Gradiente	Eluyente B 5-90% durante 20 min
40 TR del producto	12 min

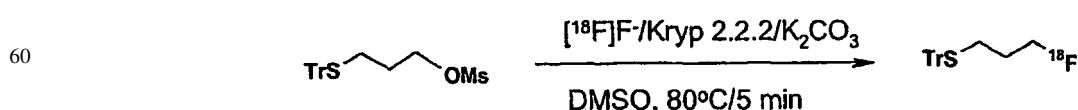
Una vez aislada la muestra de corte (circa 10 ml), se diluyó con agua (10 ml) y se llevó a una columna acondicionada C18 sep pak. La sep pak se secó con nitrógeno durante 15 min, y se lavó con un solvente orgánico, piridina (2 ml), acetonitrilo (2 ml) o DMF (2 ml). Se eliminó aproximadamente el 99% de la actividad.

45 El tosilato de 3- $[^{18}\text{F}]$  fluoropropilo se usó para N-alquilar aminas mediante reflujo en piridina.

## Ejemplo 16

50 Derivado de  $[^{18}\text{F}]$ -tiol para S-alquilación

## Etapa (a)

55 Preparación de 3- $[^{18}\text{F}]$ fluoro-triethylsulfanil-propano

65

Se transfirieron mediante una llave de dos vías Kryptofix 222 (10 mg) en acetonitrilo (800  $\mu\text{l}$ ) y carbonato de potasio (1 mg) en agua (50  $\mu\text{l}$ ), preparado en un vial de vidrio, usando una jeringa de plástico (1 ml) en un vaso de precipitados de vidrio al carbono introducido en un calentador de latón. Se añadió también a continuación  $^{18}\text{F}$ -fluoruro

# ES 2 299 884 T3

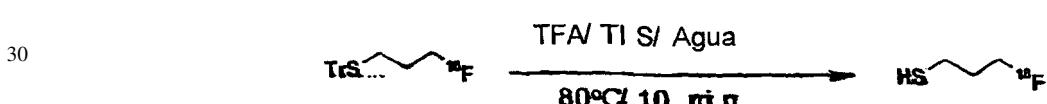
(185-370 MBq) en el agua objetivo (0,5-2 ml) mediante la llave de dos vías. Se ajustó el calefactor a 125°C y se puso en marcha el cronómetro. 15 min después se añadieron 3 alícuotas de acetonitrilo (0,5 ml) en intervalos de 1 min. El <sup>18</sup>F-fluoruro se secó tras un total de 40 min. Tras 40 min, el calefactor se enfrió con aire comprimido, se abrió la tapa del bote y se añadieron trimetil-(3-tritilsulfanilpropoxi)silano (1-2 mg) y DMSO (0,2 ml). Se volvió a colocar la tapa del bote y se cerraron las tubuladuras con tapones. Se ajustó el calefactor a 80°C y se marcó a 80°C/5 min. Tras el marcado, se analizó la mezcla de reacción mediante HPLC en fase inversa usando las siguientes condiciones:

Columna	u-bondapak C18 7,8 x 300 mm
10 Eluyente	TFA al 0,1%/agua (bomba A): TFA al 0,1%/acetonitrilo (bomba B)
Tamaño del bucle	100 $\mu$ l
15 Velocidad de la bomba	4 ml/min
Longitud de onda	254 nm
Gradiente	1 min 15 min 5 min 40% B 40-80% B 80% B

20 Se diluyó la mezcla de reacción con DMSO/agua (1:1 v/v, 0,15 ml) y se cargó en una sep-pak acondicionada t-C18. Se lavó el cartucho con agua (10 ml), se secó con nitrógeno y se eluyó 3-[<sup>18</sup>F] fluoro-1-tritilsulfanil-propano con 4 alícuotas de acetonitrilo (0,5 ml por alícuota).

25 Etapa (b)

Preparación de 3-[<sup>18</sup>F] fluoro-propano-1-tiol



35 Se evaporó hasta sequedad una solución de 3-[<sup>18</sup>F] fluoro-1-tritilsulfanil-propano en acetonitrilo (1-2 ml) usando una corriente de nitrógeno a 100°C/10 min. Se añadió una mezcla de TFA (0,05 ml), triisopropilsilano (0,01 ml) y agua (0,01 ml) seguido por un calentamiento a 80°C/10 min para producir 3-[<sup>18</sup>F] fluoro-propano-tiol.

40 Etapa (c)

Reacción con precursores -N(CO)CH<sub>2</sub>Cl

45 Un procedimiento general para marcar un precursor de cloroacetilo es enfriar el vaso de precipitados que contiene el 3-[<sup>18</sup>F] fluoro-1-mercaptopropano de la Etapa (b) con aire comprimido, y a continuación añadir amonio (27% en agua, 0,1 ml) y el precursor (1 mg) en agua (0,05 ml). Se calentó la mezcla a 80°C/10 min.

Ejemplo 17

50 Síntesis de los Compuestos 45-48

Etapa (a)

Síntesis de precursores aminooxi

55 Se sintetizaron los compuestos 45 y 47 usando un equipo manual burbujeador de nitrógeno en una escala 0,2 mmol comenzando con la resina MBHA de amida de Rink protegida con F-moc (Novabiochem). Se adquirieron los aminoácidos Fmoc de Novabiochem y los aminoácidos Fmoc-PEG monodispersados de Polypure AS. Se adquirió el ácido Boc-(aminooxi) acético de Fluka. Tras la ligadura de Dde-Lys(Fmoc)-OH con la resina, se rompió la cadena secundaria del grupo Fmoc seguido por el acoplamiento del ácido Boc(aminooxi) acético. Se rompió el grupo Dde mediante tratamiento estándar con hidracina. Se acopló la lisina usando HATU/DIEA mientras que se usó PyAOP/DIEA para todos los otros acoplamientos. Se eliminaron los grupos O-acetilo de la glucosa mediante reacción con metóxido de sodio en metanol antes de romper el material separando el soporte sólido. Se llevó a cabo la eliminación simultánea de producto a partir de la resina y la rotura de los grupos protectores de cadena secundaria en TFA que contenía H<sub>2</sub>O al 2,5% y tripropilsilano al 2,5% durante 1-2 horas. Se purificó el material bruto mediante HPLC preparativa 8columna Phenomenex Luna C18(2) 5  $\mu$  21,2 x 250 mm; solventes A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiante adecuado durante 60 min; flujo 10,0 ml/min; detección UV a 214 nm) para dar unos sólidos de color blanco o

## ES 2 299 884 T3

viscosos, aceites incoloros tras la liofilización. Se confirmó la identidad de los productos mediante el análisis de LC-MS (columna Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu$  2,0 x 50 mm, solventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente adecuado durante 10 min; flujo 0,3 ml/min, detección UV a 214 y 254 nm, ESI-MS en modo positivo).

5      Etapa (b)

### *Conjugación para dar los Compuestos 46 y 48 de flúor no radioactivo*

10     Se adquirieron 4-fluorobenzaldehído y 4-(3-fluoropropoxi)benzaldehído de Fluka y Fluorochem, de manera respectiva. A una solución de precursor aminooxi (circa 5  $\mu$ mol) procedente de a) en acetonitrilo al 20% (3 ml) se le añadió aldehído (5 veces en exceso). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min y se concentró. Se purificó el producto y se analizó tal como en la etapa (a) anterior.

15     Ejemplo 18

### *Ensayo in vitro de inhibición de la metaloproteinasa*

20     Se seleccionaron los compuestos usando los siguientes kits de ensayo Biomol comercialmente disponibles:

20     Kit de ensayo colorimétrico MMP-1 - Número de catálogo AK-404,

25     Kit de ensayo colorimétrico MMP-2 - Número de catálogo AK-408,

25     Kit de ensayo colorimétrico MMP-8 - Número de catálogo AK-414,

30     Kit de ensayo colorimétrico MMP-9 - Número de catálogo AK-410,

30     Kit de ensayo colorimétrico MMP-12 - Número de catálogo AK-402,

35     Que están disponibles de Affiniti Research Products Ltd. (Palatine House, Matford Court, Exeter, EX2 8NL, Reino Unido).

#### *(a) Preparación del compuesto de ensayo*

35     Se proporcionaron inhibidores en forma de polvo, y se almacenaron a 4°C. Para cada inhibidor se preparó una solución stock 1 mM en DMSO, se dispensó en alícuotas de 20  $\mu$ l, y se almacenaron estas alícuotas a -20°C. Se diluyó la solución stock para dar 8 concentraciones de inhibidor (recomendadas: 50  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 500 nM, 50 nM, 5 nM, 500 pM, 50 pM y 5 pM). Se llevaron a cabo las diluciones en el tampón de ensayo del kit. Se lleva a cabo una dilución en cinco veces de los stocks del inhibidor en la adición a los pocillos de ensayo, por tanto, el intervalo final de la concentración fue de 10  $\mu$ M a 1 pM.

#### *(b) Procedimiento experimental*

45     Se proporcionan los detalles con el kit comercial, pero se pueden resumir como sigue:

45     - Preparar las diluciones del compuesto de ensayo tal como anteriormente,

50     - Añadir el tampón de ensayo a la placa,

50     - Añadir los compuestos de ensayo a la placa

55     - Preparar el inhibidor NNGH del kit estándar (véase el kit para el factor de dilución)

55     - Añadir el NNGH para controlar los pocillos del inhibidor

60     - Preparar el enzima MMP (véase el kit para el factor de dilución)

60     - Añadir MMP a la placa

65     - Incubar la placa a 37°C durante ~ 15 min

65     - Preparar el sustrato de tiopeptólido (véase el kit para el factor de dilución)

65     - Añadir el sustrato a la placa

70     - Contar cada 2 min durante 1 h, 37°C, 414 nm en un lector de placas Labsystems iEMS (para MNM-1 contar cada 30 segundos durante 20 minutos).

# ES 2 299 884 T3

## (c) Resultados

En la Tabla 1 se relacionan los resultados:

5

TABLA 1

Compuesto	MMP-1 (Ki)	MMP-2 (Ki)	MMP-8 (Ki)	MMP-9 (Ki)	MMP-12 (Ki)
20	-	0,15 ± 0,06 nM (n = 2)	-	0,043 ± 0,02 nM (n = 2)	0,11 nM
21	194,9 nM	1,15 ± 0,15 nM (n = 3)	0,87 nM	0,820 ± 0,049 (n = 3)	-
24	4948,5 ± 2684,9 nM (n = 2)	0,14 ± 0,06 nM (n = 3)	3,93 nM	0,58 ± 0,3 nM (n = 3)	0,67 ± 0,14 nM (n = 2)
32	330 nM	0,62 ± 0,15 nM (n = 4)	2,17 nM	0,37 ± 0,092 nM (n = 4)	0,089 ± 0,21 nM (n = 2)
38	-	1,25 ± 0,28 nM (n = 3)	-	0,99 ± 0,40 nM (n = 3)	0,05 nM
42	-	2,190 ± 1,510 nM (n = 2)	-	0,585 ± 0,175 nM (n = 2)	-
44	-	0,25 ± 0,12 nM (n = 3)	-	0,076 ± 0,047 nM (n = 2)	-
46	171,7 ± 25,0 nM (n = 2)	1,96 ± 1,0 nM (n = 3)	0,52 nM	0,44 ± 0,177 nM (n = 3)	0,17 nM
48	33,3 nM	-	0,50 nM	0,2 nM	-

40

## Ejemplo 19

45

### *Radiomarcado con <sup>99m</sup>Tc (procedimiento general)*

Se prepararon los complejos <sup>99m</sup>Tc añadiendo lo siguiente a un vial P46 purgado con nitrógeno:

50

1 ml de MeOH purgado con N<sub>2</sub>,

55

100 µg del ligando-MMPi conjugado en 100 µl de MeOH,

55

0,5 ml de tampón Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,2),

60

0,5 ml de TcO<sub>4</sub> a partir del generador Tc,

0,1 ml de solución de SnCl<sub>2</sub>/MDP

(solución que contenía 10,2 mg de SnCl<sub>2</sub> y 101 mg de ácido metilendifosfónico en 100 ml de solución salina purgada con N<sub>2</sub>).

Se usó ITLC (cromatografía instantánea en capa fina) para determinar RCP. Las placas SG y una fase móvil de MeOH/(NH<sub>4</sub>OAc 0,1 M) 1:1 muestran RHT (Tc hidrolizada reducida) en el origen, el pertecnetato en el frente del solvente y los complejos de tecnetio en una Rf intermedia.

65

# ES 2 299 884 T3

## Ejemplo 20

### *Procedimiento general para la radioyodación electrófila de los precursores*

5 Se marcaron todos los precursores de acuerdo con el siguiente procedimiento:

10 Se añadieron 10  $\mu$ l de Na<sup>127</sup>I 0,1 mM (en NaOH 0,01 M, 1 x 10<sup>-9</sup> mol) a un vial que contenía 200  $\mu$ l de tampón NH<sub>4</sub>OAc 0,2 M (pH 4). Se añadió esta mezcla a un vial que contenía Na<sup>123</sup>I (25  $\mu$ l en NaOH 0,05 M, circa 500 MBq). A continuación se transfirió la solución combinada a un vial de plástico silanizado. Se añadieron 5  $\mu$ l (2,5 x 10<sup>-8</sup> mol) de una solución de ácido peracético preparada de nuevo en agua (aproximadamente 5 mM) al vial de reacción. Finalmente, se añadió el precursor (34  $\mu$ l de una solución 3 mM en MeOH) al vial de reacción y se dejó reposar la solución durante 3 min.

15 Se purificaron los compuestos mediante HPLC.

### *Procedimiento HPLC*

20 Solvente A:

TFA al 0,1% en agua

Solvente B:

TFA al 0,1% en MeCN

Columna:

Phenomenex Luna 5  $\mu$ m C18(2) 150 x 4,6 mm

### *Gradiente*

	Tiempo	% de B
25	0,0	30
	20,0	70
30	20,20	100
	23,20	100
	23,70	30
	30,0	30

35

TABLA 2

### *Tiempos de retención de HPLC de los compuestos radioyodados*

	<b>Precursor</b>	<b>Nombre del producto</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
40	Compuesto 23	Compuesto 24A	15,6
45	Compuesto 19	Compuesto 21A	7,6
	Compuesto 20	Compuesto 20A	9,4
50	Compuesto 31	Compuesto 30A	9,1

## Ejemplo 21

55 *Síntesis de derivados marcados con 18F: Compuestos 46B y 48B*

Etapa (a)

### *4-18F-benzaldehído*

60 A un vaso de precipitados de vidrio al carbono de fondo plano (4 ml) se le añadieron Kryptofix 222 (5 mg) en acetonitrilo (800  $\mu$ l) y carbonato de potasio [13,5 mg/ml (H<sub>2</sub>O), circa 0,1 M] (50  $\mu$ l). Se colocó el vaso en un calefactor de latón y se cerró la tapa del vaso de precipitados con 3 líneas de PTFE. Se equipó la línea 1 con una llave de 2 vías, se conectó la línea 2 a un vial para residuos y se dejó vacía la línea 3. El montaje experimental se colocó detrás de una pared de plomo. Se añadió el <sup>18</sup>F-fluoruro contenido en el agua objetivo del ciclotrón (370-740 MBq; 0,5-2 ml) a través de una llave de dos vías. Se conectó la línea de N<sub>2</sub> a una llave de 2 vías y se ajustó el calefactor a 110°C. A los 10 min después de que se hubiera comenzado el calentamiento, se retiró la línea de N<sub>2</sub> y se añadió una alícuota de acetonitrilo (0,5 ml). Se repitió este proceso a circa 10,5 y 11 min después que hubiera comenzado el calentamiento.

## ES 2 299 884 T3

Tras cada adición de acetonitrilo se volvió a conectar la línea de N<sub>2</sub> a la llave de 2 vías. Se conectó una segunda línea de nitrógeno a la línea 3 destapada, para lavar cualquier líquido presente en esta línea. Se secó el <sup>18</sup>F-fluoruro hasta 30 min en total. Tras 30 min, se enfrió el calefactor con aire comprimido, se retiro la tapa del vaso de precipitados y se añadió 4-(trimetilamonio)benzaldehído trifluorometano sulfonato [preparado mediante el procedimiento de Poethko 5 y col, J. Nucl. Med., 45(5) p 892-902 (2004); 0,5-0,8 mg; 0,0016-0,0026 mmol] en DMSO (1000  $\mu$ l). Se quitaron los tapones de las 3 líneas PTFE. Se calentó el vaso de precipitados a 90°C/15 min para dar como resultado 4-<sup>18</sup>F-benzaldehído (rendimiento típico de la incorporación circa 50%). Se usó el producto bruto sin purificación adicional

### 10 Etapa (b)

#### 15 *Procedimiento de conjugación*

El Compuesto 45 (2 mg, 0,003 mmol) o el Compuesto 47 (4 mg, 0,002 mmol) disuelto en tampón de ácido cítrico/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [500  $\mu$ l, preparado mezclando 809  $\mu$ l de una solución acuosa de ácido cítrico 0,1 M con 110  $\mu$ l de una solución acuosa 0,2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhídrico] se añadieron directamente al 4-<sup>18</sup>F-benzaldehído (bruto) de la Etapa 15 (a). Se calentó el vaso de precipitados a 70°C/15 min para dar como resultado el Compuesto 46B o 48B bruto.

### 20 Etapa (c)

#### 25 *Procedimiento de trabajo y formulación*

Se diluyó la mezcla de reacción completa de la etapa (b) con agua hasta un volumen de circa 20 ml y se cargó en una sep pak t-C18 acondicionada [acondicionada con DMSO (5 ml) seguido con agua (10 ml)]. La sep t-c18 cargada se lavó posteriormente con agua (2 x 25 ml) seguido con DMSO (3 x 5 ml). Los lavados de DMSO combinados, que 25 contenían los productos deseados, se purificaron usando el sistema de HPLC preparativa en fase inversa:

Columna	Luna C18(2) 10 x 100 mm (5 $\mu$ )
Eluyente	Agua (bomba A): Acetonitrilo (bomba B)
Tamaño del bucle	2 ml
Caudal	3 ml/min
Longitud de onda	254 nm

Los tiempos de retención típicos para el Compuesto 46B o 48B en la columna preparativa fueron de 23 y 21 min de manera respectiva. El pico separado mediante HPLC se diluyó con agua hasta un volumen de circa 20 ml y se cargó sobre una sep pak t-C18 acondicionada [acondicionada con etanol (5 ml) seguido con agua (10 ml)]. La sep pak t-C18 40 cargada se lavó posteriormente con agua (1 x 5 ml) seguido con etanol (3 x 0,2 ml, 1 x 0,4 ml). El lavado de etanol combinado, que contenía los productos deseados, se evaporó hasta un volumen de circa 0,1 ml y se formuló para circa 10% de etanol con solución salina tamponada con fosfato (PBS, 1 ml). El pH de los compuestos formulados fue circa 7.

### 45 Ejemplo 22

#### *Estabilidad en plasma e in vivo del derivado radioyodado con <sup>123</sup>I del Compuesto 2 (Compuesto 24A)*

Se llevaron a cabo estudios de estabilidad en plasma e *in vivo* con el Compuesto 24A para determinar la estabilidad 50 y el metabolismo del compuesto. La estabilidad en plasma de rata *in vitro* demostró una buena estabilidad, con el RCP del compuesto padre cambiando entre 93% y 80%, a lo largo de las 2 horas de incubación a 37°C.

Los estudios *in vivo* en la rata mostraron una ligera inestabilidad y el metabolismo a lo largo del tiempo *in vivo*. 55 Únicamente pudieron ser analizados el plasma y las muestras de bilis debido a la insuficiente radioactividad dentro de la orina. Se observó un aumento en la cantidad de ioduro libre en las muestras de plasma a lo largo del tiempo, pero únicamente estuvo presente una pequeña cantidad de la actividad total inyectada. Se detectó un metabolito en las muestras de plasma y 4 en las muestras de bilis, indicando que también se producía el metabolismo.

### 60 Ejemplo 23

#### *Biodistribución de un derivado radioyodado (Compuesto 24A) en un modelo de tumor LLC in vivo*

Se inyectaron 1 x 10<sup>6</sup> células de Lewis de carcinoma de pulmón (LLC) por vía subcutánea en el muslo derecho interno de ratones C57BL/6. Se dejaron crecer los tumores durante 15 días antes de llevarse a cabo la biodistribución. 65 Este modelo ha mostrado los niveles de expresión de las gelatinasas (MMP-2) y colagenasas (MMP-1 y 8) activas [Bae y col Drugs Exp Clin Res, 29(1):15-23 (2003)].

# ES 2 299 884 T3

## Resultados

Se llevaron a cabo los estudios de biodistribución en el modelo tumoral LLC. El compuesto 24A se aclaró inicialmente muy rápidamente de la sangre y se excretó principalmente a través del sistema hepatobiliar (HBS). Se observó alguna retención dentro del tejido tumoral, con baja captación de fondo del tejido. En la Tabla 3 a continuación, se proporciona un resumen de los resultados:

10

TABLA 3

*Biodistribución de Compuestos marcados con  $^{123}\text{I}$  en un modelo de tumor LLC*

15

	Tiempo después de la inyección (minutos)							
	5		30		60		120	
	Promedio	STD	Promedio	STD	Promedio	STD	Promedio	STD
<b>Compuesto 24A</b>								
% de DI urinaria	7,17	0,36	6,89	1,44	5,5	2,19	7,22	0,86
% de DI/g tumoral	0,6	0,18	0,56	0,12	0,48	0,06	0,6	0,07
Tumor / Sangre	0,32	0,07	0,59	0,19	0,46	0,05	0,66	0,19
Tumor / Músculo	1,19	0,12	1,6	0,14	1,41	0,43	1,87	0,94
Tumor / Pulmón	0,22	0,06	0,39	0,06	0,37	0,26	0,85	0,28
Tumor / Corazón	0,27	0,04	0,57	0,12	0,68	0,07	1,23	0,26
<b>Compuesto 44A</b>								
% de DI urinaria	3,94	0,04	5,85	2,22	6,36	1,16	9,42	2,37
% de DI/g tumoral	1,14	0,21	0,5	0,02	0,66	0,12	0,53	0,1
Tumor / Sangre	0,41	0,15	0,38	0,13	0,42	0,12	0,43	0,06
Tumor / Músculo	1,91	1,24	1,57	0,14	2,3	0,16	2,8	0,71
Tumor / Pulmón	0,49	0,16	0,54	0,11	0,69	0,16	0,72	0,16
Tumor / Corazón	0,86	0,46	0,870	0,320	0,940	0,240	1,060	0,140
<b>Compuesto 32A</b>								
% de DI urinaria	9,82	4,99	35,20	4,08	54,06	7,63	64,10	7,29
% de DI/g tumoral	2,58	0,27	2,67	0,43	2,03	0,37	1,34	0,25
Tumor / Sangre	0,16	0,05	0,26	0,03	0,43	0,05	0,53	0,11
Tumor / Músculo	1,66	0,43	2,80	0,68	4,88	2,10	3,92	0,60
Tumor / Pulmón	0,30	0,05	0,43	0,09	0,69	0,18	0,55	0,18
Tumor / Corazón	0,48	0,15	0,75	0,15	1,31	0,15	1,54	0,37
<b>Compuesto 38A</b>								
% de DI urinaria	6,37	0,26	40,17	8,53	68,53	5,54	78,75	1,69
% de DI/g tumoral	2,08	0,38	2,14	0,37	1,06	0,35	0,42	0,10
Tumor / Sangre	0,13	0,03	0,30	0,01	0,45	0,08	0,52	0,15
Tumor / Músculo	1,22	0,18	2,19	0,27	2,27	0,58	1,82	0,52
Tumor / Pulmón	0,33	0,09	0,73	0,09	0,83	0,12	0,64	0,18
Tumor / Corazón	0,29	0,02	0,90	0,12	1,25	0,52	1,14	0,15
<b>Compuesto 42A</b>								
% de DI urinaria	6,89	0,43	16,89	2,47	31,69	3,61	48,07	3,27
% de DI/g tumoral	2,26	0,46	2,67	0,37	2,35	0,40	1,29	0,24
Tumor / Sangre	0,26	0,04	0,54	0,07	0,66	0,02	0,56	0,05

65

# ES 2 299 884 T3

TABLA 3 (continuación)

<b>Compuesto 42A</b>								
<b>Tumor / Músculo</b>	1,46	0,22	3,22	0,09	3,52	0,54	2,51	0,87
<b>Tumor / Pulmón</b>	0,26	0,05	0,57	0,03	0,74	0,08	0,60	0,04
<b>Tumor / Corazón</b>	0,47	0,13	1,24	0,10	1,49	0,21	1,49	0,42
<b>Compuesto 21A</b>								
<b>% de DI urinaria</b>	5,62	1,75	26,73	3,14	39,99	3,28	52,08	3,70
<b>% de DI/g tumoral</b>	1,64	0,29	2,20	0,32	1,97	0,16	1,60	0,14
<b>Tumor / Sangre</b>	0,13	0,02	0,33	0,04	0,40	0,02	0,37	0,02
<b>Tumor / Músculo</b>	0,92	0,11	1,72	0,35	2,30	0,20	2,44	0,07
<b>Tumor / Pulmón</b>	0,28	0,01	0,65	0,10	0,66	0,06	0,61	0,04
<b>Tumor / Corazón</b>	0,30	0,03	0,83	0,09	1,14	0,03	0,91	0,05

en el que: STD = desviación estándar, DI = dosis inyectada y Urinaria = excreción urinaria.

## Ejemplo 24

### *Biodistribución de derivados marcados con <sup>18</sup>F (Compuestos 46B y 48B) en un modelo de tumor *in vivo**

Se llevó a cabo la biodistribución en el modelo de tumor LLC del Ejemplo 23 con los Compuestos 46B y 48B. Se proporciona a continuación un resumen de los resultados:

TABLA 4

### *Biodistribución de compuestos marcados con <sup>18</sup>F en el modelo LLC *in vivo**

	<b>Tiempo después de la inyección (minutos)</b>							
	5		30		60		120	
	Promedio	STD	Promedio	STD	Promedio	STD	Promedio	STD
<b>Compuesto 46B</b>								
<b>% de DI urinaria</b>	6,60	4,24	12,00	4,17	15,02	3,11	19,68	4,54
<b>% de DI/g tumoral</b>	0,42	0,17	0,53	0,21	0,32	0,26	0,31	0,21
<b>Tumor / Sangre</b>	0,18	0,05	0,47	0,24	0,73	0,54	0,73	0,51
<b>Tumor / Músculo</b>	1,16	0,12	2,06	0,63	2,02	1,10	1,81	1,00
<b>Tumor / Pulmón</b>	0,21	0,09	0,55	0,21	0,60	0,53	0,80	0,79
<b>Tumor / Corazón</b>	0,37	0,11	1,15	0,33	1,54	1,12	1,33	1,02
<b>Compuesto 48B</b>								
<b>% de DI urinaria</b>	0,24	0,08	15,29	6,90	56,89	14,89	59,33	10,10
<b>% de DI/g tumoral</b>	2,53	0,52	2,33	0,08	1,81	0,63	1,62	0,18
<b>Tumor / Sangre</b>	0,11	1,45	0,24	0,02	0,51	0,33	0,41	0,49
<b>Tumor / Músculo</b>	1,55	1,45	2,92	0,79	4,40	5,59	3,55	1,25
<b>Tumor / Pulmón</b>	0,26	0,18	0,47	0,10	0,95	0,93	0,77	0,44
<b>Tumor / Corazón</b>	0,40	0,40	0,84	0,09	1,69	1,20	1,52	0,83

en el que: STD = desviación estándar, DI = dosis inyectada y Urinaria = excreción urinaria.

## Ejemplo 25

### *Biodistribución de Compuestos marcados con <sup>123</sup>I y <sup>18</sup>F en un modelo de aterosclerosis *in vivo**

#### *Modelo de ligadura ApoE*

Los ratones ApoE *-/-*. Son ratones knock-out transgénicos, que carecen del gen ApoE, y son por tanto incapaces de regular sus niveles de colesterol en plasma. Como consecuencia, los ratones ApoE desarrollan lesiones ateroscleróticas

# ES 2 299 884 T3

cas, un proceso que se acelera con una dieta alimenticia rica en grasas. Se puede conseguir la aceleración adicional del desarrollo de la enfermedad ligando la arteria carótida, dando como resultado el avance de la formación de la lesión en el intervalo comprendido dentro de las 4 semanas de la cirugía y la dieta alimenticia rica en grasas. Se ha demostrado que este modelo tiene niveles de remodelación tisular, con una elevada expresión del macrófago y MMP, y se describe por Ivan y col [Circulation, 105, 2686-2691 (2002)].

Se han usado dos controles para estos experimentos: (1) los animales simulan ApoE en el que los ratones experimentan la misma intervención quirúrgica pero la sutura se pasa sólo por detrás de la carótida y a se retira a continuación y, (2) los animales C57BL/6 ligados que experimentan la misma ligadura quirúrgica y una alimentación rica en grasas tal como la de los ratones ApoE ligados. Los informes de la bibliografía han establecido que estos animales tienen algún nivel de remodelación del tejido, pero niveles menos activos de MMP [Ivan y col, Circulation, 105, 2686-2691 (2002)].

En la Tabla 4 se proporcionan los resultados:

15

TABLA 4

*Biodistribución de los Compuestos marcados con <sup>123</sup>I y <sup>18</sup>F en el modelo ApoE*

20

		ApoE ligado				ApoE simulado	
Tiempo después de la inyección							
	5		60			60	
	Promedio	STD	Promedio	STD		Promedio	STD
Compuesto 24A							
% de DI/G Carótida	2,67	1,11	2,00	0,83		0,25	0,28
Carótida / Sangre	0,94	0,22	1,97	0,99		0,19	0,21
Carótida / Pulmón	0,62	0,16	1,71	0,77		0,17	0,18
Carótida / Corazón	0,48	0,12	1,03	0,72		0,21	0,2
Compuesto 32A							
% de DI/G Carótida	10,32	2,51	10,85	2,21		2,91	1,08
Carótida / Sangre	0,46	0,18	1,21	0,28		0,69	0,59
Carótida / Pulmón	1,01	0,47	1,45	0,70		0,70	0,04
Carótida / Corazón	1,39	0,67	3,94	0,92		1,28	0,49
Compuesto 46B							
% de DI/G Carótida	0,88	0,31	0,44	0,13		-	-
Carótida / Sangre	0,42	0,16	0,61	0,40		-	-
Carótida / Pulmón	0,35	0,00	0,53	0,44		-	-
Carótida / Corazón	0,49	0,04	1,11	0,83		-	-
Compuesto 48B							
% de DI/G Carótida	12,01	4,33	10,34	1,19		2,37	0,51
Carótida / Sangre	0,40	0,08	0,96	0,11		0,2	0,09
Carótida / Pulmón	0,75	0,07	1,42	0,49		0,25	0,05
Carótida / Corazón	1,27	0,29	2,71	0,24		0,81	0,19

En el que STD = desviación estándar e DI = dosis inyectada

65

Ejemplo 26

*Autoradiografía de los Compuestos 24A y 32A en un modelo de aterosclerosis *in vivo**

5      *Modelo del colesterol en conejo*

Se alimentaron conejos blancos de nueva Zelanda con una dieta de colesterol al 1% durante 8 semanas para inducir el desarrollo de la lesión de aterosclerosis en la aorta. La validación de este modelo ha mostrado el desarrollo de lesiones ateroscleróticas avanzadas ricas en macrófagos a partir del arco aórtico en la aorta descendente. De manera breve, se inyectaron los Compuestos 24A y 32A por vía intravenosa en conejos alimentados con colesterol, que se eutanizaron 2 horas después de la inyección. Se retiró la aorta en su totalidad, y se fijó en formalina tamponada neutra. Se abrió la aorta longitudinalmente a lo largo de la línea media ventral y se tñó en la cara con sudán IV, que detecta la presencia de lesiones de aterosclerosis mediante la tinción de la grasa. A continuación se colocaron las aortas frente a un tamiz de fósforo durante la noche. Se examinó el tamiz los siguientes días para determinar las zonas de radioactividad dentro del tejido aórtico.

Los resultados mostraron la captación de ambos compuestos en las lesiones ateroscleróticas en la aorta con captación mínima en las zonas aórticas normales.

20     Ejemplo 27

*Formación de imagen en un modelo de tumor *in vivo**

25     Se llevó a cabo la formación de imagen con el Compuesto 24A en el modelo de tumor MDA-MB-231 (un modelo de xenoinjerto en el carcinoma de mama humano. La evidencia bibliográfica ha demostrado que las células MDA-MB-231 expresan un intervalo de MMP, que incluye MMP-1 (pro y activo) (Benbow y col., Bacheimer y col.), MMP-2 (Bacheimer y col.; Bacheimer y col.; Lee y col.), MMP-3 (Bacheimer y col.), MMP-7 pro (Bacheimer y col.), MMP-9 pro (no activo) (Benbow y col.; Bacheimer y col.; Lee y col.; Weber y col.), MMP-10, 11 y 14 (todos pro) (Benbow y col.; Bacheimer y col.):

**Bachmeier y col** *Anticancer Res.* 2001 Nov-Dic; 21 (6A):3281-8;

**Bae y col** *Drugs Exp Clin Res.* 2003; 29(1): 15-23;

**Benbow y col** *Clin exp Metastasis.* 1999 Mayo; 17(3):231-8;

**Lee y col** *Eur. J cancer.* 2001; 37: 106-113.

40     **Weber y col** *Int J Oncol.* 2002 Feb; 20(2): 299-303.

Se observaron “puntos de inflamación” tumoral en el intervalo comprendido entre 5 y 120 minutos después de la inyección, con regiones de relaciones de interés en el músculo mayores de 2:1 en todos los puntos temporales. En la Figura 3 se muestran los resultados.

45

50

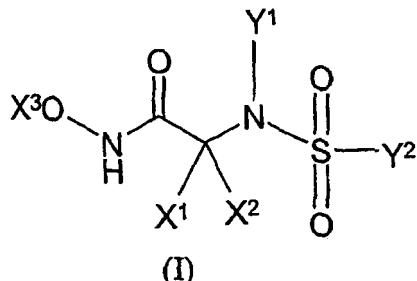
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un agente de formación de imagen que comprende un inhibidor de la metaloproteinasa de Fórmula (I) marcado con un resto de formación de imagen, en el que se puede detectar el resto de formación de imagen tras la administración de dicho inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz marcado en el cuerpo del mamífero *in vivo*:



20 en la que:

Y<sup>1</sup> es H ó -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-(C=O)-Z; en el que w es un número entero de valor de 1 a 6; y Z es OH, alcoxilo C<sub>1-6</sub>, ariloxilo C<sub>4-10</sub> o NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan cada uno de manera independiente entre el grupo constituido por H, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, fluoroalquilo C<sub>1-6</sub> o arilo C<sub>4-10</sub>.

25 X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> junto con el átomo de carbono al cual están ligados, forman un anillo C<sub>3-10</sub> saturado que puede ser alicíclico o bicíclico, y puede incorporar de manera opcional 1 ó 2 heteroátomos escogidos entre O, N y S;

30 X<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1-3</sub> o fluoroalquilo C<sub>1-3</sub>;

Y<sup>2</sup> es un grupo de fórmula -[A<sup>1</sup>]<sub>p</sub>[O]<sub>q</sub>A<sup>2</sup> en la que p y q son 0 ó 1, y A<sup>1</sup> es alquíleno C<sub>1-10</sub>, cicloalquíleno C<sub>3-8</sub>, perfluoroalquíleno C<sub>1-10</sub>, arileno C<sub>6-10</sub> o heteroarileno C<sub>2-10</sub>, y A<sup>2</sup> es H, alquilo C<sub>1-10</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> o heteroarilo C<sub>2-10</sub>, con la condición de que cuando p = 0, q también es 0 y A<sup>2</sup> no es H.

35 2. El agente de formación de imagen de la Reivindicación 1, en el que Y<sup>1</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub> (C=O)-Z y w es 1, 2 ó 3.

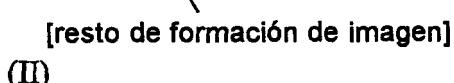
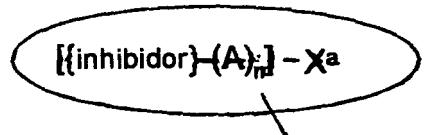
3. El agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 ó 2, en el que X<sup>3</sup> es H, CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>F.

4. El agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 a 3, en el que Y<sup>2</sup> es -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-A<sup>2</sup>, y A<sup>2</sup> es arilo C<sub>6-10</sub>.

40 5. El agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 a 4, en el que el resto de formación de imagen se escoge entre:

- (i) un ión metálico radioactivo;
- (ii) un ión metálico paramagnético;
- (iii) un halógeno radioactivo que emite radiación gamma;
- (iv) un no metal radioactivo que emite positrones;
- (v) un núcleo hiperpolarizado activo en RMN;
- (vi) un indicador adecuado para la formación de imagen *in vivo*;
- (vii) un emisor  $\beta$  adecuado para la detección intravascular.

55 6. El agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente de formación de imagen es de Fórmula II:



en la que:

{inhibidor} es el inhibidor de la metaloproteinasa de Fórmula (I);

5 - $(A)_n$  es un grupo ligante en el que cada A es de manera independiente -CR<sub>2</sub>-, -CR=CR-, -C=C-, -CR<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-, -CO<sub>2</sub>CR<sub>2</sub>-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO<sub>2</sub>NR-, -NRSO<sub>2</sub>-, -CR<sub>2</sub>OCR<sub>2</sub>-, -CR<sub>2</sub>SCR<sub>2</sub>-, -CR<sub>2</sub>NRCR<sub>2</sub>-, un grupo cicloheteroalquileno C<sub>4-8</sub>, un grupo cicloalquileno C<sub>4-8</sub>, un grupo arileno C<sub>5-12</sub>, o un grupo heteroarileno C<sub>3-12</sub>, un aminoácido, un azúcar o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG) mono-dispersado;

10 R se escoge de manera independiente entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, alquenilo C<sub>2-4</sub>, alquinilo C<sub>2-4</sub>, alcoxialquilo C<sub>1-4</sub> o hidroxialquilo C<sub>1-4</sub>;

n es un número entero de valor 0 a 10,

15 y X<sup>a</sup> es H, OH, H<sub>3</sub>I, NH<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub>, alcoxi C<sub>1-4</sub>, alcoxialquilo C<sub>1-4</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-4</sub> o X<sup>a</sup> es el resto de formación de imagen.

20 7. El agente de formación de imagen de la Reivindicación 6, en el que el resto de formación de imagen se liga en las posiciones Y<sup>1</sup> o Y<sup>2</sup> del inhibidor de la metaloproteinasa

8. El agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 a 7, en el que el inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz se conjuga con un ligando, y dicho ligando forma un complejo metálico con el ión metálico radioactivo o el ión metálico paramagnético.

25 9. El agente de formación de imagen de la Reivindicación 8, en el que el ligando es un agente quelante.

10. El agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 8 ó 9, en el que el ión metálico radioactivo es un emisor gamma o un emisor de positrones.

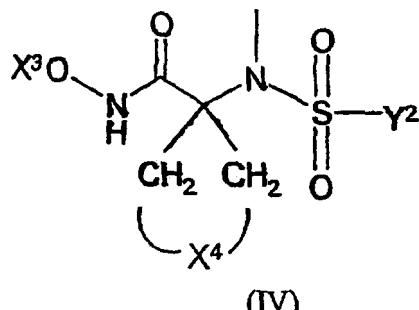
30 11. El agente de formación de imagen de la Reivindicación 10, en el que el ión metálico radioactivo es <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga o <sup>68</sup>Ga.

35 12. El agente de formación de imagen de la Reivindicación 10, en el que el resto de formación de imagen halógeno radioactivo que emite radiación gamma es <sup>123</sup>I.

13. El agente de formación de imagen de la Reivindicación 10, en el que el no metal radioactivo que emite positrones se escoge entre <sup>18</sup>F, <sup>11</sup>C o <sup>13</sup>N.

40 14. El agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 a 13, en el que el inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz es de Fórmula IV:

45 (CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>(CO)Z



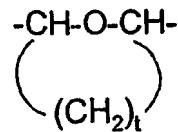
60

en la que

Y<sup>2</sup>, w y Z son tal como se han definido en la Reivindicación 1;

65 X<sup>3</sup> es H, CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>F;

X<sup>4</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - en la que m es 1, 2 ó 3, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub> o X<sup>5</sup> en el que X<sup>5</sup> es

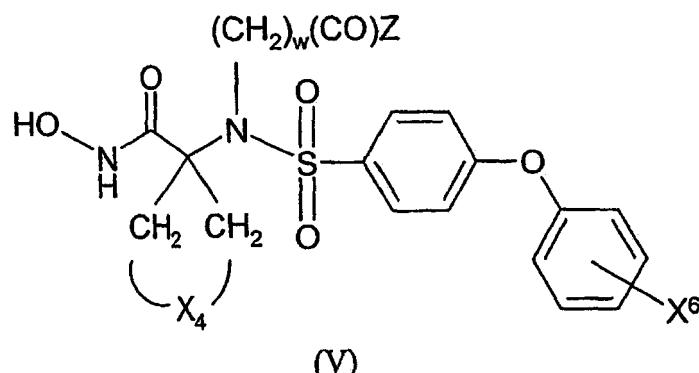


en el que t es 2 ó 3

10 15. El agente de formación de imagen de la Reivindicación 14, en el que Z es NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>.

16. El agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 14 ó 15, en el que el inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz es de Fórmula V:

15



30

en la que:

X<sup>6</sup> es Hal, R<sup>1</sup> u OR<sup>1</sup>, en el que R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub> o fluoroalquilo C<sub>1-3</sub>.

35 17. El agente de formación de imagen de la Reivindicación 16, en el que Z es NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, X<sup>6</sup> es F; y X<sup>4</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>- o X<sup>5</sup> con t igual a 2.

18. Una composición farmacéutica que comprende el agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 a 17 junto con un vehículo biocompatible, en una forma adecuada para la administración a un mamífero.

40

19. Una composición radiofarmacéutica que comprende el agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 a 17 en el que el resto de formación de imagen es radioactivo, junto con un vehículo biocompatible, en una forma adecuada para la administración a un mamífero.

45

20. La composición radiofarmacéutica de la Reivindicación 19, en la que el resto de formación de imagen comprende un ión metálico radioactivo.

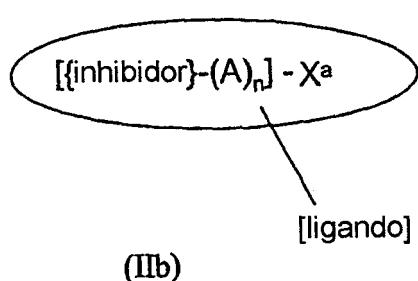
21. La composición radiofarmacéutica de la reivindicación 19, en la que el resto de formación de imagen comprende un no metal radioactivo que emite positrones o un halógeno radioactivo que emite radiación gamma.

50

22. Un conjugado de un inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz de Fórmula (I) tal como se ha definido en la Reivindicación 1 con un ligando, en el que dicho ligando es capaz de formar un complejo metálico con un ión metálico radioactivo o paramagnético.

23. El conjugado de la Reivindicación 20, de Fórmula IIb:

55



65

en la que el {inhibidor}, A, n y X<sup>a</sup> son tal como se han definido en la Reivindicación 6.

# ES 2 299 884 T3

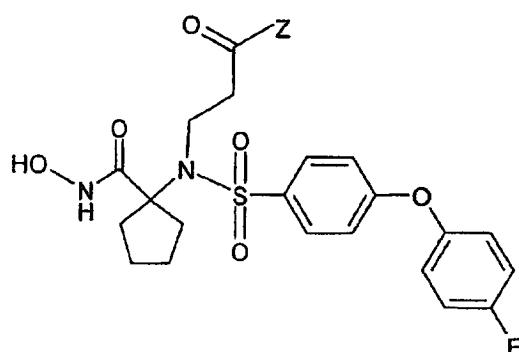
24. El conjugado de las Reivindicaciones 22 ó 23, en el que el inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz es el de las Fórmulas IV ó V de las Reivindicaciones 14 a 17.
- 5 25. El conjugado de las Reivindicaciones 22 a 24, en el que el ligando es un agente quelante.
26. El conjugado de la Reivindicación 25, en el que el agente quelante tiene un grupo donante de diaminadioxima, N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, o N<sub>3</sub>S.
- 10 27. Un kit para la preparación de la composición radiofarmacéutica de la Reivindicación 20, que comprende el conjugado de las Reivindicaciones 22 a 26.
28. El kit de la Reivindicación 30, en el que el ión metálico radioactivo es <sup>99m</sup>Tc, y el kit comprende de manera adicional un reductor biocompatible.
- 15 29. Un kit para la preparación de la composición radiofarmacéutica de la Reivindicación 21, que comprende un precursor, siendo dicho precursor un derivado no radioactivo del inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz de las Reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho derivado no radioactivo es capaz de reaccionar con una fuente del no metal radioactivo que emite positrones o el halógeno radioactivo que emite radiación gamma para dar la composición radiofarmacéutica deseada.
- 20 30. El kit de la Reivindicación 29 en el que el precursor está en forma estéril apirogénica.
31. El kit de las Reivindicaciones 29 ó 30 en el que la fuente del no metal que emite positrones o el halógeno radioactivo que emite radiación gamma se escoge entre:
- 25 (i) el ión haluro o F<sup>+</sup> o I<sup>+</sup>; o
- (ii) un agente alquilante escogido entre un haluro, tosilato, triflato o mesilato o halogenuro de alquilo o fluoroalquilo.
- 30 32. El kit de las Reivindicaciones 29 a 31, en el que el derivado no radioactivo se escoge entre:
- (i) un derivado organometálico tal como un trialquilestannano o un trialquilsilano;
- 35 (ii) un derivado que contiene un haluro de alquilo, tosilato de alquilo o mesilato de alquilo para la sustitución nucleófila;
- (iii) un derivado que contiene un anillo aromático activado hacia la sustitución nucleófila o electrófila;
- 40 (iv) un derivado que contiene un grupo funcional que experimenta alquilación fácil;
- (v) un derivado que alquila los compuestos que contienen tiol para dar un producto que contiene tioéter.
- 45 33. El kit de las Reivindicaciones 29 a 32, en el que el precursor se enlaza con una fase sólida.
34. Uso de un agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 a 17 para el diagnóstico por formación de imagen de la aterosclerosis.
- 50 35. Uso del agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 a 17 para el diagnóstico por formación de imagen de las placas inestables.
36. Uso del agente de formación de imagen de las Reivindicaciones 1 a 17 para la detección intravascular de la aterosclerosis.

55

60

65

Figura 1.



Compuesto	Z
1.	-OH [técnica anterior]
2.	-NH-[quelante 1]
3.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-[quelante 1]
4.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
5.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> Cl
6.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> F
7.	-NH-Lys(CO)NH-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Lys-[ε-cloroacetil]-NH <sub>2</sub>
8.	-NH-Glu-NH <sub>2</sub>
9.	-NH-Lys-NH <sub>2</sub>
10.	-NH-Leu-NH <sub>2</sub>
11.	-NH-Lys-Glu-NH <sub>2</sub>
12.	-NH-Glu-Glu-NH <sub>2</sub>
13.	-NH-Leu-Glu-NH <sub>2</sub>
14.	-NH-Lys-Lys-NH <sub>2</sub>
15.	-NH-Gly-Lys-NH <sub>2</sub>
16.	-NH-Glu-Lys-NH <sub>2</sub>
17.	-NH-Leu-Lys-NH <sub>2</sub>
18.	-NH-Gly-Glu-NH <sub>2</sub>
19.	-NH-(Glu)5-Tyr-NH <sub>2</sub>
20.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr(3-yodo)-NH <sub>2</sub>
20A.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr(3- <sup>123</sup> I)-NH <sub>2</sub>
21.	-NH-(Glu)5-Tyr(3-yodo)-NH <sub>2</sub>
21A.	-NH-(Glu)5-Tyr(3- <sup>123</sup> I)-NH <sub>2</sub>

22.	-O-C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>
23.	-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -[C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-OH]
24.	-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -[C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -3-I-4-OH]
24A.	-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -[C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> - <sup>123</sup> I-4-OH]
25.	-NH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-SnBu <sub>3</sub>
26.	-NH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-I
30.	-Lys-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr(3-yodo)-NH <sub>2</sub>
30A.	-Lys-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr(3- <sup>123</sup> I)-NH <sub>2</sub>
31.	-Lys-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr-NH <sub>2</sub>
32.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CONH-Tyr(3-yodo)-NH <sub>2</sub>
32A.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CONH-Tyr(3- <sup>123</sup> I)-NH <sub>2</sub>
33.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr-NH <sub>2</sub>
34.	-Glu-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr-NH <sub>2</sub>
35.	-Glu-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr(3-yodo)-NH <sub>2</sub>
36.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CONH-Tyr-NH <sub>2</sub>
37.	-(Glu) <sub>5</sub> -NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr-NH <sub>2</sub>
38.	-(Glu) <sub>5</sub> -NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr(3-yodo)-NH <sub>2</sub>
39.	-NH-Tyr-NH <sub>2</sub>
40.	-NH-Tyr(3-yodo)-NH <sub>2</sub>
41.	-(Lys) <sub>5</sub> -NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr-NH <sub>2</sub>
42.	-(Lys) <sub>5</sub> -NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CO)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-NH-Tyr(3-yodo)-NH <sub>2</sub>
43.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CONH-Tyr-NH <sub>2</sub>
44.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CONH-Tyr(3-yodo)-NH <sub>2</sub>
45.	-(Lys- $\alpha$ -NH <sub>2</sub> ) $\varepsilon$ -COCH <sub>2</sub> O-NH <sub>2</sub>
46.	-(Lys- $\alpha$ -NH <sub>2</sub> ) $\varepsilon$ -COCH <sub>2</sub> O-N=CH-(4-F-fenil)
46B.	-(Lys- $\alpha$ -NH <sub>2</sub> ) $\varepsilon$ -COCH <sub>2</sub> O-N=CH-(4- <sup>18</sup> F-fenil)
47.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CONH-Lys- $\alpha$ -NH <sub>2</sub> - $\varepsilon$ -COCH <sub>2</sub> O-NH <sub>2</sub>
48.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CONH-Lys- $\alpha$ -NH <sub>2</sub> - $\varepsilon$ -COCH <sub>2</sub> O-N=CH-(4-F-fenil)
48B.	-NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>11</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CONH-Lys- $\alpha$ -NH <sub>2</sub> - $\varepsilon$ -COCH <sub>2</sub> O-N=CH-(4- <sup>18</sup> F-fenil)

Nota: la abreviatura [aminoácido]-NH<sub>2</sub> indica un grupo amida -CONH<sub>2</sub> terminal en el término carboxi del aminoácido

En el que el quelante 1 es:

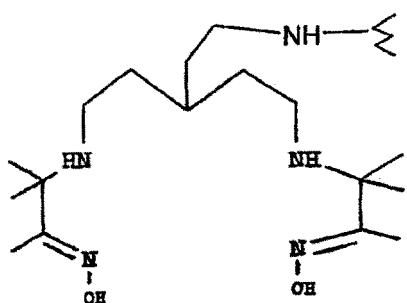


Figura 2.

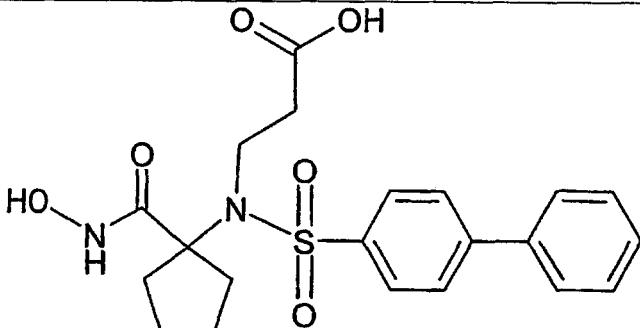
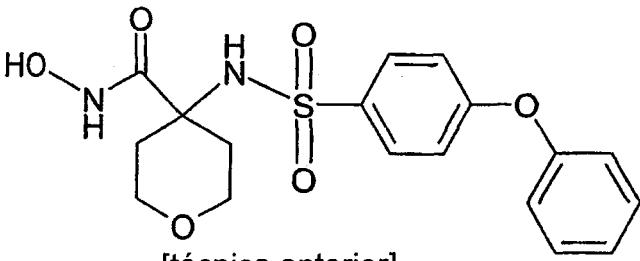
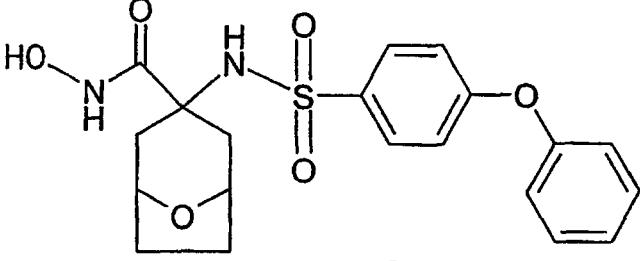
Compuesto	Estructura
27.	 <p>[técnica anterior]</p>
28.	 <p>[técnica anterior]</p>
29.	 <p>[técnica anterior]</p>

Figura 3: Imágenes *in vivo*

