



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 277 598**

51 Int. Cl.:
A61K 51/04 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00985662 .6**
86 Fecha de presentación : **22.12.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1239886**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.09.2002**

54 Título: **Derivados marcados de ácido ascórbico.**

30 Prioridad: **23.12.1999 EP 99310462**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2007

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

72 Inventor/es: **Champion, Susan y**
Richard, Pither

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Derivados marcados de ácido ascórbico.

5 Campo de la invención y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un tipo de compuestos útiles en el diagnóstico o radioterapia de una enfermedad ósea metastásica, las formulaciones farmacéuticas que los contienen, a su uso en el diagnóstico de la enfermedad y en monitorizar la progresión y tratamiento de la enfermedad, y a los procedimientos para su preparación.

10 Agentes actuales para imagen de huesos

El hueso es un lugar habitual para la enfermedad metastásica, aproximadamente el 70-80% de los cánceres de mama y próstata presenten metástasis hacia los huesos. Los cánceres de pulmón, tiroides, riñón y vejiga igualmente presenten metástasis hacia los huesos. La respuesta osteoblástica detectada en un examen del hueso es una respuesta secundaria. Los osteoblastos son células productoras de hueso que están implicadas en la patología asociada con la enfermedad metastásica ósea. Los osteoblastos activados producen grandes cantidades de colágeno que, además de su papel estructural, es importante para la diferenciación de osteoblastos.

El diagnóstico de la enfermedad metastásica ósea se puede realizar mediante uno de cuatro procedimientos - radiografía, escáner CT, examen radioisotópico del hueso o MRI. El examen radioisotópico del hueso ha sido el procedimiento inicial de diagnóstico por imagen convencional en los últimos 25 años. El trazador habitual en exámenes óseos es ⁹⁹Tc-metileno difosfonato (⁹⁹Tc-MDP). También se pueden usar ⁹⁹Tc-HMDP (hidroximetilendifosfonato) y ⁹⁹Tc-HEDP (1-hidroxi-etil-1,1-difosfonato). Estos agentes tienen similares características, en general. Se inyectan aproximadamente 550-750 MBq (15-20 mCi) y se produce en un intervalo de 2 horas la elevada recaptación por el hueso (30-50% de la dosis inyectada). Los escáneres se llevan a cabo a 3-4 h tras la administración del agente, dada su desaparición de la sangre y los tejidos. El diagnóstico por imagen del cuerpo completo (anterior/posterior) con tiempos de adquisición de 20-30 min produce imágenes de alta calidad, buena resolución, y elevada sensibilidad/especificidad.

El ⁹⁹Tc-MDP se absorbe sobre el calcio del hidroxiapatito en el hueso. Influyen en el procedimiento los niveles de actividad osteoblástica y la vascularidad esquelética. Hay una recaptación preferente en los lugares de formación activa del hueso, y a.C. cantidad de acumulación es sensible al nivel de flujo sanguíneo. El escáner del hueso refleja por tanto la reacción metabólica del hueso al proceso de la enfermedad, sin tener en cuenta si la actividad metabólica es de naturaleza neoplásica, traumática o inflamatoria. Así, el trazador se acumula en cualquier sitio de elevado reemplazo óseo, y por tanto el escáner no es muy específico.

La metástasis osteoblástica que da como resultado puntos calientes se detecta sin importar el tamaño, pero un punto frío (fotopénico), causado como resultado de una enfermedad osteolítica, debe alcanzar cierto tamaño para poder detectarse.

Las ventajas generales del escáner con radioisótopos es el amplio campo visual, bajo coste, baja morbilidad, elevada sensibilidad para la detección de metástasis esqueléticas, facilidad de realización en cualquier paciente y dosis corporal total relativamente baja.

45 Desventajas y problemas asociados con los actuales agentes radioisotópicos imagen

Se puede producir la acumulación de trazadores en cualquier punto del esqueleto con una velocidad elevada de reemplazo óseo, y en este caso no proporciona información funcional o vascular. Puesto que el escáner óseo tiene baja especificidad, la naturaleza de la anomalía no se puede determinar del escáner, ya que a menudo no se puede distinguir entre lesiones benignas y malignas. La técnica también es anatómicamente imprecisa. El enlace con el hueso puede seguirse produciendo una vez que las células tumorales han muerto y se sigue produciendo colágeno. Consecuentemente, no hay distinción entre un hueso en cicatrización y la progresión de un tumor, lo que hace que los efectos del tratamiento sean difíciles de controlar. Un aumento en la recaptación de ⁹⁹Tc-MDP debido a un hueso en cicatrización puede verse hasta 6 meses después del tratamiento, y se conoce como la respuesta en llamarada.

En la enfermedad osteolítica no hay producción neta de colágeno, por lo que se producen falsos negativos -no se detectan algunas o todas las lesiones. Dichos escáneres negativos necesitan re-evaluarse con datos clínicos y de laboratorio. Si estos no son conclusivos, entonces se usa la radiografía, que si sigue siendo no conclusiva da paso a la biopsia del hueso o MRI.

La baja especificidad del ⁹⁹Tc-MDP significa que no se puede detectar la naturaleza de la enfermedad, por ejemplo, benigna vs maligna. En un paciente con tumores primarios conocidos, muchos puntos calientes en el hueso pueden indicar metástasis. Sin embargo, el 50% de estos puntos pueden ser otras lesiones no metastásicas. Por tanto, la falta de especificidad observada con el ⁹⁹Tc-MDP significa que los escáneres positivos deben acompañarse de correlación radiográfica (una radiografía positiva confirma la presencia de metástasis ya que el análisis de hueso es más sensible, pero una radiografía negativa no lo descarta).

Se elige a veces MRI, principalmente debido a su capacidad para demostrar anomalías en la médula ósea. Sin embargo, MRI a menudo no puede distinguir entre cambios que se deben al tratamiento, fractura y tumor, y es menos adecuado para el análisis de huesos largos.

A pesar de los problemas asociados con los actuales agentes radioisotópicos para diagnóstico por imagen, sus características únicas los convierten en la primera opción para cribar metástasis en pacientes asintomáticos. Sin embargo, un escáner negativo debe siempre evaluarse de nuevo con datos clínicos y de laboratorio debido a la posibilidad de falsos negativos. Además, se debe tener en cuenta una causa no metastásica de un escáner anormal. Los hallazgos no conclusivos necesitan generalmente un examen suplementario con radiología. Si el diagnóstico sigue sin estar claro, se realizará biopsia de hueso o MRI

Existe por tanto necesidad de un agente de diagnóstico por imagen que tenga especificidad para las lesiones metastásicas de hueso (a diferencia de otros tipos de lesión), y que pueden proporcionar información clínicamente útil en un único protocolo de diagnóstico por imagen sin la necesidad de ensayos adicionales.

La metástasis esquelética puede responder a la quimioterapia o terapia con hormonas. Pueden también responder a la radiación o a agentes diseñados para bloquear la recaptación tales como los nuevos tipos de fármacos de bisfosfonato (BP). Los bisfosfonatos tienen importantes efectos inhibidores sobre la resorción del hueso, y son el tratamiento de elección para la hipercalcemia malignante. El tratamiento puede llevar a una reducción en el número y tipo de complicaciones esqueléticas en el mieloma múltiple, y cáncer de mama avanzado, y puede retrasar el inicio de la enfermedad progresiva en el hueso tras la quimioterapia paliativa en cáncer de mama y mieloma. Igualmente, el BP también alivia el dolor metastásico óseo en alrededor del 50% de los pacientes, pero esto requiere inyección intravenosa ya que BP no es suficientemente potente y no se tolera bien por vía oral. La respuesta al tratamiento se puede medir mediante marcadores bioquímicos, por ejemplo, excreción de colágeno entrecruzado. También se usan radioisótopos en el tratamiento de la metástasis ósea [Ben-Josef & Porter, *Ann Med.* 29, 31-35, (1997); Lewington, *Phys Med Biol.* 41, 2027-2042 (1996)]. Se ha usado con éxito el ^{89}Sr en el alivio del dolor. Otros isótopos para análisis de hueso incluyen ^{32}P (efecto secundario de mielotoxicidad), ^{153}Sm (complejado con EDTMP) y ^{186}Re (complejado con HEDP).

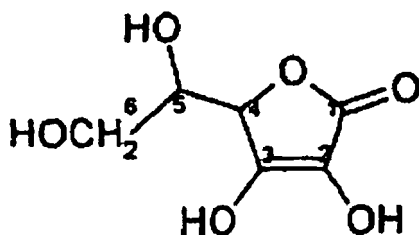
Se conocen los derivados de ácido ascórbico marcados con ^{14}C y ^3H . Yamamoto y *col.*, [*Appl. Radiat. Isot.* 43, 633-639 (1992)] han descrito la preparación de ácido 6-deoxi-6- ^{18}F fluoro-L-ascórbico (^{18}F -DFA), es decir, un derivado de ácido ascórbico marcado con el isótopo emisor de positrones [^{18}F] por desplazamiento nucleofílico de un sulfato cíclico con el ión fluoruro. La biodistribución de este compuesto se ha estudiado en ratas y ratones que soportan fibrosarcoma. Yamamoto y *col.*, [*Radioisótopos*, 44, 93-98 (1995)] han estudiado también la biodistribución de ^{18}F -DFA en ratas Wistar normales, ratas ODS incapaces de sintetizar ácido ascórbico, y ratas Wistar macho con glioma RG-G6 implantado intracerebralmente, y [*Nucl. Med. Biol.*, 23, 479-486 (1996)] la recaptación y distribución de ^{18}F -DFA *en vivo* en cerebros de ratas tras reperusión postisquémica.

La recaptación de hueso que reconoce ^{18}F -DFA es muy pequeña, y no se sugiera que los derivados de ácido ascórbico marcados pudieran ser útiles tanto para el diagnóstico por imagen en general, o para el diagnóstico por imagen en la enfermedad metastásica ósea en particular. Además, ^{18}F tiene una semivida de 1,8 horas, y por tanto se puede únicamente usar durante unas pocas horas (incluyendo el tiempo de síntesis y purificación). Por tanto, cualquier uso de agentes PET (tomografía de emisión de positrones) está restringida a un número muy restringido de centros médicos que tienen un ciclotrón en el propio centro.

Resumen de la invención

La invención incluye agentes de diagnóstico para la detección y monitorización de la enfermedad metastásica ósea así como la radioterapia de esta enfermedad. Los agentes comprenden un ácido ascórbico modificado marcado con un resto detectable que es adecuado para diagnóstico por imagen externa (por ejemplo, by gammagrafía o MRI), tal como un radionucleido o un ión paramagnético.

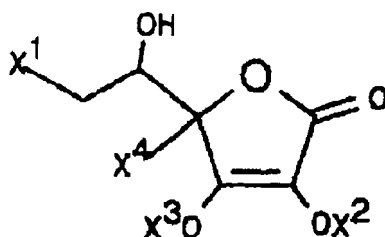
El ácido ascórbico no modificado tiene la fórmula:



Los agentes de la presente invención actúan por acumulación en las células de osteoblasto presentes en los emplazamientos de sustitución elevada de hueso. Estos emplazamientos incluyen áreas de hiperproliferación asociadas con la enfermedad metastásica ósea, así como con otras patologías óseas. Puesto que los osteoblastos únicamente captan los derivados de ácido ascórbico en las lesiones activas, son de alto valor en diagnóstico y pronóstico de lesiones osteoblásticas, y permiten una monitorización rápida del progreso de la enfermedad. El uso de ascorbatos puede evitar también la incidencia de escáneres negativos falsos mediante la visualización de lesiones líticas debidas a la actividad osteoblástica asociada, y permiten también un diagnóstico temprano de lesiones pequeñas debido al mecanismo de recaptación específico. La recaptación en el hueso normal se producirá y será útil para localizar el emplazamiento de la lesión, donde se incrementa la recaptación en gran medida.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de formula:



en la que:

X^1 es OH o SH o NH_2 o $-L-Z$;

X^2 y X^3 son iguales o diferentes y cada uno es H, alquilo C_{1-4} , fluoroalquilo C_{1-4} , bencilo, un grupo protector o $-L-Z$;

X^4 es H o alquilo C_{1-4} ;

L es un enlazante que comprenden una cadena de 0-10 átomos;

Z es un grupo que comprende un resto que se puede detectar;

Con la condición de que dicho compuesto comprenda al menos un resto que se pueda detectar

X^1 es preferiblemente $-L-Z$. X^2 y X^3 son preferiblemente alquilo H o C_1 , lo más preferible ambos X^2 y X^3 son H. X^4 es preferiblemente H o alquilo C_1 , lo más preferible H. El enlazante L es de manera adecuada una cadena de 0-10 átomos de formula $(A)_m$

en la que

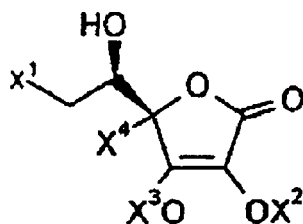
A es $-CR_2-$, $-CR=CR-$, $-C\equiv C-$, $-NRCO-$, $-CONR-$, $-O(CO)-$, $-(CO)O-$, $-SO_2NR-$, $-NRSO_2-$, $-OCR_2-$, $-SCR_2-$, $-NRCR_2-$, un grupo cicloheteroalquileno C_{4-8} , un grupo cicloalquileno C_{4-8} , un grupo arileno C_{5-12} o un grupo heteroarileno C_{3-12} ;

m es un número entero con valor comprendido entre 0 y 10;

cada grupo R se selecciona de manera independiente entre H, alquilo C_{1-4} , C_{1-4} alquenilo, alquino C_{1-4} , C_{1-4} alcoxialquilo o C_{1-4} hidroxialquilo.

L preferiblemente comprende una cadena de 0-4 átomos.

Los compuestos preferidos tienen la estereoquímica definida:



con X^1-X^4 , L y Z como se han definido más arriba

El “resto que se puede detectar” es una sustancia adecuada para el diagnóstico por imagen externo tras administración a un ser humano, y puede ser un radionucleido, dónde el radionucleido es un emisor gamma que emite radiación gamma que puede penetrar en los tejidos blandos, un emisor beta o un emisor de rayos X de baja energía. Quedan fuera del alcance de la presente invención los radionucleidos que son emisores de positrones tales como ^{11}C y ^{18}F . ^3H y ^{14}C no son radioisótopos adecuados tanto para el diagnóstico por imagen externo o radioterapia, y quedan por tanto también fuera del alcance de la presente invención. El resto que se puede detectar también puede ser: uno o mas átomos hiperpolarizados tales como el átomo de carbono ^{13}C de un compuesto enriquecido en ^{13}C para diagnóstico por imagen MRI; un resto paramagnético como agente de contraste para MRI (por ejemplo, algunos iones metálicos gadolinio (III), o manganeso (II)); un resto radioopaco tal como iopamidol para contraste en diagnóstico por imagen con rayos X (tomografía asistida por ordenador), o un agente de contraste por ultrasonidos. Preferiblemente, el resto que se puede detectar es tanto un radionucleido g-emisor tales como ^{123}I , ^{99}Tc , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$ ó ^{67}Ga o un material hiperpolarizado. Los radionucleido g-emisores más preferidos son ^{123}I y ^{99}Tc , especialmente ^{99}Tc . También se pretende que algunos radionucleidos conferirán propiedades radioterapéuticas al ácido ascórbico marcado. Así, por ejemplo, el ácido ascórbico marcado con ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P o ^{33}P se pueden usar el tratamiento de la enfermedad metastásica ósea. En estas aplicaciones, el efecto terapéutico sería debido a la dosis radiactiva dirigida localmente al emplazamiento para células específicas, en oposición a cualquier efecto farmacológico debido al ácido ascórbico. Cualquiera que sea el resto que se puede detectar es se prefiere en gran medida que se enlace con el ácido ascórbico de manera que no experimente metabolismo sencillo (tanto *en vivo* como *en vitro*), ya que este metabolismo daría como resultado una biodistribución del resto que se puede detectar que ya no reflejaría el del ácido ascórbico.

Cuando el resto que se puede detectar es un átomo a ^{13}C hiperpolarizado, este átomo puede formar parte integral de la estructura química del ácido ascórbico, o se puede enlazar como un grupo suplementario. La mayor parte de los otros restos detectables deben formar elementos estructurales suplementarios, y se pueden enlazar en las posiciones 2, 3, 4, 5 ó 6 del derivado de ácido ascórbico. Las posiciones preferidas del resto que se puede detectar son las posiciones 2, 3 y 6, siendo la posición 6 la más preferida.

Por término “grupo protector” se entiende aquellos restos conocidos de aquellas personas expertas en la técnica, que evitarían la modificación metabólica del resto de ácido ascórbico. Estos pueden incluir los grupos alquilo, alcoxialquilo, bencilo o acilo. El grupo protector puede actuar también para evitar la oxidación o cualquier otro proceso de degradación química de los grupos hidroxilo del ácido ascórbico, y a este efecto se eligen los suficientemente lábiles para que el grupo protector se rompa durante el procedimiento de marcado o radiomarcado.

Cuando el resto que se puede detectar es un metal radioactivo o paramagnético, el ión metálico está siempre complejoado. Este complejo metálico se consigue preferiblemente enlazando un ligando que enlaza fuertemente los metales con el resto de ácido ascórbico. Dichos ligandos que enlazan fuertemente los metales incluyen compuestos monodentados que se enlazan con metales de transición, tales como fosfinas, isonitrilos o hidrazidas, y polidentados tales como agentes quelantes. El conjugado ligando-ácido ascórbico se compleja con el metal radioactivo o paramagnético, y el metal se enlaza selectivamente con el ligando, dando un complejo metálico del ligando enlazado con el derivado de ácido ascórbico.

Los agentes quelantes de la presente invención comprenden 2-10 átomos metálicos donantes enlazados de manera covalente con un esqueleto sin coordinación. Los agentes quelantes bidentados adecuados incluyen bisfosfonatos y difosfinas. Los complejos de bisfosfonato de radiometales tienen la ventaja que el complejo radiometálico es siempre diana del hueso *en vivo*. Los agentes quelantes preferidos tienen 4-8 átomos metálicos donantes, y tienen los átomos metálicos donantes tanto en estructuras de cadena abierta como en disposiciones macrocíclicas, o combinaciones de las anteriores. Los agentes quelantes más preferidos tienen 4-6 átomos metálicos donantes y forman anillos de quelato de 5 ó 6 miembros cuando se coordinan con el centro metálico. Dichos agentes quelantes polidentados y/o macrocíclicos forman complejos metálicos estables que pueden sobrevivir al ataque de ligandos endógenos competidores por el metal *en vivo* tales como transferían o proteínas del plasma. El complejo metálico debe tener preferiblemente una lipofilia baja (ya que una elevada lipofilia está relacionada a menudo con la recaptación no específica), y mostrar bajo enlace con las proteínas del plasma, ya que la marca enlazada con el plasma contribuye de nuevo a un fondo indeseablemente alto y no específico del agente para diagnóstico por imagen.

Son ejemplos de agentes quelantes adecuados diaminodioximas (Patente de los Estados Unidos N°4.615.876) o aquellos quelatos que incorporan donantes de amida (Documento 94/08949); los quelatos tetradentados del Documento WO 94/22816; los N_2S_2 diaminoditioles, diamidoditioles o amidoaminoditioles; las N_3S tiotriamidas; los N_2O_2 diaminodifenoles; quelatos N_4 tales como tetraaminas, aminas macrocíclicas o quelatos de amida tales como ciclám, oxociclám (que forma un complejo neutro con tecnecio), o dioxociclám; o ditiosemicarbazonas. Los quelatos anteriormente descritos son particularmente adecuados para el tecnecio pero son útiles también con otros metales. Otros quelatos adecuados se describen en el Documento WO 91/01144, que incluye quelatos particularmente adecuados para indio, itrio y gadolinio, especialmente aminocarboxilatos macrocíclicos y quelatos del ácido aminofosfónico. Se conocen los quelatos que forman complejos metálicos no iónicos (es decir, neutros), y se describen en el Documento US 4885363. El quelato puede comprender también secuencias cortas de aminoácidos tales como el tripéptido Cys/aminoácido/Cys del Documento WO 92/13572 o los péptidos quelato descritos en el Documento EP 0719790 A2.

Cuando el resto que se puede detectar es un isótopo radioactivo de yodo, el átomo de radioyodo se enlaza preferiblemente mediante un enlace covalente a un anillo aromático, tal como un anillo de benceno, o a un grupo vinilo, ya

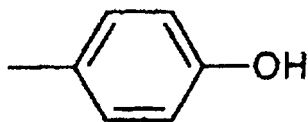
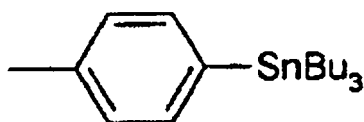
que se sabe que los átomos de yodo enlazados a sistemas alifáticos saturados son adecuados para el metabolismo *en vivo* y por tanto pierden el resto que se puede detectar.

La metástasis ósea puede ser osteoblástica (10%), osteolítica (65%) o mixta (25%). Se cree que los compuestos de la presente invención únicamente se recaptan por los osteoblastos activos en los puntos de elevada sustitución ósea, es decir, lesiones activas. Dichos emplazamientos incluyen zonas de hiperproliferación asociadas a la enfermedad metastásica ósea, así como otras patologías óseas. Se espera por tanto que los presentes compuestos tengan un elevado valor de diagnóstico y pronóstico en lesiones osteoblásticas, y que permitan una rápida monitorización de la enfermedad y del progreso del tratamiento. A diferencia del [^{99}Tc]-MDP, de la técnica anterior, que se acumula en los emplazamientos de producción de colágeno mucho después de la muerte de las células tumorales, no dando información acerca de la viabilidad celular. Los compuestos de la presente invención pueden ayudar también a prevenir la incidencia de escáneres negativos falsos, mediante la visualización de las lesiones osteolíticas asociadas a la actividad osteoblástica, y permite un diagnóstico más temprano de lesiones pequeñas debido al mecanismo de captación específico. El tiempo de desaparición relativamente corto debería permitir el diagnóstico por imagen rápido y un elevado número de pacientes por unidad de tiempo. Los presentes compuestos pueden acumularse también en los fibroblastos, y podrían ser útiles de esta forma en el diagnóstico de otras patologías óseas por ejemplo osteoporosis y artritis.

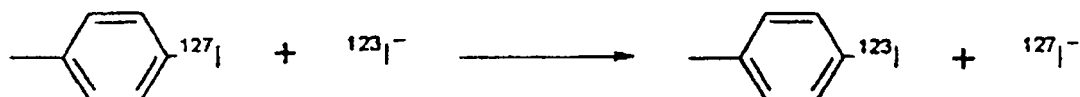
Otro aspecto adicional de la presente invención es la descripción de nuevos derivados de ácido ascórbico. Estos pueden ser útiles como medicamentos para el tratamiento de tumores conocidos por acumular ácido ascórbico, en particular tumores óseos, y se pueden también enlazar a radioisótopos terapéuticos o fármacos citotóxicos.

Se han preparado los nuevos derivados de ácido ascórbico, incluyendo los marcados con ^{127}I no radioactivo, y se ha demostrado que compiten con el ácido ascórbico marcado con ^{14}C en la recaptación en pre-osteoblasto de células de murina (MC3T3-E1). Dichos derivados tienen esencialmente las mismas propiedades químicas que sus contrapartes radioactivas marcadas con radioyodo por ejemplo, ^{123}I o ^{131}I . Además, se han sintetizado también unos pocos compuestos conocidos, y se ha demostrado que compiten con el ácido ascórbico marcado con ^{14}C en la recaptación en células MC3T3-E1. Además, se ha demostrado que un derivado de ascórbico marcado con ^{14}C (compuesto 17) se acumula en osteoblastos primarios de rata en un periodo de 5 horas y permanece estable durante este tiempo. Se ha demostrado también, mediante autoradiografía, la acumulación en nódulos de hueso mineralizado producidos en osteoblastos de rata en un periodo de cultivo de 21 días. Se comparó, *en vivo*, la cantidad de ^{14}C -compuesto 17 en acumulación en la epífisis de la rata 60 minutos tras inyección i.v. con el que se acumulaba en la diáfisis, y se encontró que era 2,3 veces mayor debido a la mayor actividad de los osteoblastos en esos puntos.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar como sigue. Cuando el resto que se puede detectar es yodo radioactivo, el sustituyente enlazado con el ácido ascórbico debe incluir un átomo de halógeno no radioactivo (para permitir el intercambio con el radioyodo), un anillo aromático activo (por ejemplo, un grupo fenol), un compuesto precursor organometálico tal como trialquiltin o trialquilsilil, un precursor orgánico tal como triazeno u otro de dichos restos conocidos de las personas expertas en la técnica. Se dan a continuación ejemplos de sustituyentes adecuados a los que se puede enlazar el yodo radioactivo.

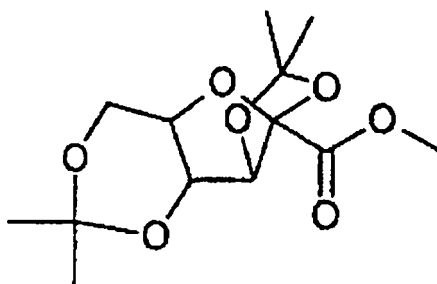


Ambos sustituyentes contienen grupos que permiten la fácil sustitución con radioyodo en el anillo aromático. Se pueden sintetizar sustituyentes alternativos que contienen yodo radioactivo por yotización directa mediante intercambio con radiohalógeno, por ejemplo



Los grupos para sustitución del radioyodo se pueden enlazar al ácido ascórbico como sigue. Un sustituyente funcionalizado con un grupo ácido carboxílico se puede hacer reaccionar con el 6-OH del ácido ascórbico para dar un enlace éster [J. Carbohyd. Chem. 17(3) 397-404 (1998)]. Alternativamente, se puede hacer reaccionar el ácido 6-bromo-6-deoxi-L-ascórbico [Suskovic, Croat. Chem. Acta, 58, 231 (1985)] con un sustituyente funcionalizados con amino o tior para dar un enlace amino [Kralj y col., Eur. J. Med. Chem., 31, 23, (1996)] o tioéter [Carbohyd. Res., 134, 321, (1984)]. Se puede hacer reaccionar el ácido 6-amino-6-deoxi-L-ascórbico [Suskovic, Croat. Chem. Acta, 62, 537 (1989)] con sustituyentes funcionalizados con un ácido carboxílico o un éster activo para dar un enlace amida. Las personas expertas en la técnica reconocerán que son posibles muchas síntesis alternativas de derivados de ácido ascórbico adecuados para la radioyodación, basándose en esta descripción.

Un procedimiento alternativo para sintetizar derivados de ácido ascórbico adecuados para la radioyodación implica el reordenamiento de L-gulonato (mostrado más adelante) en condiciones ácidas [Crawford y col., Adv. Carbohyd. Chem Biochem., 37, 79 (1980)].



El grupo protector de 4,6-isopropilideno se elimina, y se enlaza un sustituyente adecuados para la radioyodación al hidroxilo primario del L-gulonato mediante un enlace éter o éster, por ejemplo, y el L-gulonato modificado se reordena para dar el correspondiente derivado de ácido ascórbico. Alternativamente, el hidroxilo primario se puede sustituir por un bromo o un grupo amino para reaccionar con el grupo adecuado para la radioyodación convenientemente funcionalizado, antes del reordenamiento del ácido ascórbico.

Cuando el que se puede detectar es un ion metálico radiactivo o paramagnético, se enlaza un agente quelante al ascorbato, dando lugar a un conjugado quelato-ácido ascórbico. Dicho conjugado quelato-ácido ascórbico se puede preparar usando la hipótesis del quelato bifuncional. Así, es bien conocido cómo preparar agentes quelantes que tienen enlazados en los mismos un grupo funcional ("quelatos bifuncionales"). Los grupos funcionales que se han enlazado con los agentes quelantes incluyen: amina, tiocianato, maleimida y ésteres activos tales como N-hidroxisuccinimida. Dichos bifuncional quelatos se pueden hacer reaccionar con grupos funcionales adecuados en el ácido ascórbico para formar el conjugado adecuado. Se proporcionan ejemplos de conjugados quelato-amina para ligandos de diaminodioxima en el Documento WO 95/19187. En el caso particular del ácido ascórbico, se puede enlazar un agente quelante en la posición 6 como sigue. El ácido ascórbico se puede hacer reaccionar con un conjugado quelato-ácido carboxílico para dar un quelato-derivado de ácido ascórbico enlazado mediante un enlace éster. El ácido 6-COOH-6-deoxi-L-ascórbico [Stuber y col., Carbohyd. Res., 60, 25 (1978)] se puede hacer reaccionar con un conjugado quelato-amina, o el ácido 6-NH₂-6-deoxi-L-ascórbico reacciona con un quelato-éster activo o el conjugado quelato-ácido carboxílico para dar el quelato-derivado de ácido ascórbico enlazado con enlaces amida. Se pueden hacer reaccionar el ácido 6-Br-6-deoxi-L-ascórbico con un conjugado quelato-amina o quelato-tior para dar tanto un enlace amina como tioéter.

Un procedimiento alternativo para sintetizar derivados de ácido ascórbico implica el reordenamiento de un derivado de L-gulonato tal como se ha descrito más arriba. Esta reacción se puede usar en la síntesis de conjugados quelato-ácido ascórbico. Se puede enlazar un quelato al L-gulonato usando uno de los procedimientos descritos más arriba y el conjugado quelato-L-gulonato resultante se reordena para dar el correspondiente quelato-derivado de ácido ascórbico. Las personas expertas en la técnica reconocerán que son posibles muchas síntesis alternativas de los conjugados quelato-ácido ascórbico basándose en esta descripción.

Cuando el resto que se puede detectar es un átomo ¹³C hiperpolarizado, el compuesto hiperpolarizado deseado se puede preparar mediante intercambio de dolarización entre un gas hiperpolarizado (tal como ¹²⁹Xe o ³He) y un derivado de ácido ascórbico adecuado enriquecido en ¹³C. Se conocen derivados de ácido ascórbico marcados [1-¹³C]- y [2-¹³C], y se han usado para examinar el transporte y ciclado redox en eritrocitos humanos [Himmelreich y col., Biochem. 37, 7578 (1998)]. Los derivados de ácido ascórbico enriquecidos en ¹³C se pueden también preparar de manera análoga a las rutas sintéticas de la bibliografía para los derivados de ácido ascórbico enriquecidos en ¹⁴C. Así, Hornig y col., [Int. J. Vit. Nutr. Res. 42, 223 (1972) e *ibid* 42, 511 (1972)] han estudiado la biodistribución autorradiográfica del ácido [1-¹⁴C]-L-ascórbico en cobayas con deficiencia en vitamina C pero normalmente alimentadas tras inyección intravenosa. Karr y col., [J. Lab. Comp., 6, 155 (1970)] prepararon también ácido [6-¹⁴C]-L-ascórbico y ácido [5-¹⁴C]-L-ascórbico

a partir de D-glucosa-1-¹⁴C y D-glucose2-¹⁴C, respectivamente. Williams y *col.*, [Carbohyd. Res., 63, 149 (1978)] describen la síntesis de ácido [4-¹⁴C]-L-ascórbico a partir de D-[3-¹⁴C]glucopiranososa y [6-¹⁴C]-L-ácido ascórbico a partir de D-[1-¹⁴C]glucopiranososa.

Se han ensayado los derivados de ácido ascórbico no marcados de la presente invención respecto de su capacidad para competir por la recaptación de ácido ascórbico ¹⁴C en células MC3T3-E1, una línea celular de osteoblastos de murina. Las células MC3T3-E1 se hacen crecer en placas de cultivo de tejidos y la solución de ensayo apropiada que contiene una concentración normalizada de ácido ascórbico ¹⁴C más una concentración competitiva de derivado de ácido ascórbico añadida a cada pocillo. Se mide a continuación el ácido ascórbico ¹⁴C recaptado por las células a los 60 min.

De los compuestos 11 a 15, se encontró que, únicamente aquellos que contienen un sustituyente de yodofenilo, bromofenilo o yodovinilo competían por la recaptación de ácido ascórbico ¹⁴C en células MC3T3-E1. Los resultados se proporcionan en la Tabla 10. Ambos Compuestos 16 y 17 compitieron por la recaptación de ácido ascórbico ¹⁴C en células MC3T3-E1, aunque la competición mediante el compuesto 16 fue muy débil. Aunque ambos compuestos son conocidos, nunca se había informado en la bibliografía que mostraban competición con el ácido ascórbico ¹⁴C respecto de la recaptación en pre-osteoblastos o células de osteoblasto.

Los derivados de ácido ascórbico marcados con un resto de la presente invención se pueden preparar usando kits. Los kits son productos estériles dados adecuados para la administración humana, por ejemplo, mediante inyección en el torrente sanguíneo. Cuando el resto que se puede detectar es ⁹⁹Tc, el kit comprendería un vial que contiene tanto un derivado de ácido ascórbico adecuado para formar un complejo metálico con ^{99m}Tc o un conjugado quelato-ácido ascórbico, junto con un agente reductor farmacéuticamente aceptable tales como ditionio de sodio, bisulfito de sodio, ácido formamidina sulfónico, ion estannoso, Fe(II) o Cu(I). El agente reductor es preferiblemente una sal estannosa tal como el cloruro estannoso o el tartrato estannoso.

Alternativamente, el derivado de ácido ascórbico o el conjugado de agente quelante-ácido ascórbico puede estar presente como un complejo metálico no radiactivo que, tras adición del metal radioactivo, experimente transmetalación (es decir, intercambio de ligandos), dando el producto deseado. El kit se puede liofilizar, y se diseña para reconstitución con ⁹⁹Tc-pertecnetato (TcO₄⁻) a partir de un generador del radioisótopo ⁹⁹Tc para dar una solución adecuada para administración a un ser humano sin otra manipulación.

Los agentes de la presente invención se pueden también proporcionar en forma de dosis unitaria lista para inyección a un ser humano y puede suministrarse, por ejemplo, en una jeringuilla estéril prerrellena. Cuando el resto que se puede detectar es un isótopo radiactivo tal como ⁹⁹Tc, la jeringuilla que contiene la dosis unitaria se suministraría también con una carcasa para jeringuilla (para proteger al operador de una dosis potencialmente radiactiva).

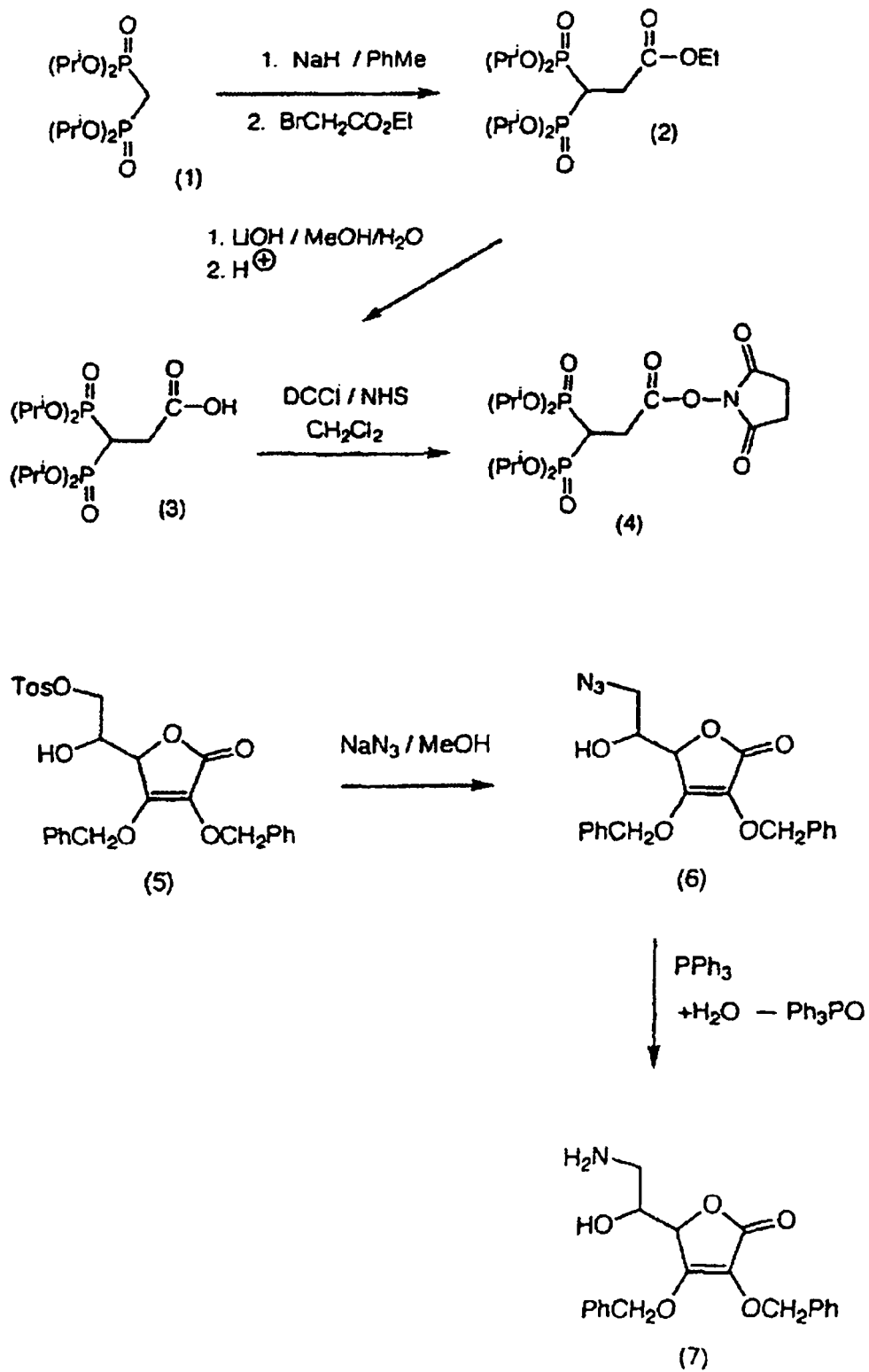
Los anteriores kits o jeringuillas prerrellenas pueden contener otros agentes tales como tampones, solubilizantes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, ciclodextrinas o tensioactivos tales como Plurónico, Tween o fosfolípidos); estabilizantes/antioxidantes farmacéuticamente aceptables (tales como ácido gentisico o ácido para-aminobenzoico) o agentes de volumen para liofilización (tal como cloruro de sodio o manitol).

La estructura del compuesto 10 se proporciona en el Esquema 1. Las estructuras de los compuestos 11 a 28 se proporcionan en las Tablas 1 a 4. La preparación de los compuestos 10-19 y 21-28 se describe en los Ejemplos 1 a 6. Se proporcionan datos de RMN de los compuestos en las Tablas 4 a 9. Las propiedades biológicas de los compuestos 11 a 18 se muestran en el Ejemplo 7 y Tabla 10. Las propiedades biológicas del compuesto 17 se discuten ampliamente en los Ejemplos 8 y 9.

(Esquema pasa a página siguiente)

Esquema 1

Síntesis del compuesto 10



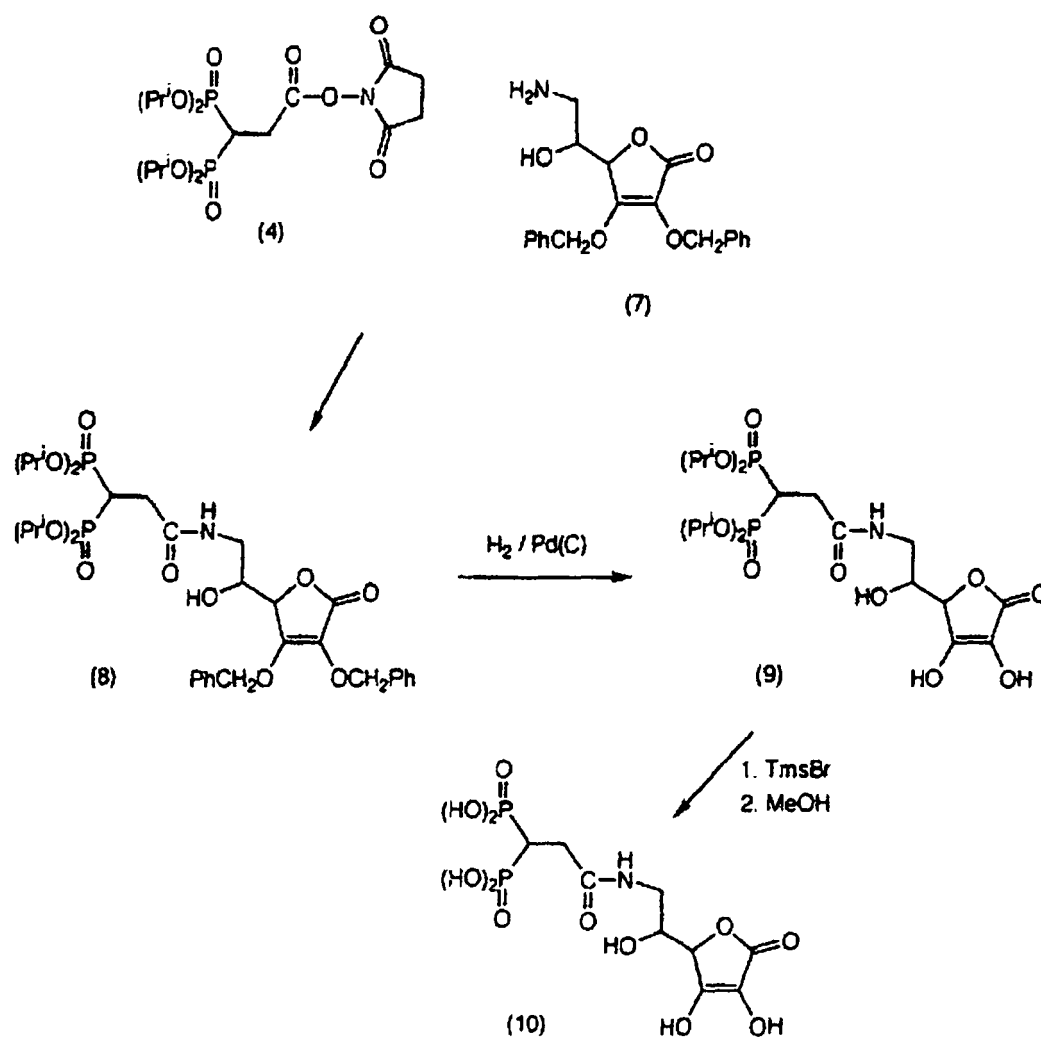


TABLA 1

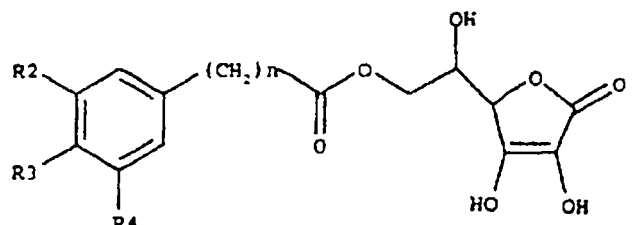
				
Compuesto	n	R ²	R ³	R ⁴
11	0	OCH ₃	OH	H
12	0	H	I	H
13	0	H	Br	H
14	1	H	I	H

TABLA 2

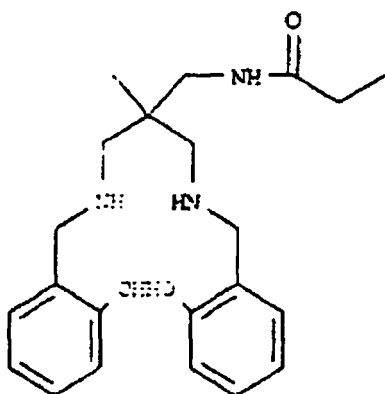
Compuesto número	R ⁵
15	1-yodovinilo

TABLA 3

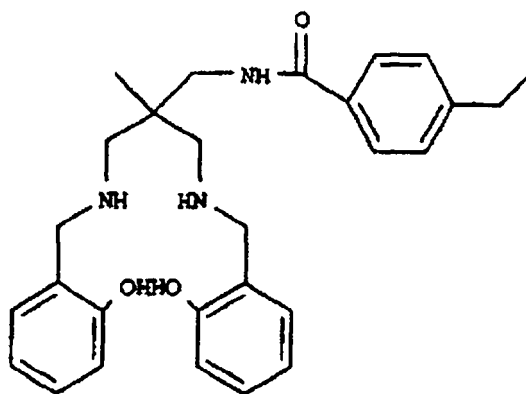
Los compuestos 16 y 17 son compuestos de la bibliografía	
Compuesto número	R ⁵
16	Ph-
17	PhCH ₂ -
18	Ph(2-COOH)-
19	HO ₂ C(CH ₂) ₂ -
20	(4-MeOPh)CH ₂ NH(CO)CH ₂ -
21	[Diaminadifenol]-enlazante1-
22	[Diaminadifenol]-enlazante2-
23	[Pn216]-enlazante1
24	[Pn216]-enlazante2
25	[Isopropilamina]-enlazante1
26	[Isopropilamina]-enlazante2
27	[Hynic]-enlazante2

Donde: [diaminofenol]-enlazantes son:

Enlazante 1

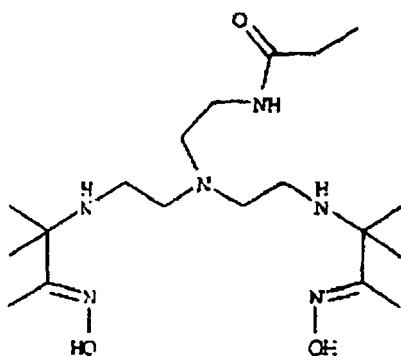


Enlazante 2

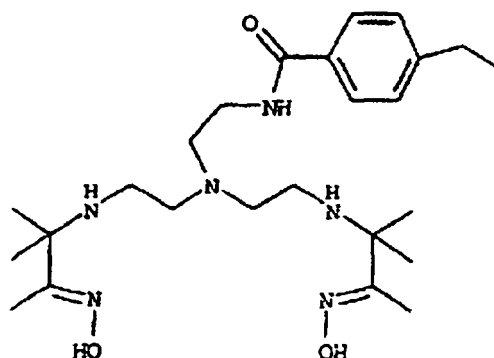


Donde: [Pn216]-enlazantes son:

Enlazante 1

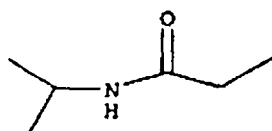


Enlazante 2

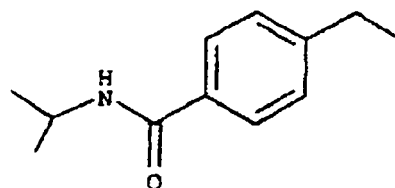


Donde: [isopropilamina]-enlazantes son:

Enlazante 1



Enlazante 2



Donde: [Hynic]-enlazantes son:

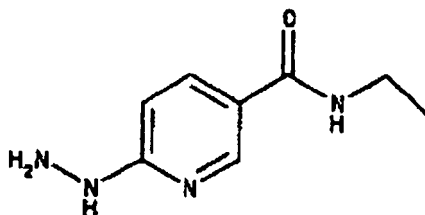


TABLA 4

Compuesto número	R ⁵
28	MAG3
<u>Nota:</u> la estructura completa del compuesto 28 se proporciona en la Tabla 9	

Parte experimental

Ejemplo 1

Síntesis de un bisfosfonato conjugado 10 g

Los desplazamientos químicos del ¹H RMN son respecto al TMS; los desplazamientos químicos del ¹³C RMN son respecto al CDCl₃ a 77 p.p.m. o, para soluciones acuosas, MeOH a 49,2 p.p.m.; los desplazamientos químicos del ³¹P son respecto a un H₃PO₄ externo del 85%.

Ácido 3,3-bis(diisopropoxifosfinil)propiónico (3)

Se añadió hidruro de sodio (700 mg, 0,29 mmol) en pequeñas porciones bajo una corriente de nitrógeno seco a una solución vigorosamente agitada de tetraisopropil metano-1,1-bisfosfonato (1) (5,0 g, 14,5 mmol) en tolueno seco (25 ml). Tras cese de la efervescencia, continuó la agitación durante 15 minutos. Se añadió a continuación bromoacetato de etilo (3,2 g, 19,2 mmol) gota a gota durante un tiempo (2 min), tras lo cual el matraz se calentó y se comenzó a formar un precipitado blanco. Continuó la agitación durante 2 horas más a temperatura ambiente. Se añadió agua (20 ml) a continuación cuidadosamente y la mezcla se agitó vigorosamente. Se separó la capa de tolueno y se extrajo con agua (20 ml). Los extractos acuosos se combinaron, se lavaron con éter (50 ml), se acidificaron hasta pH 1 y se volvió a extraer con diclorometano (2 X 25 ml). Los extractos de diclorometano se combinaron, se secaron (MgSO₄),

se filtraron y el solvente se evaporó bajo presión reducida para dejar el ácido (3) en forma de un líquido amarillo claro (800 mg). La capa de tolueno también se secó (MgSO_4), se filtró, y el solvente se evaporó para dejar un aceite que se encontró que era el etil éster (2) y producto de partida sin reaccionar. Este aceite se disolvió en una mezcla metanol: agua (20 ml, 3:1) que contiene hidróxido de litio (1 g, 24 mmol) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El metanol se eliminó mediante evaporación y se añadió a continuación agua (20 ml). Esta solución acuosa se lavó con éter (2 X 20 ml), se acidificó hasta pH 1 con HCl diluido y a continuación se extrajo con diclorometano (2 X 25 ml). Los extractos de diclorometano se combinaron, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se eliminaron los componentes volátiles bajo presión reducida para dejar el ácido (3) (2,77 g) en forma de un líquido amarillo claro. El producto combinado (3) (3,57 g, 61%) fue lo suficientemente puro para usar en las reacciones posteriores sin más purificación.

δ_{p} (CDCl_3) 21,79.

δ_{c} (CDCl_3) 23,7 (m), 30,6 (s), 34,0 (t, $J_{\text{PC}} = 138$ Hz), 71,8 (m), 172,8 (s).

3,3-bis(bisisopropoxifosfinil)propionato de (N-succinimidilo) (4)

Una solución de dicitlohexilcarbodiimida (2,0 g, 9,71 mmol) en diclorometano (10 ml) se añadió en una porción a una solución agitada de ácido 3,3-bis(bisisopropoxi-fosfinil)propiónico (3) (3,57 g, 8,88 mmol) y N-hidroxisuccinimida (1,15 g, 10 mmol) en diclorometano seco (35 ml). Tras aproximadamente 10 minutos comenzó a formarse un precipitado blanco de dicitlohexilurea. La mezcla se agitó durante 16 h y el sólido formado se separó por filtración y se lavó con diclorometano (15 ml). El solvente se eliminó bajo presión reducida procedente de las soluciones combinadas de diclorometano para dejar un residuo viscoso, que se demostró mediante RMN que era el compuesto del título en buen estado de pureza. La purificación final de este residuo se llevó a cabo usando cromatografía en sílice con una mezcla de diclorometano:metanol (19:1) como eluyente. El producto (4,0 g, 91%) (R_f 0,2) se aisló en forma de un aceite viscoso.

δ_{p} (CDCl_3) 20,0.

δ_{H} (CDCl_3) 1,25-1,31 (24H, m, CH_3 X 8), 2,77 (4H, s, CH_2 X 2), 2,83 (1H, m, CH), 2,7-3,1 (2H, m, CH_2), 4,37 (4H, dq, $J_{\text{HH}} = 6$ Hz, $J_{\text{PH}} = 13,5$ Hz, CH X 4).

(R)-5-(2-azido-(S)-1-hidroxietil)-3,4-dibenciloxi-5H-furan-2-ona (6)

Se calentaron a reflujo (R)-5-[2-(4-metilfenilsulfonilo)-](S)-1-hidroxietil]-3,4-dibenciloxi-5H-furan-2-ona (5)*. (550 mg, 1,1 mmol), azida de sodio (190 mg, 1,7 mmol) y metanol (2 ml) durante 6 horas. La mezcla de reacción se enfrió y la mayor parte del solvente se eliminó mediante evaporación a temperatura ambiente. El material resultante se repartió entre agua (25 ml) y diclorometano (25 ml) y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (25 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron (MgSO_4), se filtraron y los componentes volátiles se evaporaron bajo presión reducida (8 mm/Hg, $3,04 \times 10^5$ N/m²) a temperatura ambiente para dar el producto (6) en forma de un sólido céreo de color amarillo (375 mg, 89%). Este material se usó sin purificación adicional.

δ_{H} (CDCl_3) 3,22 (1H, dd, $J = 6$ y 12,5 Hz, CH_2N_3), 3,40 (1H, br d, OH), 3,46 (1H, dd, $J = 7$ y 12,5 Hz, CH_2N_3), 3,88 (1H, br m, CHO), 4,55 (1H, d, $J = 2$ Hz, CHO anillo), 4,95 (2H, br s, OCH_2), 5,03 (1H, d, $J = 12$ Hz, OCH), 5,08 (1H, d, $J = 12$ Hz, CHO), 7,12 (2H, m, Ar), 7,21-7,31 (8H, m, Ar).

* F. Dallacker y J. Sanders, *Chem. Zeit.*, 1985, **109**, 197-202.

(R)-5-(2-amino-(S)-1-hidroxietil)-3,4-dibenciloxi-5H-furan-2-ona (7)

Se añadió trifenilfosfina (600 mg, 2,4 mmol) a una solución agitada de (R)-5-(2-azido-(S)-1-hidroxietil)-3,4-dibenciloxi-5H-furan-2-ona (5) (750 mg, 2 mmol) en THF (10 ml) y tras pocos minutos se desprendió gas. Se continuó la agitación hasta cese de la efervescencia (normalmente 2-3 h) y se añadió a continuación agua (2 ml) y la mezcla se agitó durante 1 hora más. El THF se eliminó bajo presión reducida y el residuo se repartió entre diclorometano (25 ml) y agua (25 ml). Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO_4), se filtró y cualesquiera componentes volátiles se evaporaron bajo presión reducida (45°C a 8 mm/Hg, 1.066 N/m²) para dejar un residuo naranja viscoso que se purificó mediante cromatografía en sílice. La elución inicial con una mezcla diclorometano:metanol (19:1) eliminó la mayor parte de subproductos polares, y el producto se aisló a continuación por elución con una mezcla diclorometano:metanol en forma de un aceite amarillo claro (150 mg; 21%) (R_f 0,25).

δ_{H} (CDCl_3) 2,49 (3H, br s, NH_2 y OH), 2,76 (1H, dd, $J = 5$ y 13 Hz, NCH), 2,83 (1H, dd, $J = 7$ y 13 Hz, NCH), 3,70 (1H, m, CHO), 4,47 (1H, d, $J = 2$ Hz, CHO anillo), 4,98 (2H, s, OCH_2), 5,05 (1H, d, $J = 12$ Hz, OCH), 5,11 (1H, d, $J = 12$ Hz, CHO), 7,10-7,17 (2H, m, Ar), 7,20-7,32 (8H, m, Ar).

(R)-5-(3-aza-6,6-bis(bisisopropoxifosfinil)-(S)-1-hidroxi-oxo-hexil)-3,4-dibenciloxi-5H-furan-2-ona (8)

Se añadió en una porción (R)-5-(2-amino-(S)-1-hidroxi-etil)-3,4-dibenciloxi-5H-furan-2-ona (7) (180 mg, 0,5 mmol) en diclorometano seco (1 ml) a una solución agitada de 3,3-bis(bisisopropoxifosfinil) propionato de (N-succinimidilo) (4) (250 mg, 0,5 mmol) en diclorometano seco (1 ml), a partir de la cual comenzaron a precipitar cristales de N-hidroxisuccinimida. La mezcla se agitó durante 30 min, se añadió diclorometano (10 ml) a continuación y la solución se lavó con agua (2 X 10 ml). La fase orgánica se secó a continuación (MgSO₄), se filtró y el solvente se evaporó bajo presión reducida para dejar (8) en forma de un aceite amarillo claro viscoso en un estado virtualmente puro. La purificación final se pudo realizar mediante cromatografía en sílice con una mezcla diclorometano:metanol (19:1) como eluyente. El producto (8) (180 mg, 49%) (R_f 0,25) se obtuvo en forma de un aceite amarillo claro viscoso.

$\delta_P(\text{CDCl}_3)$ 21,9 (d, J_{PP} = 4 Hz), 22,0 (d, J_{PP} = 4 Hz).

Espectro de masas (FABS), Calculado para C₃₅H₅₂NO₁₂P₂ 740,2965 (M+H)⁺, encontrado 740,2965.

(R)-5-(3-aza-6,6-bis(bisisopropoxifosfinil)-(S)-1-hidroxi-4-oxo-hexil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona (9)

Una solución de (R)-5-(3-aza-6,6-bis(bisisopropoxifosfinil)-(S)-1-hidroxi-4-oxo-hexil)-3,4-dibenciloxi-5H-furan-2-ona (8) (700 mg, 0,96 mmol) en metanol (10 ml) se hidrogenó sobre un catalizador de paladio (200 mg, 10% Pd/C) y en atmósfera de hidrógeno (30 atm, (3,04 x 10⁵ N/m²) durante 2 horas a temperatura ambiente. El catalizador se eliminó por filtración en Celite y la torta del filtro se lavó con metanol (50 ml). Estos lavados se combinaron con el filtrado de metanol y los componentes volátiles se evaporaron bajo presión reducida para dejar (9) en forma de un aceite viscoso en buen estado de pureza. El residuo se purificó mediante cromatografía en sílice con una mezcla acetato de etilo:metanol (9:1) como eluyente. El producto puro (9) (50 mg, 9%) (R_f 0,3) se aisló en forma de un sólido color crema.

$\delta_P(\text{CDCl}_3)$ 21,8 (br s), 22,98 (br s).

Espectro de masas (FABS), Calculado para C₂₁H₄₀NO₁₂P₂ 560,2026 (M+H)⁺, encontrado 560,2026.

Ácido 6-[(R)-5-(2,5-dihidro-3,4-dihidroxi-2-oxo-furan-5-il)]-4-aza-(S)-6-hidroxi-3-oxo-hexano-1,1-bisfosfónico (10)

A una solución de (R)-5-(3-aza-6,6-bis(bisisopropoxifosfinil)-(S)-1-hidroxi-oxo-hexil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona (9) (370 mg, 0,6 mmol) en diclorometano (10 ml) se añadió bromotrimetilsilano (1 g, 6,4 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 6 h y el solvente a continuación se eliminó bajo presión reducida. Se añadió metanol (25 ml) y los componentes volátiles se evaporaron bajo presión reducida. Este procedimiento se repitió dos veces para dejar un residuo color marrón. El producto (10) se purificó mediante HPLC en fase reversa en una columna C₁₈ usando metanol acuoso (50%) como eluyente, y se aisló sólido marrón claro (120 mg; 46%).

$\delta_P(\text{D}_2\text{O})$ 21 (br).

$\delta_C(\text{D}_2\text{O})$ 32,1 (br s), 34,8 (t, J_{PC} = 138 Hz), 42,1 (s), 67,1 (s), 76,8 (s), 118,1 (s), 155,5 (s), 173,4 (s), 173,5 (br s).

Ejemplo 2

Síntesis de los compuestos 11 a 15

Los compuestos 11 a 15, todos ellos ésteres de ácido ascórbico, se sintetizaron directamente a partir de ácido ascórbico y el correspondiente ácido carboxílico usando el procedimiento de Gan y col., [J. Carbohyd. Chem., **17**, 397-404 (1998)]. Los compuestos 11 y 13 a 15 se sintetizaron todos usando un procedimiento similar al que se proporciona a continuación para el ácido 6-O-(4-yodobenzoil)-L-ascórbico (Compuesto 12):

El ácido 4-yodobenzoico (0,5 g, 2,48 mmol), y ácido L-ascórbico (2 g, 11,3 mmol) se mezclaron y agitaron en ácido sulfúrico concentrado (10 ml) durante 24 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adición de hielo y cloruro de sodio sólido. La mezcla se extrajo con acetato de etilo y la capa orgánica se secó con sulfato de magnesio. El compuesto del título se aisló mediante evaporación bajo presión reducida seguido por cristalización en una mezcla cloroformo/hexano y secado a vacío (200 mg, 5,6 mmol).

ES 2 277 598 T3

Ejemplo 3

Síntesis de los compuestos 16 y 17

- 5 Estos compuestos se sintetizaron usando procedimientos similares a los procedimientos de la bibliografía, [Carbohyd. Res., 134, 321, (1984)] para el compuesto 16 y [J. Biol. Chem., 271, 26032, (1996)] para el compuesto 17. El compuesto 17 ^{14}C se preparó usando un procedimiento similar, pero partiendo del ácido bromo ^{14}C -ascórbico.

10 Ejemplo 4

Síntesis de los compuestos 18 y 19

- 15 Estos compuestos se sintetizaron usando procedimientos muy similares. A una suspensión de carbonato de sodio (960 mg) en metanol (2 ml) y agua (6 ml) se añadió ácido 6-bromo-L-ascórbico (500 mg) y ácido tiosalicílico (350 mg; para el compuesto 18) o ácido 3-mercaptopropiónico (240 mg; para el compuesto 19). La mezcla resultante se agitó durante al menos 4 h a temperatura ambiente y se investigó su finalización mediante TCL. La reacción se acidificó con HCl 2M y el producto se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó con MgSO_4 . La filtración y evaporación a sequedad dio un sólido coloreado pulido que se trató con cloroformo y se filtró para dar 590
20 mg de compuesto 18/ 200 mg de compuesto 19.

Ejemplo 5

25 *Síntesis de los compuestos 21-27*

Compuesto 21

- El ácido protegido con tritilo, se preparó mediante un procedimiento descrito en [Inorg. Chem 23 (23) 3795-3797
30 (1984)]. El ácido S-tritil mercaptoacético (5,6 g) se disolvió en acetonitrilo seco (60 ml) bajo nitrógeno. A esto se añadió una solución de N-hidroxisuccinimida (2 g) en acetonitrilo (10 ml). Esto fue seguido por la adición de DCC (4,4 g) en acetonitrilo (20 ml). La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. El producto se aisló por filtración seguida por evaporación del filtrado para dar un sólido blanco (6 g). El éster del ácido S-tritil-
35 mercaptoacético NHS (400 mg) se disolvió en diclorometano seco (10 ml) bajo nitrógeno. A esto se añadió el ligando diaminodifenol (300 mg), seguido por trietilamina (146 μl). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y el producto se aisló mediante evaporación seguido por cromatografía súbita en columna de sílice. El enlazante de diaminodifenol protegido con tritilo (270 mg) se disolvió en DCM (6 ml) y a esto se añadió trietilsilano (100 μl) seguido por ácido trifluoroacético (300 μl). La mezcla se agitó durante 4 h a temperatura ambiente, tras lo cual se evaporó a sequedad y se usó directamente en la etapa final, que se llevó a cabo tal como se describe para los
40 compuestos 18 y 19. Los compuestos 22-27 se prepararon de manera análoga.

Ejemplo 6

45 *Síntesis del compuesto 28*

- Este compuesto se sintetizó usando una combinación de procedimientos descritos en la bibliografía. El quelato MAG3 se preparó usando el procedimiento descrito por Winnard y *col.*, [Nucl Med Biol 24 425-432 (1997)]. Se preparó el ácido N-metil-6-amino-6-deoxi- O^3 -bencil-L-ascórbico según el procedimiento descrito por Kralj M y *col.*,
50 [Eur J Med Chem 31 23-35 (1996). La reacción de acoplamiento entre MAG3 y el ácido N-metil-6-amino-6-deoxi- O^3 -bencil-L-ascórbico se consiguió usando PiBrop (un agente usado específicamente para las N-metil aminas) de manera similar a que describe Coste J [Tet. Lett. 32 (17) 1967-1970 (1991). De esta forma, a ácido N-metil-6-amino-6-deoxi- O^3 -bencil-L-ascórbico (91 mg, $3,26 \times 10^{-4}$ moles) en DMF seco (5 ml) bajo nitrógeno se añadió MAG3 (100 mg, $3,26 \times 10^{-4}$ moles). Con agitación a temperatura ambiente, se añadió diisopropiletilamina (211 mg, $1,63 \times 10^{-3}$ mol)
55 seguido por PiBrop (182,5 mg, $3,914 \times 10^{-4}$ mol). Tras agitación durante toda la noche el solvente se eliminó en vacío y el producto se aisló mediante HPLC preparativo.

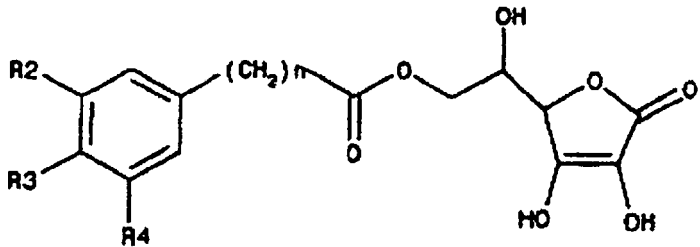
60

65

ES 2 277 598 T3

TABLA 5

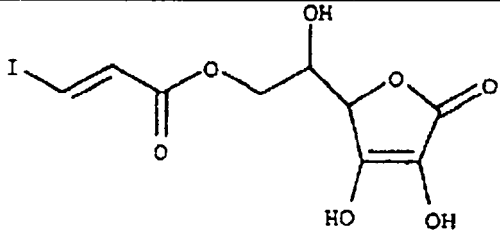
Datos de ^1H RMN para los compuestos 11, 12, 13 y 14



datos de RMN (ppm)	Compuesto 11	Compuesto 12	Compuesto 13	Compuesto 14
R ²	3,8	-	-	-
R ³	-	-	-	-
R ⁴	-	-	-	-
(CH ₂) _n	-	-	-	3,57
H5	3,77	4,85	4,07	3,98
H6 _b	4,12	4,45	4,20	4,12
H6 _a	4,32	4,65	4,28	4,18
H4	4,72	4,85	4,66	4,56
Aril	6,6-7,5	8,0-7,5	7,7-7,0	7,5-7,05

TABLA 6

Datos de ^1H RMN para el compuesto 15

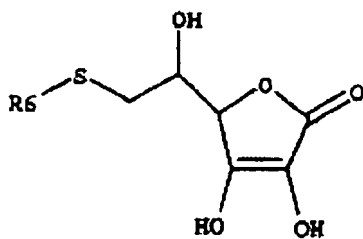


datos de RMN (ppm)	Compuesto 15
H-5	3,7
H-6 _{a,b}	4,2
H-4	4,28
I-vinil _a	6,83
I-vinil _b	6,22

ES 2 277 598 T3

TABLA 7

Datos de ^1H RMN para los compuestos 16 y 17



datos de RMN (ppm)

Compuesto 17

Compuesto 16

CH₂
CH₂(H-6_{a,b})
CH(H-5)
CH(H-4)
Aril

2,70
3,67
3,83
4,35
7,13-7,18

3,22-3,26
3,95-3,99
4,88
7,20-7,44

TABLA 8

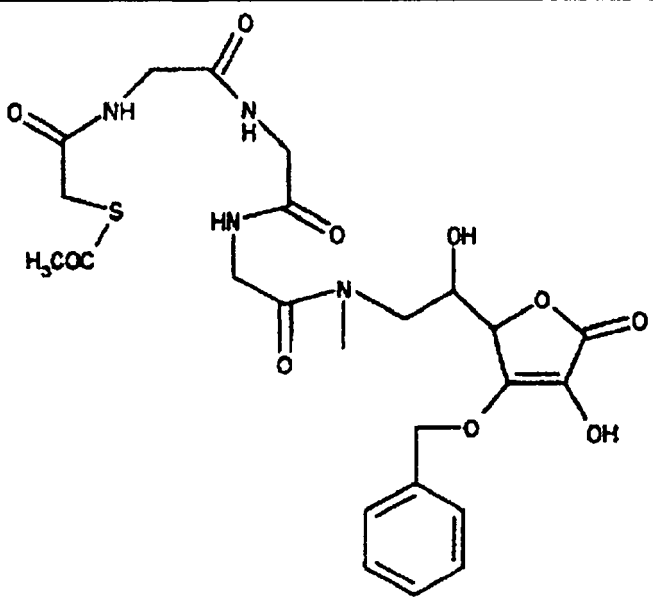
Datos de ^1H RMN para los compuestos 21-27

Comp. N°	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
21	1,2 s,3-H	2,6 d,2-H	3,0 s,4-H	3,5 m,4-H	4,0 m,1-H	4,6 m,4-H	4,8 d,1-H	6,6-7,3 m,8-H
22	0,7 s,3-H	2,1 m,2-H	2,5 m,4-H	2,9 s,2-H	3,3-3,4 m,3-H	3,8 s,4-H	4,3 d,1-H	6,3-7,3 m,12-H
23	1,5 s,12-H	1,9 s,6-H	2,2-2,9 m,4-H	3,0-3,1 m,4-H	3,2-3,3 m,4-H	3,3-3,4 m,4-H	4,0 m,1-H	4,8 d,1-H
24	1,5 s,12-H	1,8 s,6-H	2,5-3,0 m,12-H	3,5 s,1-H	3,8 s,1-H	4,0 m,1-H	4,5 s,1-H	7,4-7,9 m,4-H
25	0,7 d,6-H	2,4 d,2-H	2,8 d,2-H	3,6 m,2-H	4,3 d,1-H			
26	1,3 d,6-H	2,2 d,2-H	3,7 d,2-H	3,8 m,1-H	4,1 m,1-H	4,4 d,1-H	7,4 d,2-H	7,6 d,2-H
27	1,8 s,9-H	2,7 m,4-H	3,5 t,2-H	3,9 m,1-H	4,8 d,1-H	7,0 d,1-H	8,2 dd,1-H	8,4 d,1-H

ES 2 277 598 T3

TABLA 9

Datos de ^1H RMN para el compuesto 28

	
datos de RMN (ppm)	Compuesto 28
SCOCH ₃	2,3
NCH ₃	3,0
SCH ₂	3,3
CH ₂ (H-6 _{a,b})	3,4-3,6
Amida-CH ₂	3,6
Amida CH ₂ x2	3,9
CH(H-5)	4,1
CH(H-4)	4,6
Bencil-CH ₂	5,5
Aril	7,4

Ejemplo 7

Eensayo de recaptación normalizado en células

Disoluciones y reactivos

Tampón de transporte: NaCl 134 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgSO₄ 0,8 mM, HEPES 20 mM, glucosa 10 mM, pH 7,3, almacenado a temperatura ambiente

Tampón de ensayo: Tampón de transporte + 40 μM homocisteína

Ácido ^{14}C -ascórbico (Amersham Pharmacia Biotech)

Solución de almacenamiento: 50 μCi en 50 μl agua Analar, almacenado a -20°C .

Solución de ensayo: 200 nCi ácido ^{14}C -ascórbico en 200 μl de tampón de ensayo/pocillo (125 μM)

Ácido ascórbico (Sigma)

Dehidroácido ascórbico (Sigma)

5 Compuestos de ensayo:

Tampón de detención: 200 μ M floretina en tampón de ensayo, enfriado a 4°C.

Solución de lisis: SDS al 0,1% en agua Analar

10

Procedimiento

Las células de pre-osteoblasto MC3T3-E1 de murina se sembraron en placas de 24 pocillos a 2×10^5 células/pocillo en 1 ml de medio mínimo esencial más FCS penicilina y estreptomina al 10%. Las células se hicieron crecer durante toda la noche a 37°C, CO₂ al 5%. El tampón de ensayo y las soluciones se prepararon la mañana del ensayo. Las células se examinaron bajo el microscopio para determinar confluencia y viabilidad. Se retiró el medio de crecimiento usando una Liquepipette y cada pocillo se lavó con $2 \times 200 \mu$ l de tampón de ensayo. Se añadió la solución de ensayo apropiada a cada pocillo, y la placa se incubó a 37°C durante el tiempo necesario. Para detener la reacción, se añadieron 0,5 ml de tampón de detención muy frío a cada pocillo. A continuación, cada pocillo se lavó con 0,5 ml de tampón de detención. Las células se lisaron en solución SDS al 0,1% durante aproximadamente 10 min y las soluciones se transfirieron a viales de centelleo. A continuación, cada pocillo se lavó con tampón de ensayo, y esta solución de lavado se transfirió también al vial de centelleo adecuado. Se añadió el fluido de centelleo (5 ml) a cada vial, los viales se sometieron a vortización, y se contaron en un contador Rackbeta

25

TABLA 10

Resultados del ensayo celular

30

Compuesto	Competición	DI50 (μ M)
Ácido ascórbico	No	258
11	No	—
12	No	384
13	No	279
14	No	1880
15	No	796
16	No	1847
17	No	108
18	No	-
19	No ensayado	

35

40

45

50 Ejemplo 8

Recaptación del Compuesto 17 ¹⁴C en osteoblastos de rata

Preparación y Cultivo de osteoblastos primarios de rata

55

60

65

Se recogieron fetos de rata y se rociaron con isopropanol al 70%. A continuación se retiraron las calvarias cortando la piel de la parte de arriba de la cabeza, haciendo una incisión desde la calvaria hasta el meato auditivo externo por detrás de los huesos parietales y después hacia delante hacia los glóbulos oculares. Cuando se aislaron todas las calvarias, se lavaron con PBS (libre de Ca²⁺ y Mg²⁺), a continuación se incubaron en tripsina a 37°C durante 10 minutos. Las calvarias se transfirieron a colagenasa al 0,2% (tipo II) en HBSS durante 30 minutos a 37°C. Esta digestión con colagenasa se repitió durante 60 minutos para liberar las poblaciones de osteoblastos. Se retiró el sobrenadante, y se hizo rotar para obtener un residuo celular. El residuo se resuspendió en medio, se contaron las células viables, y se plaquearon en un matraz T75. Tras la confluencia, las células se subcultivaron en placas de 6 multipocillos a 2×10^4 - 2×10^5 células/pocillo en 3 ml de medio que contiene β -glicerofosfato 1 mM. Además, se incubaron ácido ascórbico (50 μ g/ml), ácido ascórbico ¹⁴C (19,6 μ Ci/ml) o compuesto 7 ¹⁴C (2,8 μ Ci/ml) con osteoblastos durante el tiempo de cultivo. Las células se alimentaron entre dos y tres veces por semana, y se cultivaron hasta 21 días. Los nódulos se volvieron visibles microscópicamente alrededor de los 7-10 días, y se inició la mineralización (evaluada mediante tinción con rojo de alizarina) poco después.

ES 2 277 598 T3

Autoradiografía

Al final del periodo de cultivo, las células se fijaron con glutaraldehído al 2,5% y se deshidrataron en series incrementales de concentraciones de etanol. Se añadió a cada pocillo aproximadamente 2 ml de emulsión de hiperrecubrimiento (LM-1; APB) y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 24-36 horas. A continuación, se reveló la emulsión siguiendo procedimientos convencionales.

Análisis mediante HPLC

La separación de DHAA, M, compuesto 7 y bencil mercaptano se realizó con éxito usando el siguiente perfil de HPLC.

Fase móvil: A y B = acetonitrilo 50%:50% KH_2PO_4 50 mM

Detector: UV (235 nm)/ analizador de centelleo en flujo (β -radiación)

Caudal: 1 ml/min

Columna: Waters Sferisorb S5NH 2-5 mm - 4,6 X 250 mm

	Tiempo de retención (min)	Gráfica de calibración
(y = mV.min & x = nmoles)		
DHAA	$3,34 \pm 0,10\%$	y = 121946 nmoles
AA	$5,74 \pm 0,20\%$	y = 215320 nmoles
Compuesto 7	$3,71 \pm 0,27\%$	y = 255088 nmoles
Bencil Mercaptano	$2,44 \pm 0,14\%$	y = 78710 nmoles

Las muestras de compuesto 7 ^{14}C analizadas mediante el perfil de HPLC anterior fueron:

MEM solución (patrón)

Solución de SDS al 0,1% (patrón)

MEM - eliminado de las células

Solución de SDS al 0,1% - células lisadas en los puntos 1, 3, 5, 24, 48, 72, 96 y 168 h.

Resultados

Los resultados de HPLC evidencian actividad punta en las células de hasta 5 horas, indicando la presencia del compuesto 17 ^{14}C . El resto de los periodos de tiempo no produjeron puntas, ya que la relación señal a ruido era muy baja, lo que indicaba que compuesto 17 ^{14}C se había descompuesto en el interior de la célula. Se usó SDS al 0,1% como ensayo para ver si el procedimiento de extracción de las células daba lugar a la degradación del SDS al 0,1%. El análisis del SDS al 0,1% en MEM y SDS sin embargo demostró que es bastante estable en dichas soluciones hasta 5 horas.

La conclusión que se puede alcanzar es que el compuesto 17 ^{14}C es lo suficientemente estable en esas condiciones ambientales para haberse captado en el interior de las células, para degradarse a continuación.

Los experimentos con autoradiografía demuestran que tanto ácido ascórbico ^{14}C como compuesto 17 ^{14}C están asociados con los nódulos en mineralización y no con la monocapa de osteoblastos confluentes de alrededor.

Ejemplo 9

Biodistribución *In vivo* del compuesto 17 ^{14}C

Procedimiento

Se anestesiaron tres ratas con halotano y se inyectaron con 0,2 ml de compuesto 17 ^{14}C en PBS (4 μCi de dosis total; actividad específica 5 mCi/mmol). Tras 60 minutos, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical. Los tejidos se colocaron en viales para centelleo de vidrio pesados previamente, y se añadieron 3 ml de tolueno. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 50°C. A continuación, las muestras se decoloraron con 0,1 ml de Na-EDTA; 0,5 ml H_2O_2 durante toda la noche a 50°C. Finalmente, se añadieron a cada vial 10 ml de Hionic-Fluor (Packard), y los viales se contaron en un contador por centelleo LKB.

Resultados

En este estudio preliminar, la mayor parte de la actividad estaba presente en la sangre, hígado y riñones tras 60 minutos. La medida de la actividad en el fémur demostró 0,041% id/g en la diáfisis y 0,095% id/g en la epífisis, una
5 relación de 2,3, lo que demuestra una mayor recaptación en los vértices del hueso con crecimiento activo.

Los análisis mediante HPLC demostraron que el compuesto es estable en el plasma, por tanto es posible que la recaptación vista sea debida al compuesto ^{17}C intacto.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

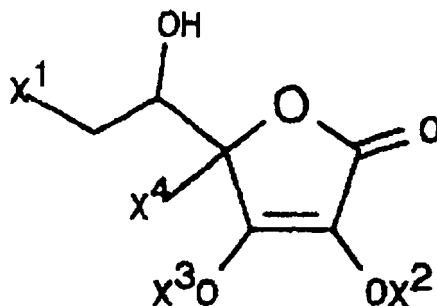
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de formula:



en la que:

X^1 es OH o SH o NH_2 o -L-Z;

X^2 y X^3 son iguales o diferentes y cada uno es H, alquilo C_{1-4} , fluoroalquilo C_{1-4} , bencilo, un grupo protector o -L-Z;

X^4 es H o alquilo C_{1-4} ;

L es un enlazante que comprenden una cadena de 0-10 átomos;

Z es un grupo que comprende un resto que se puede detectar;

con la condición de que dicho compuesto comprenda al menos un resto que se puede detectar, en el que dicho resto que se puede detectar es una sustancia adecuada para diagnóstico por imagen tras administración a un ser humano, seleccionado entre:

- (i). emisores gamma,
- (ii). emisores beta
- (iii). emisores de rayos x de baja energía
- (iv). átomos hiperpolarizados
- (v). restos paramagnéticos,
- (vi). restos radioopacos, o
- (vii). agentes de contraste por ultrasonidos;

con la condición de que cuando el resto que se puede detectar es un metal radioactivo o paramagnético, el metal se compleja con un ligando que se enlaza fuertemente con el metal, y se enlaza al resto de ácido ascórbico.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el resto que se puede detectar comprende un complejo metálico o un agente quelante que comprende 2-10 átomos metálicos donantes enlazados de manera covalente con un esqueleto sin coordinación.

3. El compuesto de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el resto que se puede detectar es un radionucleido.

4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que el radionucleido es un emisor gamma.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que el emisor gamma es $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{123}I .

6. El compuesto de la reivindicación 3, en el que el radionucleido es, ^{123}I , ^{125}I o ^{131}I , y Z es un grupo yodovinilo, o un grupo yodoarilo C_{5-12} .

7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que X^1 es -L-Z.

8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que L es un grupo enlazante que comprende una cadena de 0-10 átomos de carbono, y tiene la fórmula (A)_m

en la que

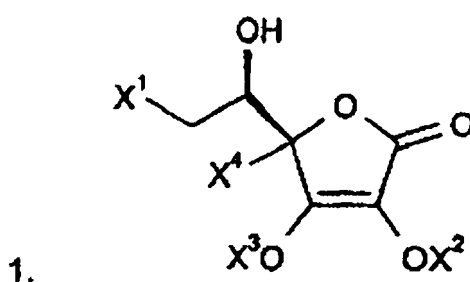
A es -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -NRCO-, -CONR-, -O(CO)-, -(CO)O-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -OCR₂-, -SCR₂-, -NR₂CR₂-, un grupo cicloheteroalquileo C₄₋₈, un grupo cicloalquileo C₄₋₈, un grupo arileno C₅₋₁₂ o un grupo heteroarileno C₃₋₁₂;

m es un número entero con valor comprendido entre 0 y 10;

cada grupo R se selecciona de manera independiente entre H, alquilo C₁₋₄, alqueno C₁₋₄, alquino C₁₋₄, alcóxialquilo C₁₋₄ o hidroxialquilo C₁₋₄.

9. El compuesto de la reivindicación 8, en el que el grupo enlazante comprende una cadena de 0-4 átomos

10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 de fórmula:



11. El compuesto de la reivindicación 10, en el que cada uno de X² y X³ es H.

12. Un compuesto como el que se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en medicina.

13. Un compuesto como el que se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en el diagnóstico o tratamiento de lesiones metastásicas de hueso.

14. El uso de un compuesto como el que se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de un agente para el diagnóstico o tratamiento de lesiones metastásicas de hueso.