



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0616441-2 B1

(22) Data do Depósito: 18/09/2006

(45) Data de Concessão: 02/07/2019



(54) Título: DERIVADOS DE DIAMINO DA BIOTINA E SEUS CONJUGADOS COM AGENTES QUELANTES MACROCÍCLICOS

(51) Int.Cl.: A61K 51/04.

(52) CPC: A61K 51/0497; A61K 51/0495.

(30) Prioridade Unionista: 27/09/2005 EP 05 021034.3.

(73) Titular(es): ALFASIGMA S.P.A..

(72) Inventor(es): PAOLO CARMINATI; MAURO GINANNESCHI; GIOVANNI PAGANELLI; MARCO CHINOL.

(86) Pedido PCT: PCT EP2006066440 de 18/09/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/039437 de 12/04/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/03/2008

(57) Resumo: DERIVADOS DE DIAMINO DA BIOTINA E SEUS CONJUGADOS COM AGENTES QUELANTES MACROCÍCLICOS. A presente invenção refere-se a compostos de fórmula (I); onde os radicais são como definidos na descrição, processos para sua preparação, e seus usos para a preparação de conjugados com radionuclídeos para uso em diagnósticos e terapia em seres humanos e animais de condições patológicas tais como tumores.

08
m

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**DERIVADOS DE DIAMINO DA BIOTINA E SEUS CONJUGADOS COM AGENTES QUELANTES MACROCÍCLICOS**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a biotinas modificadas úteis para a preparação de conjugados com radionuclídeos para uso em diagnósticos e terapia em seres humanos e animais, particularmente para o diagnóstico e tratamento de condições patológicas tais como tumores.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 A terapia tumoral é implementada principalmente através do uso de substâncias com o objetivo de destruir as células cancerígenas. Isto pode ser alcançado com substâncias citotóxicas, que têm que penetrar nas células tumorais a fim de exercer seu efeito integral, ou por meio de tratamento de células tumorais com radiação com suficiente energia para matar as células.

15 Em ambos os casos, o problema principal é administrar a substância de uma maneira seletiva às células alvo, de modo a evitar a possível destruição das células saudáveis circundantes. No caso de rádiofarmacêuticos, isto é, substâncias contendo porções radioativas, o problema de administração seletiva da parte ativa (isto é, a porção radioativa) ao alvo tumoral, evitando

20 tanto quanto possível a difusão do radionuclídeo no corpo ou a interação com as células saudáveis circundando o tumor, é percebido como sendo particularmente importante.

 Para uma discussão de todos esses problemas envolvidos e as soluções propostas até o presente, o leitor é referido às Patentes US

25 5.283.342, 5.608.060 e 5.955.605, concedidas a NeoRx Corporation.

 Nesses documentos é discutido o problema, dentre outros, da resistência da molécula que transporta o radionuclídeo aos ataques metabólicos do corpo. Especificamente, o caso mais cuidadosamente estudado é a molécula de biotina, que é uma das primeiras escolhas para administração

30 de radionuclídeo às células tumorais, graças a sua bem-conhecida interação com as avidinas. A biotina é ligada à porção quelante do radionuclídeo, por exemplo, uma molécula de ácido tetraazaciclododecanotetraacético [DOTA],

via um ligante. Um dos principais problemas relacionados com o uso de conjugados de biotina-DOTA é a resistência do complexo contendo a molécula de biotina, conforme conectado ao radionuclídeo via o ligante, às biotinidas, enzimas que quebram a ligação peptídica contida no complexo. Esta
5 ligação peptídica origina-se da união do agente quelante com a biotina.

Dentre as suas características mais desejadas, este complexo deve ser eliminado rápida e eficientemente do corpo e deve ser suficientemente pequeno (P.M. < 1000) para permitir a fácil distribuição no fluido extracelular onde ele irá se ligar às células tumorais. Em adição, ele deve apresentar provada estabilidade *in vivo* com apenas absorção mínima pelas
10 células tumorais e rápida eliminação (renal) e não deve ser metabolizado.

Além disso, a porção quelante deve ser tal que ela não seja liberada *in vivo*, administrando assim compostos potencialmente tóxicos dentro do corpo. Especialistas no campo estão claramente familiares com o problema da liberação do radionuclídeo pela porção quelante, incluindo íons de
15 metal que são inteiramente estranhos ao corpo, que podem ser dotados de radioatividade de vários tipos e mesmo de radiação de alta energia, que é, portanto, altamente destrutiva.

Em um pedido de patente anterior da mesma requerente (WO
20 02/066075) nosso grupo relatou a síntese de um novo conjugado de biotina-DOTA juntamente com estudos de ligação, estabilidade e afinidade realizados neste novo derivado. A novidade do novo conjugado foi que o grupo amida carboxílica foi reduzido a um metileno gerando assim o derivado de N-aminoexil biotinamido (r-BHD) no qual a amida foi
25 transformada em uma amina secundária sem afetar o comprimento do braço lateral da biotina na ligação Av/Sav. O ligante DOTA, neste composto, estava diretamente ligado ao grupo amino do derivado de biotina-hexametilenodiamina reduzido através de um dos quatro braços laterais de N-acético.

30 Além disso, a flexibilidade sintética de r-BHD permite gerar uma variedade de novos derivados de biotina, por exemplo, com dois quelantes DOTA conjugados à cadeia lateral da biotina com o propósito de aumentar a

eficácia da terapia com radionuclídeo alvo pela administração de dose mais alta de radiação ao tumor.

O Pedido de Patente 2004/0241172, de Axworthy Donald B. et al., descreve derivados de biotina incorporando dois grupos DOTA, através de ligantes específicos, que estão diretamente ligados, através de um grupo benzila, ao núcleo das moléculas de DOTA. Esta modificação do grupo DOTA poderia reduzir a capacidade de ligação da porção quelante.

A fim de melhorar a relação radiação/dose projeta-se e sintetiza-se uma nova classe de derivados de biotina.

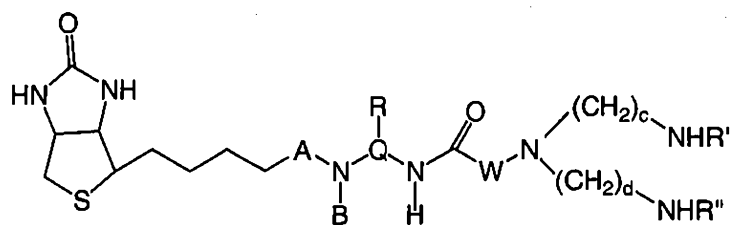
10 DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

O objetivo principal da presente invenção é fornecer novos derivados de biotina que preencham o requerimento de uma alta relação radiação/dose.

Em particular a invenção pertence a uma nova classe de derivados de biotina contendo dois grupos quelantes por molécula de biotina.

Deste modo, usando a mesma quantidade molar de derivado de biotina, a radioatividade que atinge as células tumorais é duplicada.

Portanto, um dos objetos da invenção descrita neste relatório é um composto de fórmula (I) como a seguir:



(I)

onde:

A é CH₂ ou CO;

25 B é H, CHO ou COOH; com a condição de que:

quando A for CH₂, Q é um grupo -(CH₂)_n-, no qual n é um número inteiro de 4 a 12, caso em que R encontra-se ausente; quando A for CO, Q é selecionado do grupo consistindo em -(CH₂)_a-CH(R)- (CH₂)_b-, onde a e b são, independentemente, números inteiros de 0 a n-1 e R é como

definido abaixo;

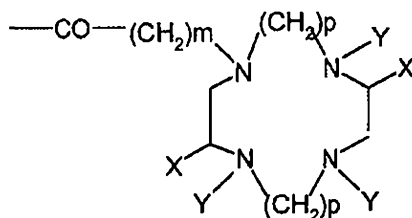
W é um C₁-C₁₂ alquilenos ou C₂-C₁₂ alquenileno de cadeia linear ou um polietileno glicol; ou um resíduo C₆-C₁₀ aromático; ou um resíduo de glicofuranose;

- 5 W, sozinho ou juntamente com o átomo de nitrogênio que suporta as cadeias de $-(CH_2)_c-NHR'$ e $-(CH_2)_d-NHR''$, é um grupo heterocíclico com 5 ou 6 membros contendo um ou mais heteroátomos selecionados de O, N, S;

- quando W for um resíduo aromático, um grupo heterocíclico ou
10 uma porção de açúcar, o átomo de nitrogênio que suporta as cadeias de $-(CH_2)_c-NHR'$ e $-(CH_2)_d-NHR''$ encontra-se opcionalmente ausente e as cadeias de $-(CH_2)_c-NHR'$ e $-(CH_2)_d-NHR''$ encontram-se diretamente e independentemente ligadas aos átomos de carbono ou nitrogênio dos anéis aromáticos ou heterocíclicos ou aos átomos de oxigênio do resíduo de glicofuranose;
15 ranose;

c e d independentemente são números inteiros de 3 a 10;

R' e R'' são, independentemente, $-\Lambda$, onde $-\Lambda$ é um macrociclo de fórmula (II)



(II)

- onde Y são iguais ou diferentes e são selecionados do grupo consistindo em hidrogênio, C₁-C₄ alquila, $-(CH_2)_m-COOH$, onde m é um número inteiro de 1 a 3;

- X é hidrogênio, ou o grupo $-CH_2-U$, onde U é selecionado de metila, etila, p-aminofenila, ou X é o grupo $-(CHJ)_o-Z$, onde o é um número inteiro de 1 a 5, J é hidrogênio, metila ou etila, Z é um grupo heterocíclico com 5 ou 6 membros contendo um ou mais heteroátomos selecionados de
25 O, N-R₁, sendo R₁ um átomo de hidrogênio ou um grupo C₁-C₄ alquila linear

ou ramificado, e S ou Z é selecionado de $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$, ou $-\text{S}-\text{R}_2$ onde R_2 é um grupo C_1-C_4 alquila linear ou ramificado;

p é o número inteiro 2 ou 3;

R é selecionado do grupo consistindo em C_1-C_4 alquila linear ou ramificada, cicloalquila, heterociclo ou $-(\text{CH}_2)_q-\text{T}$, onde T é selecionado do grupo consistindo em $\text{S}-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$, ou $-\text{COOH}$, e q é 0, 1 ou 2.

Grupo C_1-C_4 alquila linear ou ramificado significa metila, etila, propila, isopropila, n-butila, sec-butila, iso-butila ou terc-butila.

Heterociclo com 5 ou 6 membros é heterociclo aromático ou não aromático tendo no anel pelo menos um heteroátomo selecionado de O, N- R_1 , ou S, tais como, por exemplo, 2-, 3- ou 4-piridila, ou 2-, 4-, ou 5-imidazolila.

Reduzir a habilidade de ligação da porção quelante. Um primeiro grupo de compostos preferidos de acordo com a invenção consiste nos compostos de fórmula (I) onde (A) onde A é CH_2 , B é H, Q é $-(\text{CH}_2)_n-$, onde n é um número inteiro de 4 a 8, preferencialmente 6, c e d são ambos 3 ou 6, R' e R'' são $-\Delta$ onde Y é sempre $-\text{CH}_2-\text{COOH}$; X é hidrogênio, e p é 2.

Um objeto adicional da invenção descrita neste relatório consiste nos compostos de fórmula (I) com radioisótopos para uso diagnóstico e/ou terapêutico. Exemplos desses isótopos são: Fe-52, Mn-52m, Co-55, Cu-64, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, In-111, I-123, I-125, I-131, P-32, Sc-47, Cu-67, Y-90, Pd-109, Ag-111, Pm-149, Re-186, Re-188, At-211, Bi-212, Bi-213, Rh-105, Sm-153, Lu-177, e Au-198.

Um primeiro grupo de complexos preferidos de acordo com a invenção são aqueles onde, nos compostos de fórmula (I), A é Fe-52, Mn-52m, Co-55, Cu-64, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, In-111, I-123, I-125, I-131, P-32, Sc-47, Cu-67, Y-90, Pd-109, Ag-111, Pm-149, Re-186, Re-188, At-211, Bi-212, Bi-213, Rh-105, Sm-153, Lu-177, e Au-198, onde n é um número inteiro de 4 a 8, preferencialmente 6, c e d são juntos 3 ou 6, R' e R'' são $-\Delta$ onde Y é sempre $-\text{CH}_2-\text{COOH}$; X é hidrogênio, p é 2 e o radioisótopo é Y-90.

Objetos adicionais da invenção descrita neste relatório são processos de preparação de compostos de fórmula (I) e seus complexos com

radiofarmacêuticos.

Objetos adicionais da invenção descrita neste relatório são composições farmacêuticas e/ou de diagnóstico contendo os compostos de fórmula (I) e seus complexos conforme indicado acima.

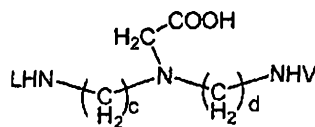
- 5 Outros objetos da invenção descrita neste relatório são o uso dos compostos de fórmula (I) 3 e seus complexos com radioisótopos como medicamentos ou ferramentas de diagnóstico, particularmente para a preparação de medicamentos que são úteis na terapia ou diagnóstico tumoral.

- 10 Esses e outros objetos relacionados com a invenção descrita neste relatório são ilustrados em detalhes na parte a seguir abaixo, também por meio de exemplos experimentais.

Os compostos de acordo com a invenção descrita neste relatório podem ser preparados de acordo com o seguinte esquema, incluindo as etapas de:

- 15 a) formação de uma ligação amida entre o grupo carboxila da biotina e um grupo amina primária de diamina $H_2N-Q-NH_2$, sendo o outro grupo amina primária seletivamente protegido, por exemplo, com um grupo Boc, se necessário, ou, alternativamente, o acoplamento poderia ser realizado com o grupo $\alpha\text{-}\alpha\text{-}NH_2$ de um α,ω -diaminoácido (isto é, Lis), sendo o grupo ω -amino adequadamente protegido.

- 20 b) desproteção do grupo amina primária;
c) redução do grupo amida a uma amina, se A for grupo CH_2 ;
d) acoplamento da amina com as glicina aminas N,N-bis- substituídas N-protégidas de fórmula (III) que podem ser



(III)

- 25 preparadas através de métodos conhecidos dos operadores versados na técnica;

onde V e L são grupos protetores adequados e c e d situam-se

independentemente na faixa de 3 a 10;

e) conjugação com a o agente quelante de fórmula (III) desejado -Λ.

Biotina é um produto comercial, assim como o aminoácido Lis.

- 5 Diaminas $H_2N-Q-NH_2$ estão disponíveis no mercado e podem em qualquer evento ser preparadas em diversas etapas através de métodos conhecidos.

A proteção dos grupos amina primária é facilmente obtida usando-se grupos protetores adequados, tais como, por exemplo, Boc ou Fmoc, e que em qualquer evento podem ser encontrados dentre aqueles relatados na literatura (vide, por exemplo: T.W. Greene, P.G.M. Wuts, "Protective groups in organic synthesis", 3rd Ed., J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1999; Handbook of Reagents for Organic Synthesis, "Oxidizing e Reducing Agents", Edited by S.D. Burke e R.L. Danheiser, J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1999).

- 15 Alternativamente, o composto de fórmula (I) , se A for grupo CO, pode ser preparado de acordo com o esquema relatado acima desprovido da etapa c.

A ativação do grupo $-COOH$ da biotina poderia ser realizado de acordo com métodos conhecidos de síntese de peptídeos (P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides e Proteins", CRC Press, Boca Raton, New York, 1997); se o acoplamento for realizado com um α,ω -diaminoácido (isto é, Lis), a reação pode ser realizada ancorando-se o aminoácido em uma resina adequada, seguindo-se os métodos conhecidos na técnica de síntese de peptídeos em fase sólida.

- 25 A conjugação do composto de acordo com a invenção com o radioisótopo para produzir os complexos considerados no contexto da invenção descrita neste relatório é realizada usando-se os métodos tradicionais no campo, conforme descrito, por exemplo, em Paganelli, Chinol *et al.* *European Journal of Nuclear Medicine* Vol. 26, No 4; Abril 1999; 348-357.

- 30 Um dos compostos preferidos da invenção é um no qual A é um grupo CH_2 , Q é $-(CH_2)_n-$, onde n é preferencialmente 6, c = d são 3 ou 6, R' = R" são -Λ onde m é 1, Y é sempre $-CH_2-COOH$; X é hidrogênio, p é 2 (a-

gente quelante DOTA).

O processo de preparação deste composto preferido compreende as seguintes etapas:

- a) formação de uma ligação amida entre o grupo carboxila da biotina e o grupo amina primária da hexametenodiamina, adequadamente protegido, por exemplo, com um grupo Boc, se necessário;
 - b) desproteção do grupo amina da hexametenodiamina;
 - c) redução do grupo amida a um grupo amina;
 - d) conjugação da amina de fórmula (III) onde $c = d = 3$ ou 6 , $V =$
- 10 L são grupos protetores Fmoc;
- e) desproteção da amina obtida;
 - f) conjugação com o quelante $-\Lambda$.

A etapa a) no processo de acordo com a invenção descrita neste relatório consiste na formação de uma ligação amida entre o grupo carboxila da biotina e o grupo amina primária da hexametenodiamina-Boc. A biotina foi tratada com HATU para formar um éster extremamente ativo *in loco* que reage com o grupo amina da hexametenodiamina-Boc para formar a amida relevante. Este mecanismo de ativação, que é usado acima de tudo para a síntese de peptídeos em fase sólida, requer um meio básico. Para impedir

15 que a base reaja com o éster ativo, são usadas bases orgânicas terciárias tais como diisopropiletilamina (DIPEA) ou N-metilmorfolina (NMM). A proteção de um dos dois grupos amina da hexametenodiamina com Boc (terc-butiloxicarbonila) é necessária para evitar que a biotina se ligue a ambas as extremidades da cadeia de diamina. O produto final é isolado do meio reacional após evaporação do solvente (DMF) e precipitação com água. O produto, recristalizado com propanol, foi caracterizado por RMN- ^1H , análise elementar e ESI-EM. O rendimento da reação situa-se em torno de 88%.

20

25

Na etapa b), biotinil-hexametenodiamina-Boc é solubilizado em uma mistura de AcOEt/HCl, aproximadamente 3 M, para remover o grupo Boc. Após remoção da mistura de solventes, o produto foi liofilizado para eliminar completamente o HCl. A amostra foi purificada por meio de recristalização com uma solução aquosa de pH básico e caracterizada por RMN- ^1H

30

e TLC.

Na etapa c), a redução do grupo amida foi feita com $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$. Uma vez que o agente de redução é extremamente reativo, o processo deve ser realizado em condições anidras. O produto de partida foi mantido sob
5 vácuo antes da reação e então solubilizado em THF anidro (destilado com sódio e benzofenona). A mistura reacional foi refluxada em uma atmosfera de nitrogênio até que tivesse ocorrido completa redução do grupo amida (conforme monitorado por espectro de RMN- ^1H). Após evaporação do sol-
10 vente sob pressão reduzida a mistura nacional foi tratada com uma solução aquosa de HCL. Após a liofilização à solução ácida, o produto foi purificado por recristalização de uma solução aquosa em pH básico e em seguida por cromatografia em coluna de fase inversa. A análise do produto foi feita atra-
vés de TLC analítica que revelou sua pureza. O rendimento da reação é de aproximadamente 55%.

15 A etapa d) forneceu a reação de conjugação da biotinil-hexametilenodiamina com a amina protegida (III) por ativação com o sistema HATU/NMM em NMP como solvente.

Na etapa e) os grupos Fmoc foram removidos através do uso da base piperidina.

20 A etapa f) forneceu o acoplamento de dois grupos DOTA, realizado com os reagentes específicos para a formação de ligações amida em um meio aquoso: cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), e sulfo-NHS. DOTA (4 equivalentes molares com relação ao derivado de biotina) foi dissolvido em água e ajustado a um valor de pH adequado
25 para ativação principalmente de um dos quatro grupos carboxílicos (G. Sabatino, M. Chinol, G. Paganelli, S. Papi, M. Chelli, G. Leone, A. M. Papini, A. DeLuca e M. Ginanneschi, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3170-3173). Deste modo, pode-se reduzir a probabilidade de obtenção de subprodutos. À solução básica foram adicionados sulfo-NHS e finalmente EDC. Após a formação do
30 éster ativo *in loco*, o derivado de N,N-bis-alquilamino ativo foi adicionado, verificando-se se o pH da solução da solução permanecia em torno de 7,5. A pré-purificação do produto bruto foi feita por SPE (Extração em Fase Sólida)

e a purificação foi realizada por meio de RP-HAPLC preparativa.

Os objetos da invenção descrita neste relatório são composições farmacêuticas ou de diagnóstico contendo como seu ingrediente ativo pelo menos um composto de fórmula (I), também na forma de um complexo com radioisótopo ou, no caso do referido composto de fórmula (I), em associação com outros ingredientes ativos úteis no tratamento das doenças indicadas na invenção descrita neste relatório, por exemplo, outros produtos processando atividade anticancerígena; também em formas de dosagem separadas ou em formas adequadas para terapia combinada. O ingrediente ativo de acordo com a invenção estará na forma de uma mistura juntamente com veículos e/ou excipientes adequados comumente usados na tecnologia farmacêutica, tais como, por exemplo, aqueles descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", última edição. As composições de acordo com a invenção deverão conter uma quantidade terapeuticamente eficaz do ingrediente ativo. As dosagens serão determinadas pelo especialista no campo, por exemplo, o clínico ou médico de primeiros cuidados, de acordo com o tipo de doença ser tratada e das condições do paciente, ou concomitantemente com a administração de outros ingredientes ativos.

Exemplos de composições farmacêuticas são aquelas que permitem administração parenteral ou loco-regional. As composições farmacêuticas adequadas para o propósito são as formas em soluções, suspensões ou liofilizadas para serem reconstituídas no momento do uso.

As formas adequadas para a aplicação industrial da invenção são kits para radioterapia do câncer, conforme descrito, por exemplo, na Patente Européia 0 496 074, no ensaio de Paganelli, Chinol *et al.* publicado no *European Journal of Nuclear Medicine* Vol. 26, Nº 4; Abril 1999; 348-357, na Patente US 5.968.405 e na literatura relevante.

Um objeto adicional da invenção descrita neste relatório é um kit para a terapia ou diagnóstico de tumores por meio de radioatividade caracterizado pelo fato de pelo menos um dos componentes do referido kit conter um composto de fórmula (I) ou um de seus complexos com um radioisótopo adequado.

Os compostos de acordo com a invenção são úteis para a preparação de agentes terapêuticos e/ou de diagnóstico para o tratamento e diagnóstico de tumores.

Os compostos de acordo com a invenção, seguindo a ligação com radioisótopos para uso diagnóstico e/ou terapêutico (conforme explicado antes), são úteis para preparações de radiorrotulagem de colóides de avidina para diferentes aplicações médicas.

Por exemplo, eles podem ser usados em métodos de tratamento de tumores com radiofarmacêuticos anticancerígenos, tais como, por exemplo, aqueles descritos na Patente Européia 0 496 074, no ensaio de Paganelli, Chinol *et al.* publicado no *European Journal of Nuclear Medicine* Vol. 26, No 4; Abril 1999; 348-357, na Patente US 5.968.405 e na literatura relevante.

O exemplo seguinte ilustra adicionalmente a invenção.

15 EXEMPLO

PREPARAÇÃO DE BISDOTA-C₃ - COMPOSTO 4

A preparação do Composto 4 foi realizada seguindo as etapas aqui relatadas.

20 SÍNTESE DA BIOTINAMIDOEXILAMINA REDUZIDA (R-BHD) O COMPOSTO 1

O procedimento sintético detalhado e as propriedades físico-químicas do Composto 1 foram relatados no artigo de G. Sabatino, M. Chinol, G. Paganelli, S. Papi, M. Chelli, G. Leone, A. M. Papini, A. De Luca, e M. Ginanneschi, *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 3170-3173. O espectros de RMN do produto aqui relatados foram registrados em solução de DMSO-d₆ no Varian 400. A N,N-bis[3-(Fmoc-amino)propil]glicina do exemplo foi adquirida de Fluka (Suíça) como sal de sulfato de potássio.

SÍNTESE DO CONJUGADO R-BHD COM A N,N-BIS[3-(AMINO)PROPIL]GLICINA - COMPOSTO 2

30 HATU (66.5 mg, 0,175 mmol, 0,7 eq. molar) em NMP (0,5 ml) foram adicionados a uma solução de sulfato de N,N-bis[3-(Fmoc-amino)propil]glicina potássio (115,5 mg, 0,15 mmol, 0,6 eq. molar) e NMM

(33,05 μ l, 0,3 mmol, 1.2 eq. molar) em NMP (1 ml). Esta solução foi adicionada em gotas em 5 min a uma suspensão de r-BHD (Composto 1) (100 mg, 0,25 mmol) em NMP (5 ml) contendo NMM (27,5 μ l, 0,25 mmol, 1 eq. molar). A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente monitorando-se a
5 reação por RP-HPLC (eluente de 30% a 100% de B em 20 min; t_R = 13,4 min). Após 2,5 h, o Composto 1 (57,7 mg, 0,08 mmol, 0,3 eq. molar) foi novamente adicionado à mistura reacional. Após 2,5 h a reação foi interrompida e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O óleo amarelo-laranja foi suspenso em água a 0°C sob agitação obtendo-se um precipitado branco
10 que foi purificado por RP-CC (LiChroprep RP-8, 40-63 μ m; 170x20 mm; eluente: CH₃CN/H₂O/HCl = 50:50:0,1, 1 mL/min) dando o Composto 2 (130 mg; 55% de rendimento). O derivado de bisamino protegido por Fmoc (Composto 2) pareceu ser puro por inspeção por T.L.C. (CH₃CN/H₂O/HCl = 50:50:0,1). RMN-¹H (200 MHz, DMSO): δ 9,63 (br s, 1H), 8,64 (br s, 3H), 7,87 (d, 4H),
15 7,65 (d, 4H), 7,43-7,27 (m, 8H), 6,41 (d, 2H), 4,31-4,14 (m, 8H), 3,85 (s, 2H), 3,14-3,03 (m, 11H), 2,82-2,76 (m, 4H), 2,6 (d, 2H), 1,76-1,25 (m, 20H) ESI-EM (m/e): calculado [M + H]⁺ 944,5, encontrado 944,5.

O derivado de bisamina protegido por Fmoc (Composto 2) (88 mg, 0,9 mmol) foi dissolvido em DMF contendo 25% de piperidina (5 ml). A
20 solução foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 6 h monitorando-se a reação via RP-HPLC (de 30 a 100% de B em 20 minutos; t_R = 16,7 min). A mistura reacional foi então evaporada sob pressão reduzida e o óleo bruto dissolvido na quantidade mínima de MeOH e precipitado com Et₂O. O sólido coletado foi lavado duas vezes com éter, dissolvido em água
25 e liofilizado, fornecendo um produto branco que foi purificado por SPE (Extração em Fase Sólida; LiChroprep RP-18, 25-40 μ m; 170x20 mm; eluente: H₂O 100%-MeOH de 4 a 100%). As frações eluídas foram coletadas e liofilizadas, dando a bisamina desprotegida (Composto 3) (30 mg, 75% de rendimento).

30 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 8,12 (br s, 2H), 6,45 (s, 2H), 4,26 (m, 1H), 4,12 (m, 1H), 3,59-2,95 (m, 7H), 2,95-2,70 (m, 12H), 2,50 (d, 2H), 1,80-1,20 (m, 20H) ESI-EM (m/e): calculado [M + H]⁺ 443,6, encontrado

443,1.

CONJUGAÇÃO DO COMPOSTO 3 COM O DOTA ATIVADO FOR OBTEN-
ÇÃO DE BisDOTA-C₃ COMPOSTO 4

Sulfo-NHS (26 mg, 0,12 mmol) foi adicionado a uma solução de
5 DOTA-0.31H₂O (49,2 mg, 0,12 mmol) em H₂O (0,750 ml). O pH foi ajustado
a 6,5 com NaOH 0,1 M e uma solução de EDC (23 mg, 0,12 mmol) em H₂O
(0,5 ml) foi adicionada em gotas a 0°C.

A mistura reacional foi agitada a 0°C por 30 min e a seguir uma
solução do Composto 3 (15 mg, 0,03 mmol) em H₂O (0,750 ml), em pH 7,8,
10 foi adicionada em gotas durante 5 min.

A reação foi checada via RP-HPLC (de 5 a 100% de B em 30
min; $t_R = 16,4$ min).

Após 2 h a mistura reacional foi liofilizada e o composto bruto foi
pré-purificado por SPE (Extração em Fase Sólida; LiChroprep RP-18, 25-40
15 µm; 15x65 mm; eluentes: a) H₂O; b) 4% de MeOH em H₂O; c) 100% de Me-
OH). Teste com HPLC das frações extraídas demonstraram que o Composto
4 estava principalmente na fração c. A solução metanólica foi evaporada e o
produto purificado por RP-HPLC (de 5 a 30% de B em 30 min; $t_R = 16,4$ min)
obtendo-se o Bis-DOTA puro (Composto 4) (15 mg, 24% de rendimento)
20 como um sólido branco.

ESI-EM: m/e calculado $[M + H]^+$ 1272,7, encontrado 1272,7; $[M -$
 $H]^+$ 1270,7, encontrado 1270,9. Anal. (C₅₆H₁₀₁N₁₅O₁₆S·6TFA·5H₂O) C, H, N.

Foram realizados testes de rotulagem, pureza radioquímica e
testes de estabilidade no soro com o composto ilustrado no exemplo anteri-
25 or.

Os testes de rotulagem foram realizados usando-se 2 mg/ml de
soluções em água MilliQ de BisDOTA-C₃. Tampão de acetato de sódio 1,0
mM (pH 5,0) foi adicionado ao BisDOTA-C₃, que foram subsequente-
mente adicionados com a solução de cloreto do radioisótopo (MCl₃, M=¹¹¹In, ⁹⁰Y,
30 ¹⁷⁷Lu) em uma atividade específica de 1mCi/7,2µg. Finalmente essas solu-
ções foram incubadas a 95°C por 30 min.

Com a finalidade de determinar a Pureza Radioquímica (RCP),

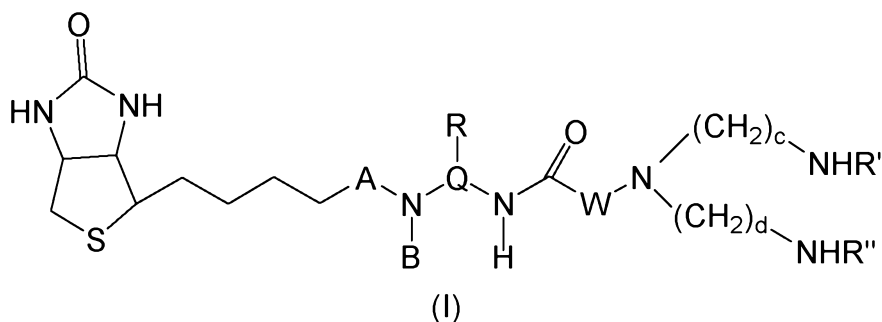
foi usada Cromatografia Instantânea em Camada Delgada de Sílica-gel (I-TLC-SG). Uma alíquota da mistura radiorrotulada foi adicionada a um excesso molar de Avidina e DTPA, a seguir uma gota colocada em tiras de ITLC e desenvolvida com solução salina. A tira foi analisada por um aparelho de Radio-TLC; neste sistema, o complexo formado por *Bis*DOTA- C_3 e Avidina permanece na origem, enquanto que o radiometal não ligado é complexado por DTPA e migra com frente de solvente. Os valores de RCP tipicamente obtidos foram >96%.

Ensaio de estabilidade foram realizados com e sem ácido ascórbico (AA) como removedor de radicais. Alíquotas das moléculas rotuladas foram incubadas a 37°C com um volume de 4 vezes de solução salina ou solução de AA (4 mg/ml em tampão de acetato de sódio 1,0 M, pH 5,0). Foram realizados estudos de estabilidade a 24 e 48 horas e as RCPs foram calculadas usando o método ITLC-SG conforme descrito antes. Os resultados mostraram que, na presença de AA, o M-*Bis*DOTA- C_3 radiorrotulado era estável a radiólise até 48 horas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula

(I):



onde:

5 A é CH₂ ou CO;

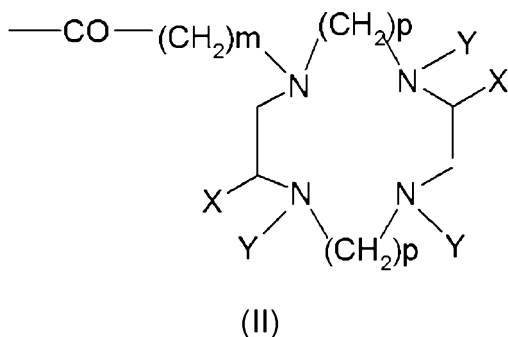
B é H, CHO ou COOH; com a condição de que:

quando A for CH₂, Q é um grupo -(CH₂)_n-, no qual n é um número inteiro de 4 a 12, caso em que R encontra-se ausente; quando A for CO, Q é selecionado do grupo consistindo em -(CH₂)_a-CH(R)- (CH₂)_b-, onde a e b são, independentemente, números inteiros de 0 a n-1 e R é como definido abaixo;

W é um C₁-C₁₂ alquilenos;

c e d independentemente são números inteiros de 3 a 10;

15 R' e R'' são, independentemente, -Λ, onde -Λ é um macrociclo de fórmula (II)



onde Y são iguais ou diferentes e são selecionados do grupo consistindo em hidrogênio, C₁-C₄ alquila linear ou ramificada, -(CH₂)_m-COOH, onde m é um número inteiro de 1 a 3;

20 X é hidrogênio, ou o grupo -CH₂-U, onde U é selecionado de metila, etila, p-aminofenila, ou X é o grupo -(CH₂)_o-Z, onde o é um número

inteiro de 1 a 5, J é hidrogênio, metila ou etila, Z é selecionado de $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$, ou $-\text{S}-\text{R}_2$ onde R_2 é um grupo C_1-C_4 alquila linear ou ramificado;

p é o número inteiro 2 ou 3;

5 R é selecionado do grupo consistindo em C_1-C_4 alquila linear ou ramificada, cicloalquila, heterociclo ou $-(\text{CH}_2)_q-\text{T}$, onde T é selecionado do grupo consistindo em $\text{S}-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$, ou $-\text{COOH}$, e q é 0, 1 ou 2.

2. Composto de fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que independentemente A é CH_2 , B é H, Q é $-(\text{CH}_2)_n-$, onde n é um número inteiro de 4 a 8, preferencialmente 6, c e d são
10 ambos 3 ou 6, R' e R'' são $-\text{A}$ onde Y é sempre $-\text{CH}_2-\text{COOH}$; X é hidrogênio e p é 2.

3. Complexo, caracterizado pelo fato de ser de um composto de fórmula (I) como definido na reivindicação 1 ou 2 com um radioisótopo.

15 4. Complexo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o radioisótopo é selecionado do grupo consistindo em Fe-52, Mn-52m, Co-55, Cu-64, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, In-111, I-123, I-125, I-131, P-32, Sc-47, Cu-67, Y-90, Pd-109, Ag-111, I-131, Pm-149, Re-186, Re-188, At-211, Bi-212, Bi-213, Rh-105, Sm-153, Lu-177 e Au-198.

20 5. Complexo de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato de Q é $-(\text{CH}_2)_n-$, n é um número inteiro de 4 a 8, preferencialmente 6, Y é $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ e o radioisótopo é Y-90.

6. Composição farmacêutica ou de diagnóstico, caracterizada pelo fato de que contém um composto como definido na reivindicação 1 ou
25 2, em uma mistura com veículos e/ou excipientes adequados.

7. Uso do composto como definido na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um fármaco útil no tratamento de tumores.

8. Composição farmacêutica e/ou de diagnóstico, caracterizada
30 pelo fato de que contém um complexo como definido em qualquer uma das reivindicações 3, 4 ou 5 em uma mistura com veículos e/ou excipientes adequados.

9. Uso de um complexo como definido em qualquer uma das reivindicações 3, 4 ou 5, caracterizado pelo fato de ser como um radiofarmacêutico anticancerígeno.

5 10. Kit para a radioterapia ou diagnóstico de tumores, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos componentes do referido kit contém um composto como definido na reivindicação 1 ou um complexo como definido na reivindicação 3.