



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0711937-2 A2**

(22) Data de Depósito: 25/05/2007
(43) Data da Publicação: 24/07/2012
(RPI 2168)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 49/00
A61K 51/00

(54) Título: AGENTE DE FORMAÇÃO DE IMAGEM, PRECURSOR A PREPARAÇÃO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT PARA A PREPARAÇÃO DA MESMA, MÉTODO PARA DIAGNOSE OU FORMAÇÃO DE IMAGEM IN VIVO EM UM INDIVÍDUO DE UM CONDIÇÃO, USO DE AGENTE FORMAÇÃO DE IMAGEM, MÉTODO DE MONITORAÇÃO DO EFEITO DE TRATAMENTO DE UM CORPO DE ANIMAL OU DE HUMANO COM UMA FROGA

(30) Prioridade Unionista: 25/05/2006 GB 0610395.6

(73) Titular(es): GE Healthcare AS, GE Healthcare Limited

(72) Inventor(es): Ben Newton, Daniel Kramer, Jane Brow, Magne Solbakken, Mette Husbyn, Peter Iveson, Rhajiv Bhalla, Salah Chettibi

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT GB2007001964 de 25/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/138291 de 06/12/2007

(57) Resumo: AGENTE DE FORMAÇÃO DE IMAGEM, PRECURSOR PARA A PREPARAÇÃO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT PARA A PREPARAÇÃO DA MESMA, MÉTODO PARA DIAGNOSE OU FORMAÇÃO DE IMAGEM IN VIVO EM UM INDIVÍDUO DE UMA CONDIÇÃO, USO DE AGENTE DE FORMAÇÃO DE IMAGEM, E, MÉTODO DE MONITORAÇÃO DO EFEITO DE TRATAMENTO DE UM CORPO DE ANIMAL OU DE HUMANO COM UMA DROGA. A presente invenção proporciona um novo agente de formação de imagem adequado para a visualização não invasiva de fibrose. Um precursor para a preparação do agente de formação de imagem também é proporcionado pela invenção, bem como uma composição farmacêutica compreendendo o agente de formação de imagem e um kit para a preparação da composição farmacêutica. Em um outro aspecto, uso do agente de formação de imagem para formar imagem in vivo e na preparação de um medicamento para diagnose que compreende fibrose é proporcionado.

“AGENTE DE FORMAÇÃO DE IMAGEM, PRECURSOR PARA A PREPARAÇÃO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT PARA A PREPARAÇÃO DA MESMA, MÉTODO PARA DIAGNOSE OU FORMAÇÃO DE IMAGEM *IN VIVO* EM UM INDIVÍDUO DE UMA CONDIÇÃO, USO DE AGENTE DE FORMAÇÃO DE IMAGEM, E, MÉTODO DE MONITORAÇÃO DO EFEITO DE TRATAMENTO DE UM CORPO DE ANIMAL OU DE HUMANO COM UMA DROGA”

Campo técnico da invenção

A presente invenção refere-se à formação de imagem diagnóstica e em particular à formação de imagem diagnóstica de fibrose. São descritos agentes de formação de imagem diagnóstica que são adequados para este propósito, particularmente para a formação de imagem diagnóstica de fibrose no fígado, coração, rins e pulmões.

Descrição da arte relacionada

Em termos simples, fibrose é tecido de cicatriz e forma parte de todos os processos de "reparo" em tecido. Contudo, por causa de inflamação contínua, infecção e lesão repetida, tecido de cicatriz de fibrose se acumula e não substitui as células "funcionais", acarretando assim função de órgão anormal e eventualmente insuficiência do órgão. Fibrose é um dos maiores processos patológicos clássicos em medicina. É um componente chave de doenças múltiplas que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e inclui doenças tais como:

a) Doenças pulmonares tais como fibrose pulmonar idiopática (fibrose pulmonar de origem desconhecida), asma e doença pulmonar obstrutiva crônica.

b) Escleroderma: uma doença ameaçadora da vida e heterogênea caracterizada por deposição de matriz extracelular excessiva dentro de tecido conjuntivo do corpo (i.e. pele e órgãos viscerais).

c) Cicatriz pós-cirúrgica após transplantação.

d) Retinopatia diabética e degeneração macular relacionada com a idade (AMD) (doenças fibróticas do olho e causa líder de cegueira).

e) Doença cardiovascular incluindo aterosclerose e placa vulnerável.

5 f) Fibrose renal ligada a diabetes, nefropatia diabética e glomerulosclerose.

g) Nefropatia por IgA (causa de insuficiência renal e necessita de diálise e retransplantação).

10 h) Cirrose e atresia biliar (causa líder de fibrose e insuficiência hepática).

i) Infecção de hepatite C.

j) Artrite reumatóide.

k) Doenças autoimunes tal como dermatomiosite.

l) Insuficiência cardíaca congestiva.

15 As manifestações clínicas de fibrose variam amplamente. Tomando como exemplo cirrose, as manifestações clínicas variam de ausência de sintomas, a insuficiência hepática, e são determinadas por ambas a natureza e a severidade da doença hepática subjacente bem como a extensão de fibrose hepática. Até 40% dos pacientes com cirrose são assintomáticos e
20 podem permanecer assim por mais de uma década, mas deterioração progressiva é inevitável uma vez complicações se desenvolvam incluindo ascite, hemorragia varicosa ou encefalopatia. Fibrose e cirrose portanto representam as conseqüências de uma resposta de cicatrização de ferimento prolongada à lesão hepática crônica de uma variedade de causas incluindo
25 doenças virais, autoimunes, induzidas por droga, colestáticas e metabólicas. As causas comuns de cirrose e fibrose hepática incluem dano imune-mediado, anormalidades genéticas, e estado-hepatite não-alcoólica (NASH), que está particularmente associada com diabetes e síndrome metabólica (MS). Há uma incidência alta de MS na população ocidental. Esta síndrome tipicamente

ocorre em indivíduos que são obesos, possuem hiperlipidemia e hipertensão, e muitas vezes acarreta o desenvolvimento de diabetes de tipo II. A manifestação hepática de síndrome metabólica é doença hepática gordurosa não-alcoólica (NAFLD), com uma prevalência estimada nos E.U.A. de 24% da população. Um fígado gorduroso representa o final menos severo de um espectro de NAFLD que pode progredir para NASH e finalmente para cirrose do fígado. O desenvolvimento de fibrose demonstra um risco de tal progresso, e é presentemente avaliado por meio de uma biopsia de fígado. Contudo, biopsia de fígado causa desconforto significativo, não é sem risco e é cara. Ademais, testes de sangue disponíveis para fibrose hepática não são confiáveis em NAFLD.

Fibrose é caracterizada pela secreção excessiva de componentes de matriz extracelular. Esta é causada pela síntese aumentada e degradação diminuída de proteínas de matriz, mais notavelmente de colágeno de tipos I e III. Colágeno de tipos I e III são os componentes maiores de matriz extracelular e são instrumentais no desenvolvimento de fibrose. Níveis altos de colágeno III são observados nos estágios iniciais do processo de fibrose, com colágeno I subsequente se tornando predominante. Numerosos grupos têm descoberto compostos de peptídeo que se ligam em colágeno. Chiang e Kang [J. Clin. Invest. 1997 100(8) 2079-84] e Chiang [Amer. J. Med. Sci. 2000 320(6) 362-67 e 2002 J. Biol. Chem. 277-34896-901] relatam peptídeos sintéticos derivados de seqüências de receptores de colágeno dos tipos I e III, que são encontrados sobre plaquetas e inibem agregação de plaquetas mediada por colágeno e a liberação de ATP. Thomas *et al.* [2005 J. Biol. Chem. 280(24) 22596-605] descrevem Endo180, um receptor que se liga na região C-terminal de colágeno de tipo I. Depraetera *et al.* [1998 Blood 92(11) 4207] relatam dois octapeptídeos cíclicos que inibiram a ligação do fator de Willebrand (vWF) em colágeno de tipo I de humano e de pele de bezerro. Tye *et al.* [2005 J. Biol. Chem. 280(14) 13487-

492] relatam a ligação de peptídeo sintético derivado de sialoproteína óssea recombinante (rBSP) em colágeno de tipo I. WO 2006/054904 refere-se aos agentes de contraste compreendendo vetores selecionadores que se ligam em áreas de formação de colágeno. Estes agentes de contraste são sugeridos como sendo úteis para diagnose e monitoração de tratamento de doenças relacionadas com formação excessiva de colágeno, incluindo, *inter alia*, fibrose.

Existe uma necessidade de outros agentes de formação de imagem para a detecção de fibrose.

10 Sumário da invenção

A presente invenção proporciona um novo agente de formação de imagem adequado para a visualização não invasiva de fibrose. Um precursor para a preparação do agente de formação de imagem também é proporcionado pela invenção, bem como uma composição farmacêutica compreendendo o agente de formação de imagem e um kit para a preparação da composição farmacêutica. Em um outro aspecto, uso do agente de formação de imagem para formar imagem *in vivo* e na preparação de um medicamento para diagnose que compreende fibrose é proporcionado.

Descrição detalhada da invenção

20 Em um primeiro aspecto, a presente invenção proporciona um agente de formação de imagem compreendendo um peptídeo ligante de colágeno (CBP) e um grupo de formação de imagem, no qual citado CBP é selecionado de:

- (i) RRANAALKAGELYKXaaILY
- 25 (ii) GELYKXaaILY
- (iii) DARKSEVQK
- (iv) KELNVLYT
- (v) XaaVWLWEQXaa
- (vi) XaaVWLWENXaa

(vii) XaaVWTLPDQXaa,

(viii) TGELYKXaaILYTLAWKTTARLKELNLVYTT

(ix) Peptídeo recombinante de saratina derivado da salive de sanguessuga medicinal *Hirudo medicinalis*

5 (x) Resíduos 176-201 de decorina

(xi) Análogos de peptídeo de qualquer dos peptídeos (i)-(x)

ou citado CBP é uma versão estabilizada, truncada e/ou cíclica de qualquer um destes peptídeos, ou é um homo- ou heterodímero de dois destes peptídeos ou versões truncadas dos mesmos, e onde Xaa pode ser qualquer um de
10 cisteína, ácido 2-amino-butírico (Abu), metionina ou alanina.

Cada um dos peptídeos (i)-(xi) acima é um ou é derivado de um fragmento de um peptídeo fisiológico possuindo atividade de ligação em colágeno. Preferivelmente, o CBP é um peptídeo de 8-30 meros, e mais preferivelmente um peptídeo de 8- a 20-meros.

15 O agente de formação de imagem da invenção adequadamente se liga em colágeno com uma afinidade menor do que 1 μ M, preferivelmente com uma afinidade menor do que 100 nM e mais preferivelmente com uma afinidade menor do que 10 nM.

O termo "análogo de peptídeo" no contexto de peptídeo (xi) da
20 presente invenção significa peptídeos naturais ou sintéticos compreendendo todos ou parte dos peptídeos (i)-(x) nos quais um ou mais resíduos de aminoácido têm sido substituídos por resíduos de aminoácido alternativos, e que retêm a afinidade por colágeno. Análogos de peptídeo preferidos são peptídeos sintéticos. Com o objetivo de minimizar a alteração de peptídeo, é
25 prática comum substituir apenas uns poucos resíduos de aminoácido e fazer apenas algumas substituições conservativas. A seguinte tabela mostra substituições que são consideradas conservativas:

Resíduo de aminoácido original	Substituições exemplares
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Met
Gln Glu	Asn, Asp
Gly	Ala, Asn
His	Asn, Gln
Ile, Leu	Leu, Val, Ile, Val
Lys	Arg, Gln
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Contudo, qualquer substituição de aminoácido é adequada desde que a afinidade por colágeno seja mantida.

Uma versão "estabilizada" do CBP da presente invenção é um peptídeo de qualquer uma das seqüências (i)-(xi) que tem sido modificado com o propósito de que o peptídeo tenha resistência aumentada à clivagem em plasma. É importante que o CBP permanece intacto *in vivo* de modo que suas propriedades de ligação em colágeno sejam mantidas e o grupo de formação de imagem seja confiavelmente liberado para o alvo.

Um método para estabilizar o CBP é ligar um grupo Z^1 na terminação-N do CBP, e/ou ligar um grupo Z^2 na terminação-C do CBP. O grupo Z^1 substitui o grupo amina do último resíduo de aminoácido. Assim, quando Z^1 é H, a terminação amino do CBP termina em um grupo NH_2 livre do último resíduo de aminoácido. O grupo Z^2 substitui o grupo carbonila do último resíduo de aminoácido. Assim, quando Z^2 é OH, a terminação carboxila de CBP termina no grupo CO_2H livre do último resíduo de aminoácido, e quando Z^2 é OBc (onde Bc é um cátion biocompatível) cujo grupo terminal carboxila está ionizado como um grupo CO_2Bc .

Grupos Z^1 adequados de terminação-N de CBP são bem

conhecidos por aqueles pessoas experientes na arte e são adequadamente escolhidos de: grupos N-acilados -NH[C=O]RG onde o grupo acila -[C=O]RG possui RG escolhido de: grupos C_{1-6} alquila, C_{3-10} arila ou compreende um bloco construtor de polietileno glicol (PEG). Grupos de

5 terminação-N preferidos são acetila, benzil-óxi-carbonila ou trifluoroacetila, mais preferivelmente acetila.

Grupos Z^2 adequados para a terminação-C de CBP incluem: carboxamida, terc-butil-éster, benzil-éster, ciclo-hexil-éster, amino álcool ou um grupo construtor de polietileno glicol (PEG). Tais grupos preferidos são

10 carboxamida ou PEG, tais grupos mais preferidos são carboxamida.

Exemplos adicionais para estabilização de CBP incluem: N-alquilação de resíduos de aminoácido, preferivelmente N-metilação; acetilação de resíduos de aminoácido; incorporação de aminoácidos não-naturais ou de isósteres de ligação amida de outros grupos; adição de outros

15 grupos não facilmente reconhecidos por enzimas de plasma, por exemplo extensão C-terminal com grupos polietileno glicol ou diglicoila; e, conversão da estrutura de peptídeo em sua seqüência retro-inversa, i.e. reversão da seqüência de aminoácidos e substituição de todos os L-aminoácidos por D-aminoácidos.

20 Uma versão "truncada" do CBP da presente invenção é um peptídeo de qualquer uma das seqüências (i)-(xi) no qual entre 1 e 5 aminoácidos estão ausentes da terminação carboxila e/ou amino, desde que a citada versão truncada contenha pelo menos 5 resíduos de aminoácido.

Uma versão "cíclica" do CBP da presente invenção é um CBP

25 que tem sido ciclizado por ponte usando resíduos de cisteína quer presentes quer adicionados na seqüência de peptídeo. Ciclização também pode ser realizada por ciclização de cabeça-em-cauda; i.e. formando uma ligação amida entre o grupo amino N-terminal e o grupo carboxila C-terminal. Onde resíduos de cisteína são adicionados na seqüência de peptídeo, são

preferivelmente adicionados nas extremidades terminais com o objetivo de realizar a ciclização de cabeça-em-cauda. Um outro método para formar um peptídeo cíclico é formar uma ligação entre os dois aminoácidos através de suas cadeias laterais, por exemplo uma lisina e um ácido glutâmico.

5 Peptídeos CPB podem ser obtidos por síntese em fase sólida convencional. Albericio proporciona uma revisão recente das metodologias para síntese de peptídeo em fase sólida [Curr. Opin Cell Biol. 2004 8 211-21].

10 Descrições de peptídeos CPB particulares da invenção podem ser encontrados nas seguintes referências (usando o mesmo esquema de numeração para peptídeos (i)-(x) acima):

- (i) Chiang e Kang 1997 J. Clin. Invest. 100(8) 2079-84
- (ii) Chiang *et al.* 2000 Am. J. Med. Sci. 320(6) 362-7
- (iii) Chiang 2002 J. Biol. Chem. 277 34896-901
- 15 (iv) Chiang 2002 J. Biol. Chem. 277 34896-901
- (v) Depraetere *et al.* 1998 Blood 92(11) 4207-11
- (vi) Depraetere *et al.* 1998 Blood 92(11) 4207-11
- (vii) Pareti *et al.* 1987 J. Biol. Chem. 262(28) 13841
- (viii) Zhu et al 2007 Thromb. Res. 119(1) 111-119
- 20 (ix) Cruz *et al.* 2001 J. Vascular Surgery 34(4) 724-29
- (x) Hunter *et al.* 2001 J. Biomed. Mat. Res. 55(4) 496-502

O termo "agente de formação de imagem" significa um composto planejado para selecionar uma fisiologia ou patofisiologia particular em um mamífero, e que pode ser detectada após sua administração ao corpo do mamífero *in vivo*.

25 No agente de formação de imagem da invenção, o grupo de formação de imagem pode estar presente como uma parte integral do CBP, e.g. um dos átomos do CBP poderia ser ^{11}C em vez de ^{12}C . Alternativamente, o grupo de formação de imagem pode estar conjugado no CBP via um grupo

químico adequado, e.g. um quelato de metal que pode complexar um grupo de formação de imagem que é um íon de metal. Um ligante também pode estar presente ligando o CBP quer no grupo químico apropriado quer diretamente no próprio grupo de formação de imagem. Ligantes da presente invenção são

5 de Fórmula $-(L)_n-$ na qual:

cada L é independentemente $-CO-$, $-CR'_2-$, $-CR'=CR'-$, $-C=C-$, $-CR'_2CO_2-$, $-CO_2CR'_2-$, $-NR'-$, $-NR'CO-$, $-CONR'-$, $-NR' (C=O)NR'-$, $-NR'(C=S)NR'-$, $-SO_2NR'-$, $-NR'SO_2-$, $-CR'_2OCR'_2-$, $-CR'_2SCR'_2-$, $-CR'_2NR'CR'_2-$, um grupo C_{4-8} ciclo-heteroalquileno, um grupo C_{4-8} ciclo-

10 alquileno, um grupo C_{5-12} arileno, um grupo C_{3-12} heteroarileno, um aminoácido, um grupo poli(alquileno-glicol), poli(ácido láctico) ou poli(ácido glicólico);

n é um número inteiro de valor de 0 a 15;

cada grupo R' é independentemente H ou C_{1-10} alquila, C_{3-10} alquil-arila, C_{2-10} alcóxi-alquila, C_{1-10} hidróxi-alquila, C_{1-10} fluoroalquila, ou 2 ou mais grupos R' , juntos com os átomos nos quais estão ligados formam um

15 anel carbocíclico, heterocíclico, saturado ou insaturado, desde que o citado ligante não seja mais longo do que uma cadeia de 30 carbonos.

20 É considerado que os grupos ligantes ramificados também são possíveis, i.e. um grupo ligante $-(L)_n-$ substituído com um outro grupo ligante $-(L)_n-$, que termina com um grupo R' , como definido acima. Tais ligantes ramificados são particularmente úteis no contexto de manipulação da biodistribuição e/ou excreção do agente de formação de imagem da invenção.

25 O termo "aminoácido" significa um L- ou D-aminoácido, análogo de aminoácido (e.g. naftil-alanina) ou mimético de aminoácido que pode ser naturalmente ocorrente ou ser de origem puramente sintética, e pode ser opticamente puro, i.e. um enantiômero único e como consequência quiral, ou uma mistura de enantiômeros. Preferivelmente os aminoácidos da presente

invenção são opticamente puros.

Tais ligantes também possuem aplicação em relação a outros aspectos da invenção como descrito abaixo. Para o propósito de ligação do CBP quer em um grupo químico adequado quer diretamente em um grupo de formação de imagem, grupos L preferidos são -CO-, -CH₂-, -NH-, -NHCO-, -CONH-, -CH₂OCH₂-, e aminoácidos.

Em uma modalidade preferida, o CBP da invenção é selecionado de peptídeos (i)-(vii), listados acima, ou de suas versões estabilizadas, truncadas ou cíclicas, ou homo- ou heterodímeros de dois destes peptídeos ou versões truncadas dos mesmos, onde Xaa é como previamente definido.

Em uma modalidade mais preferida, o CPB da invenção é selecionado de:

(a) peptídeo (i) modificado em um ou mais dos seguintes modos:

- truncado para remover as 2 argininas N-terminais
- Xaa = ácido 2-amino-butírico ou cisteína
- resíduos de alanina metilada
- resíduos de lisina metilada
- substituição de tirosina é com lisina
- adição de cadeia de polietileno glicol e/ou diglicolila na terminação-C;

(b) peptídeo (i) modificado como em (a), e convertido em sua sequência retroinversa;

(c) peptídeo (ii) no qual Xaa = cisteína;

(d) peptídeo (iii) não modificado ou ciclizado por meio de 2 resíduos de cisteína, cada um adicionado nas terminações-N e -C;

(e) peptídeo (iv) não modificado, ou modificado por qualquer uma das ou ambas as seguintes maneiras:

- valina⁵ e leucina⁶ revertidas
- ciclizado por meio de 2 resíduos de cisteína, cada um

adicionado nas terminações-N e -C;

(1) peptídeos (v)-(vii) no qual Xaa = cisteína;

5 e no qual em cada caso a terminação-N é opcionalmente protegida com uma acetila e a terminação-C é opcionalmente protegida com uma amida.

Exemplos de CPBs da invenção mais preferidos são como segue (todos os aminoácidos são L-aminoácidos a não ser que seja indicado
10 de outro modo):

a) ANAALKAGELYKCILY-NH₂

b) ANAALKAGELYK-[Abu]-ILY-NH₂

c) Ac-ANAALKAGELFK-[Abu]-ILY-NH₂

d) Ac-ANAALKAGELYK-[Abu]-ILF-NH₂

15 e) Ac-ANAALKAGELY-[NMeLys]-[Abu]-ILF-NH₂

f) Ac-AN-[NMeAla]-ALKAGELYK-[Abu]-ILF-NH₂

g) Ac-AN-[NMeAla]-ALKAGELY-[NMeLys]-[Abu]-ILF-

NH₂

h) ANAALKAGELYK-[Abu]-ILY-[PEG(41)]-[diglicolil]-NH₂

20 i) ANAALKAGELY-[NMeLys]-[Abu]-ILY-[PEG(41)]-[diglicolil]-NH₂

j) ANAALKAGELYK-[Abu]-ILY-[PEG(4)]-[diglicolil]-

COOH k) D-YLI-[Abu]-KYLEGAKLAANA-NH₂

l) GELYKCILY-NH₂

25 m) DARKSEVQK-NH₂

n) CDARKSEVQKC-NH₂ ciclizado via dois resíduos de cisteína terminais adicionados

o) KELNVLYT-NH₂

p) KELNLVYT-NH₂

q) Ac-KELNLVYT-NH₂

r) Ac-CKELNLVYTC-NH₂ ciclizado por ligação em ponte de dois resíduos de cisteína terminais adicionados

5 s) CVWLWEQC-NH₂ ciclizado por ligação em ponte de resíduos de cisteína

t) CVWLWENC-NH₂ ciclizado por ligação em ponte de resíduos de cisteína

u) CVWTLPDQC-NH₂ ciclizado por ligação em ponte de resíduos de cisteína

10 Na lista acima, "Ac" é um grupo acetila, "Abu" é ácido 2-amino-butírico, "NMeLys" é lisina N-metilada, "NMeAla" é alanina N-metilada, e "PEG(X)" é uma cadeia de polietileno glicol de X unidades.

Em uma modalidade mais preferida, o CBP da invenção é um peptídeo selecionado de (i)-(iv) listado acima, ou suas versões estabilizadas, truncadas ou cíclicas, ou homo- ou heterodímeros de dois destes peptídeos ou
15 versões truncadas dos mesmos, onde Xaa é como previamente definido.

O "grupo de formação de imagem" pode ser detectado quer externamente no corpo humano quer via o uso de detectores planejados para utilização *in vivo*, tal como radiação intravascular ou detectores óticos tais
20 como endoscópios, ou detectores de radiação para uso intra-operativo.

O grupo de formação de imagem é preferivelmente escolhido de:

- (i) um íon de metal radioativo;
- (ii) um íon de metal paramagnético;
- 25 (iii) um não-metal radioativo emissor de raios gama;
- (iv) um não-metal radioativo emissor de pósitron;
- (v) um núcleo RMN-ativo hiperpolarizado; e,
- (vi) um repórter adequado para formação de imagem ótica *in vivo*.

Quando o grupo de formação de imagem é um íon de metal radioativo, i.e. um radiometal, radiometais adequados podem ser quer emissores de pósitron tais como ^{64}Cu , ^{46}V , ^{52}Fe , ^{55}Co , $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ou ^{68}Ga ; quer emissores de raios γ tais como $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ou ^{67}Ga . Radiometais preferidos são $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu , ^{68}Ga e ^{111}In . Radiometais mais preferidos emissores de raios γ , especialmente $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Quando o grupo de formação de imagem é um íon de metal paramagnético, tais íons de metal adequados incluem: Gd(III) , Mn(II) , Cu(II) , Cr(III) , Fe(III) , Co(II) , Er(II) , Ni(II) , Eu(III) ou Dy(III) . Íons de metal paramagnéticos preferidos são Gd(III) , Mn(II) e Fe(III) , com Gd(III) sendo especialmente preferido.

Quando o grupo de formação de imagem é um não-metal radioativo emissor de raios gama, o radio-halogênio é adequadamente escolhido de ^{123}I , ^{131}I ou ^{77}Br . ^{125}I é especificamente excluído porque não é adequado para uso como um grupo de formação de imagem para formar imagem diagnóstica *in vivo*. Um halogênio radioativo emissor de raios gama preferido é ^{123}I .

Quando o grupo de formação de imagem é um não-metal radioativo emissor de pósitron, tais emissores de pósitron incluem: ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{17}F , ^{18}F , ^{75}Br , ^{76}Br ou ^{124}I . Não-metais radioativos emissores de pósitron preferidos são ^{11}C , ^{13}N , ^{18}F e ^{124}I , especialmente ^{11}C e ^{18}F , mais especialmente ^{18}F .

Quando o grupo de formação de imagem é um núcleo RMN-ativo hiperpolarizado, tais núcleos RMN-ativos possuem um *spin* nuclear não-zero, e incluem ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si e ^{31}P . Destes, ^{13}C é preferido. O termo "hiperpolarizado" significa aumento do grau de polarização do núcleo RMN-ativo sobre sua polarização de equilíbrio. A abundância natural de ^{13}C (relativo a ^{12}C) é cerca de 1%, e compostos marcados com ^{13}C adequados estão apropriadamente enriquecidos para uma abundância de pelo menos 5%,

preferivelmente pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 90% antes de serem hiperpolarizados. Pelo menos um átomo de carbono do agente de formação de imagem da invenção está adequadamente enriquecido com ^{13}C , que é subsequenteemente hiperpolarizado.

5 Quando o grupo de formação de imagem é um repórter adequado para formação de imagem ótica *in vivo*, o repórter é qualquer grupo capaz de detecção, quer direta quer indiretamente em um procedimento de formação de imagem ótica. O repórter pode ser um espalhador de luz (e.g. uma partícula colorida ou não colorida), um absorvedor de luz ou um emissor
10 de luz. Mais preferivelmente o repórter é um corante tal como um composto cromóforo ou fluorescente. O corante pode ser qualquer corante que interage com luz no espectro eletromagnético com comprimentos de onda de luz ultravioleta ao infravermelho próximo. Mais preferivelmente o repórter possui propriedades fluorescentes.

15 Repórteres cromofóricos e fluorofóricos preferidos incluem grupos possuindo um sistema de elétrons deslocalizados extensivo, e.g. cianinas, merocianinas, indocianinas, ftalocianinas, naftalocianinas, trifenilmetinas, porfirinas, corantes de pirílio, corante de tiapirílios, corantes de esquarílio, corantes de crocônio, corantes de azulênio, indoanilinas, corantes
20 de benzofenoxazínio, corantes de benzotiafenotiazínio, antraquinonas, naftoquinonas, indatrenos, ftaloilacridonas, trisfenoquinonaes, corantes azo, corantes de transferência de carga intramolecular e intermolecular e complexos de corante, troponas, tetrazinas, complexos de bis(ditioleno), complexos de bis(benzeno-ditiolato), corantes de iodo-anilina, complexos de
25 bis(S,O-ditioleno). Proteínas fluorescentes, tal como proteína fluorescente verde (GFP) e modificações de GFP que possuem diferentes propriedades de absorção / emissão também são úteis. Complexos de certos metais de terra rara (e.g., európio, samário, térbio ou disprósio) são usados em certos contextos, como o são os nanocristais fluorescentes (pontos de quantum).

Exemplos particulares de cromóforos que podem ser usados incluem: fluoresceína, sulforodamina 101 (Vermelho Texas), rodamina B, rodamina 6 G, rodamina 19, verde de indocianina, Cyt, Cy3, Cy 3B, Cy3.5, CyS, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, Azul Marinho, Azul Pacífico, Verde Oregon 88, Verde Oregon 514, tetrametil-rodamina, e Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680; Alexa Fluor 700, e Alexa Fluor 750.

Particularmente preferidos são os corantes que possuem máximo de absorção na região do visível ou do infravermelho próximo (NIR), entre 400 nm e 3 μ m, particularmente entre 600 e 1.300 nm. Modalidades de formação de imagem ótica e técnicas de medição incluem, mas não são limitadas a: formação de imagem luminescente; endoscopia; endoscopia fluorescente; tomografia de coerência ótica; formação de imagem de transmitância; formação de imagem de transmitância resolvida de tempo; formação de imagem confocal; microscopia não-linear; formação de imagem fotoacústica; formação de imagem acústica-ótica; espectroscopia; espectroscopia de refletância; interferometria; interferometria de coerência; tomografia ótica difusa e tomografia ótica difusa mediada por fluorescência (sistemas de domínio de frequência e domínio de tempo, de onda contínua), e medição de espalhamento de luz, absorção, polarização, luminescência, tempo de vida de fluorescência, rendimento quântico, e extinção.

Grupos de formação de imagem preferidos são aqueles que podem ser detectados externamente em uma maneira não invasiva após administração *in vivo*, tal como por meio de SPECT, PET e MR. Grupos de formação de imagem mais preferidos são radioativos, especialmente íons de metal radioativos, halogênios radioativos emissores de raios gama e não-metais radioativos emissores de pósitron, particularmente aqueles adequados para formar imagem usando SPECT ou PET. Para algumas aplicações,

contudo, outros grupos de formação de imagem são preferidos, e.g. para formar imagem AMD grupos de formação de imagem ótica são preferidos.

Agentes de formação de imagem da invenção preferidos não sofrem metabolismo fácil *in vivo*, e como consequência mais preferivelmente exibem uma meia-vida *in vivo* de 60 a 240 minutos em humanos. O agente de formação de imagem é preferivelmente excretado via os rins (i.e. exibe excreção urinária). O agente de formação de imagem preferivelmente exibe uma razão de sinal-para-fundo em focos de doença de pelo menos 1,5, mais preferivelmente de pelo menos 5, com pelo menos 10 sendo especialmente preferido. Onde o agente de formação de imagem compreende um radioisótopo, a depuração de uma metade do nível de pico do agente de formação de imagem que quer está não-especificamente ligado quer está livre *in vivo*, preferivelmente ocorre durante um período menor do que ou igual à meia-vida de decaimento radioativo do radioisótopo do grupo de formação de imagem.

Ademais, o peso molecular do agente de formação de imagem é adequadamente de até 5.000 Daltons. Preferivelmente, o peso molecular está dentro da faixa de 150 a 3.000 Daltons, mais preferivelmente 200 a 1.500 Daltons, com 300 a 800 Daltons sendo especialmente preferido.

Adequadamente, o grupo de formação de imagem é conjugado no CBP via quer sua terminação-N ou -C, quer via qualquer uma das cadeias laterais de aminoácido. Preferivelmente, o grupo de formação de imagem é conjugado no CBP via a terminação-N ou -C do CBP, opcionalmente via um ligante de Fórmula $-(L)_n$ - como descrita acima e preferivelmente um ligante PEG.

Exemplos de agentes de formação de imagem da invenção preferidos são ilustrados abaixo:

#	Agente de formação de imagem
1	$[^{99m}\text{Tc-Quelato II}]\text{-ANAALKAGELYKCILY-NH}_2$
2	$[^{99m}\text{Tc-Quelato II}]\text{-[PEG(12)]-ANAALKAGELYKCILY-NH}_2$
3	$[^{99m}\text{Tc-Quelato II}]\text{-DARKSEVQK-NH}_2$
4	$[^{99m}\text{Tc-Quelato II}]\text{-GELYKCILY}$

5	^{99m} Tc-Quelato II]- [PEG(12)]-GELYKCILY
6	^{99m} Tc-Quelato II]-RRANAALKAGELYK-[Abu]-ILV
7	^{99m} Tc-Quelato II]-CDARKSEVQKC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
8	^{99m} Tc-Quelato II]-KELNLVYT
9	^{99m} Tc-Quelato II]-CVWLWENC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
10	^{99m} Tc-Quelato II]-CVWLWEQC-NH ₂ [ciclizado via resíduos Cys terminais]
11	^{99m} Tc-Quelato II]-CVWTLPDQC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
12	^{99m} Tc-Quelato II]- NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPLKRFPVQ
13	^{99m} Tc-Quelato I]-ANAALKAGELYKCILY-NH ₂
14	^{99m} Tc-Quelato I]-[PEG(12)]-ANAALKAGELYKCI LY-NH ₂
15	^{99m} Tc-Quelato I]-DARKSEVQK-NH ₂
16	^{99m} Tc-Quelato I]-GELYKCILY
17	^{99m} Tc-Quelato I]-[PEG(12)]-GELYKCILY
18	^{99m} Tc-Quelato I]-RRANAALKAGELYK-[Abu]-ILY
19	^{99m} Tc-Quelato I]-CDARKSEVQKC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
20	^{99m} Tc-Quelato I]-KELNLVYT
21	^{99m} Tc-Quelato I]-CVWLWENC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
22	^{99m} Tc-Quelato I]-CVWLWEQC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
23	^{99m} Tc-Quelato I]-CVWTLPDQC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
24	^{99m} Tc-Quelato I]- NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPLKRFPVQ
25	RANAALKAGFLYKCILY ¹²³ I-marcado
26	ALKAGELYK ¹²³ I-marcado
27	GELYKCILY ¹²³ I-marcado
28	ANAALKAG ELYKCILY-NH ₂ ¹²³ I-marcado
29	Ac-KELNLVYT-NH ₂ ¹²³ I-marcado
30	RRANAALKAGELYKCILY ¹⁸ F-marcado
31	ALKAGELYK ¹⁸ F-marcado
32	GELYKCILY ¹⁸ F-marcado
33	ANAALKAGELYKCILY-NH ₂ ¹⁸ F-marcado
34	KELNLVYT-NH ₂ ¹⁸ F-marcado
35	KELNVLYT-NH ₂ ¹²³ I-marcado
36	Ac-CKELNVLYTC-NH ₂ ¹²³ I-marcado [ciclizado via resíduos Cys terminais]
37	Ac-Y-[PEG(4)]-DARKSEVQK ¹²³ I -marcado
38	^{99m} Tc(CO) ₃ -[α-His]-[Ac}-ANAALKAGELYK[Abu]ILY
39	^{99m} Tc-HYNIC-ANAALKAGELYK[Abu]ILY
40	^{99m} Tc-Quelato I- ANAALKAGELYK[Abu]ILY
41	^{99m} Tc-Quelato II- MIVVELTNPLKSSGIENGAFQGMKK
42	^{99m} Tc-Quelato I- ANAALKAGELYK[Abu]ILY-[PEG(4)]-[diglicolol]-NH ₂
43	^{99m} Tc-Quelato I-ANAALKAGELY-[NMeLys]-[Abu]-ILY-[PEG(4)]-[diglicolol]-NH ₂

nos quais Ac, Abu, NMeLys e PEG(X) são como previamente definidos, e α-His é α-histidina.

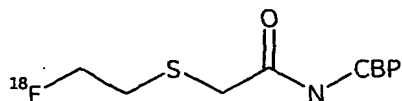
Usando um ensaio *in vitro* (descrito em Exemplo 18), foi demonstrado que afinidade por colágeno para numerosos destes agentes de formação de imagem está na faixa nanomolar, em alguns casos menor do que 50 nM.

Quelato I e Quelato II são descritos com mais detalhe abaixo em relação ao segundo aspecto da invenção. Para Agentes de formação de

imagem 1-12 acima, o ponto de ligação em Quelato II está em um grupo cabeça de ponte (veja Fórmula Ib abaixo). Para Agentes de formação de imagem 13-24 acima, o ponto de ligação em Quelato I está no grupo cabeça de ponte (veja Fórmula IIa abaixo).

5 Para Agentes de formação de imagem 25 e 28 acima, ^{123}I está ligado na cadeia lateral de fenol do resíduo de tirosina mais próximo da terminação-N. Agentes de formação de imagem 25a e 28a também podem ser considerados por meio dos quais o ^{123}I está ligado na cadeia lateral de fenol do resíduo de tirosina alternativo. Para compostos 26, 27 e 29, ^{123}I está ligado
10 na cadeia lateral de fenol do resíduo de tirosina.

Para Agentes de formação de imagem 30-34 acima, ^{18}F está ligado na terminação-N do CBP via copulação de tiol, i.e.:



no qual CBP representa o peptídeo particular em questão. Para mais detalhe sobre este tipo de agente de formação de imagem ^{18}F -marcado, veja descrição
15 abaixo em relação às Fórmulas III, IIIa e IIIb.

Síntese dos agentes de formação de imagem via compostos precursores é descrita com mais detalhe em relação ao segundo aspecto da invenção.

Análise de Agentes de formação de imagem 1, 29, 35, e 36
20 tem demonstrado que estão ligados com afinidade alta em colágeno *in vitro*. Tem sido demonstrado que Agente de formação de imagem 1 possui características de biodistribuição favoráveis como um agente de formação de imagem de fibrose hepática (veja Exemplo 19). Em um modelo em rato de fibrose hepática (ligação de duto biliar; BDL-descrita em Exemplo 20), foi
25 visto que a atividade administrada como Agente de formação de imagem 1 é rapidamente removida da poça de sangue e acúmulo significativo foi observado no fígado de animais BDL comparados com animais falsos em 1 e

2 horas após a injeção.

Em um segundo aspecto, a presente invenção proporciona um precursor para a preparação do agente de formação de imagem da invenção compreendendo um CBP como descrito acima e um grupo químico capaz de reagir com uma fonte de um grupo de formação de imagem, no qual o citado grupo químico compreende:

(i) um ligante sintético capaz de complexar um grupo de formação de imagem metálico;

(ii) um derivado organometálico tal como trialkyl-estano ou um trialkyl-silano;

(iii) um derivado contendo um haleto de alquila, tosilato de alquila ou mesilato de alquila para substituição nucleofílica;

(iv) um derivado que alquila compostos contendo tiol para dar um produto contendo tio-éter,

e no qual o citado grupo químico quer é uma parte integral de citado CBP quer está conjugado em citado CBP.

Um "precursor" compreende um derivado de CBP da invenção, planejado de tal modo que a reação química com uma forma química conveniente do grupo de formação de imagem ocorra sítio-especificamente; pode ser conduzida em um número mínimo de etapas (idealmente uma única etapa); e sem a necessidade de purificação significativa (idealmente sem purificação adicional), para dar o agente de formação de imagem desejado. Tais precursores são sintéticos e podem ser convenientemente obtidos em pureza química boa. O "precursor" pode opcionalmente compreender um ou mais grupos protetores para certos grupos funcionais do CBP.

O termo "grupo protetor" significa um grupo que inibe ou suprime reações químicas indesejáveis, mas que é planejado para ser suficientemente reativo isto é ele pode ser clivado do grupo funcional em

questão sob condições suficientes brancas que não modificam o resto da molécula. Após desproteção o produto desejado é obtido. Grupos protetores são bem conhecidos por aqueles pessoas experientes na arte e são adequadamente escolhidos de, para grupos amina: Boc (onde Boc é terc-butil-óxi-carbonila), Fmoc (onde Fmoc é fluorenil-metóxi-carbonila), trifluoroacetila, alil-óxi-carbonila, Dde [i.e. 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciclohexilideno)-etila] ou Npys (i.e. 3-nitro-2-piridina-sulfenila); e para grupos carboxila: metil-éster, terc-butil-éster ou benzil-éster. Para grupos hidroxila, grupos protetores adequados são: metila, etila ou terc-butila; alcóxi-metila ou alcóxi-etila; benzila; acetila; benzoíla; tritila (Trt) ou trialquil-silila tal como tetrabutil-dimetil-silil. Para grupos tiol, grupos protetores adequados são: tritila e 4-metóxi-benzila. O uso de outros grupos protetores é descrito em 'Protective Groups in Organic Synthesis', Theodor W. Greene e Peter G. M. Wuts, (terceira edição, John Wiley & Sons, 1999).

Preferivelmente, o citado grupo químico capaz de reagir com uma fonte de um grupo de formação de imagem compreende:

(i) um ligante sintético capaz de complexar um grupo de formação de imagem metálico; ou,

(ii) um derivado organometálico tal como trialquil-estano ou um trialquil-silano.

Quando o radioisótopo é um íon de metal radioativo, o radiofármaco preferivelmente compreende um complexo de metal do metal radioativo com um ligante sintético. O termo "complexo de metal" significa um complexo de coordenação do íon de metal como um ou mais ligantes. É fortemente preferido que o complexo de metal seja "resistente à transquelação", i.e não sofra prontamente troca de ligante com outros ligantes potencialmente competidores para os sítios de coordenação de metal. Ligantes potencialmente competidores incluem outros excipientes na preparação *in vitro* (e.g. radioprotetores ou conservantes antimicrobianos usados na

preparação), ou compostos endógenos *in vivo* (e.g. glutathione, transferrina ou proteínas de plasma). O termo "sintético" possui seu significado convencional, i.e. feito pelo homem em oposição a ser isolado de fontes naturais e.g. do corpo de mamífero. Tais compostos possuem a vantagem de
5 que seu perfil de manufatura e impureza possa ser totalmente controlado.

Ligantes adequados para uso na presente invenção que formam complexos de metal resistentes à transquelação incluem: agentes quelantes, onde 2-6, preferivelmente 2-4, átomos doadores de metal estão arranjados de tal modo que anéis de quelato de 5 ou 6 membros resultam (por ter uma
10 estrutura principal não-coordenadora quer de átomos de carbono quer de heteroátomos não-coordenadores ligando os átomos doadores de metal); ou ligantes monodentados que compreendem átomos doadores que se ligam fortemente no íon de metal, tais como isonitrilas, fosfinas ou diazenidas. Exemplos de tipos de átomo doador que se ligam bem em metais como parte
15 de agentes quelantes são: amina, tióis, amidas, oximas, e fosfinas. Fosfinas formam complexos de metal fortes que até mesmo fosfinas monodentadas ou bidentadas formam complexos de metal adequados. A geometria linear de isonitrilas e diazenidas é tal que não tendem elas mesmas prontamente à incorporação em agentes quelantes, e são conseqüentemente tipicamente
20 usadas como ligantes monodentados. Exemplos de isonitrilas adequadas incluem alquil-isonitrilas simples tal como terc-butil-isonitrila, e isonitrilas substituídas com éter tal como MIBI (i.e. 1-isociano-2-metóxi-2-metilpropano). Exemplos de fosfinas adequadas incluem Tetrafosmin, e fosfinas monodentadas tal como tris(3-metóxi-propil)-fosfina. Exemplos de diazenidas
25 adequadas incluem a série HYNIC de ligantes i.e. nicotinamidas ou piridinas substituídas com hidrazina.

Exemplos de agentes quelantes apropriados para tecnécio que formam complexos de metal resistentes à transquelação incluem, mas não são limitados a:

(i) diaminadioximas;

(ii) ligantes N_3S possuindo um conjunto doador de tiol-triamida tal como MAG_3 (mercapto-acetil-triglicina) e ligantes relacionados; ou possuindo um conjunto doador de diamida-piperidina-tiol tal como Pica;

5 (iii) ligantes N_2S_2 possuindo um conjunto doador de diamina-ditiol tal como BAT ou ECD (i.e. dímero de etil-cisteinato), ou um conjunto doador de amida-amina-ditiol tal como MAMA;

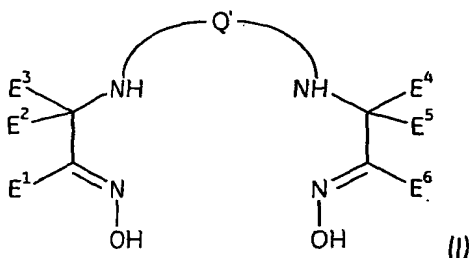
(iv) ligantes N_4 que são ligantes de cadeia aberta ou macrocíclicos possuindo um conjunto doador de tetramina, amida-triamina ou
10 diamida-diamina, tal como ciclam, monoxo-ciclam-dioxo-ciclam;

(v) ligantes N_2O_2 possuindo um conjunto doador de diamina-difenol;

(vi) α -histidina+ $Tc(CO)_3$

15 Agentes quelantes preferidos da invenção para tecnécio são diamina-dioximas e tetraminas, e α -histidina + $Tc(CO)_3$. Em uma modalidade preferida alternativa, um ligante HYNIC é usado na formação de um complexo de tecnécio. Versões preferidas são agora descritas com mais detalhe.

Diamina-dioximas preferidas são de Fórmula (I):



20 onde E^1 - E^6 são cada um independentemente um grupo R^* ;

cada R^* é H ou C_{1-10} alquila, C_{3-10} alquil-arila, C_{2-10} alcóxi-alquila, C_{1-10} hidróxi-alquila, C_{1-10} fluoroalquila, C_{2-10} carbóxi-alquila ou C_{1-10} amino-alquila, ou dois ou mais grupos R^* juntos com os átomos nos quais estão ligados formam um anel carbocíclico, heterocíclico, saturado ou
25 insaturado, e no qual um ou mais dos grupos R^* estão conjugados no CBP;

e Q' é um grupo de ligação em ponte de fórmula $-(J')_e-$;

onde e é 3, 4 ou 5 e cada J' é independentemente -O-, -NR*- ou -C(R*)₂- desde que $-(J')_e-$ contenha um máximo de um grupo J' que é -O- ou -NR*-.

5 Grupos Q' preferidos são os seguintes:

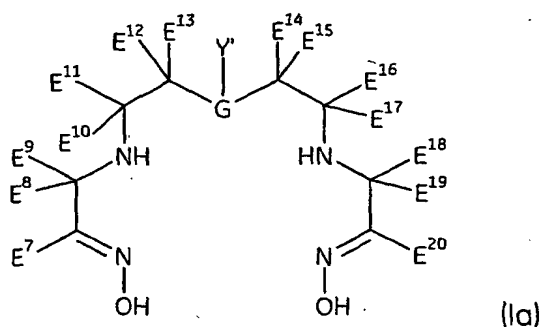
Q' = $-(CH_2)(CHR^*)(CH_2)-$ i.e. derivados de propileno-amina-oxima ou PnAO;

Q' = $-(CH_2)_2(CHR^*)(CH_2)_2-$ i.e. derivados de pentileno-amina-oxima ou PentAO;

10 Q' = $-(CH_2)_2NR^*(CH_2)_2-$.

E¹ a E⁶ são preferivelmente escolhidos de: C₁₋₃ alquila, alquilarila, alcóxi-alquila, hidróxi-alquila, fluoroalquila, carbóxi-alquila ou aminoalquila. Mais preferivelmente, cada grupo E¹ a E⁶ é CH₃.

Conjugação de um CBP em Fórmula I forma um composto precursor. O CBP é preferivelmente conjugado quer no grupo R* de E¹ ou E⁶, quer em um grupo R* do grupo Q'. Mais preferivelmente, é conjugado em um grupo R* do grupo Q'. Quando está conjugado em um grupo R* do grupo Q', o grupo R* está preferivelmente na posição de cabeça de ponte. Neste caso, Q' é preferivelmente $-(CH_2)(CHR^*)(CH_2)-$, $-(CH_2)_2(CHR^*)(CH_2)_2-$ ou $-(CH_2)_2NR^*(CH_2)_2-$, mais preferivelmente $-(CH_2)_2(CHR^*)(CH_2)_2-$. Um composto precursor de diamina-dioxima especialmente preferido possui a Fórmula (Ia):



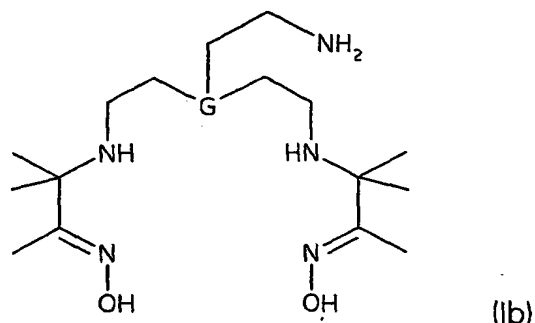
onde:

E^7-E^{20} são cada um independentemente um grupo R^* ;

G é N ou CR^* ;

Y' é $-(L)_n$ -CBP, no qual $-(L)_n$ - é um grupo ligante como previamente definido, e CBP é como previamente definido.

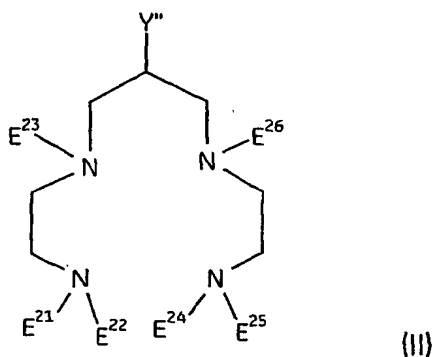
5 Um agente quelante de Fórmula (Ia) preferido é de Fórmula (Ib):



onde G é como definido acima, e é preferivelmente CH (Quelato I; síntese descrita em Exemplo 1);

de tal modo que o CBP é conjugado via o grupo $-CH_2CH_2NH_2$ cabeça de ponte para formar um composto precursor.

10 Compostos precursores preferidos formados com quelantes de tetraamina são de Fórmula II:

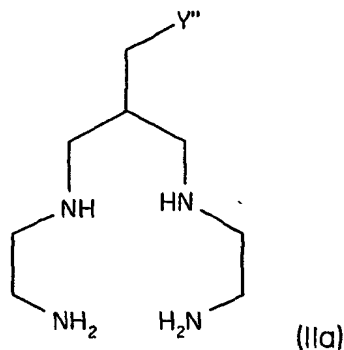


na qual:

15 Y'' é $-(L)_n$ -CPB, na qual $-(L)_n$ - é um grupo ligante como previamente definido e CPB é como previamente definido. Preferivelmente para Y'' , $-(L)_n$ - não contém anéis arila, ajudando a minimizar a lipofilicidade do complexo.

E^{21} a E^{26} são grupos R^* como previamente definidos.

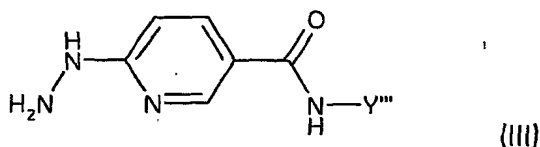
Um composto precursor mais preferido formado com um quelante de tetraamina é de Formula IIa:



na qual Y'' é como definido acima.

5 Um composto precursor especialmente preferido formado com um quelante de tetraamina de Fórmula IIa na qual Y'' é $-\text{CO}-\text{CBP}$ (Quelato II-CBP), no qual CBP é como previamente definido.

Em outra modalidade preferida, o CPB da invenção pode estar marcado com ^{99m}Tc pela preparação de um precursor que é um conjugado do CPB e 6-hidraxino-nicotinamida (HYNIC) de Fórmula III:



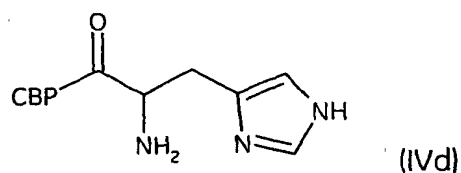
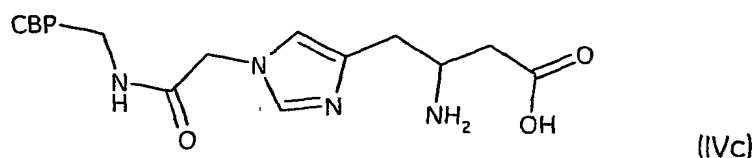
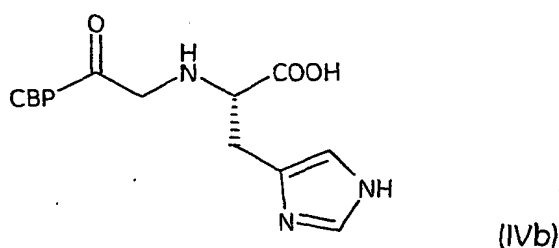
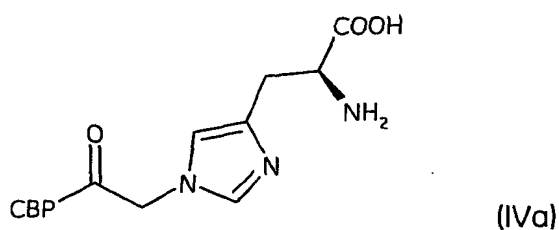
na qual Y''' é $-(L)_n-\text{CPB}$, no qual $-(L)_n-$ é um grupo ligante como previamente definido e CPB é como previamente definido.

Visto que HYNIC pode ocorrer apenas em dois sítios de coordenação, um coligante é requerido com o objetivo de completar a esfera de coordenação de ^{99m}Tc . Coligantes adequados incluem tricina, ou tricina mais um segundo coligante de fosfina ou piridina. Exemplos de coligantes de fosfina incluem trifenil-fosfina-3,3',3''-trissulfonato (TPPTS) de trissódio, trifenil-fosfina-3,3'-dissulfonato (TPPDS) de dissódio e trifenil-fosfina-3-monossulfonato (TPPMS) de sódio. Exemplos de coligantes de piridina incluem ácido nicotínico (NIC), ácido isonicotínico (ISONIC), 2-(4-piridil)-

etil-sulfônico (PES) e ácido piridina-3-sulfônico. Preferivelmente, marcação de precursores de Fórmula III com ^{99m}Tc é realizada onde o coligante é tricina, ou é uma combinação de tricina mais TPPTS.

5 Uma revisão completa de técnicas de radiomarcação envolvendo HYNIC é dada por Liu [Top Curr. Chem. 2005 252 pp117-153].

10 Em ainda uma outra modalidade preferida, o CPB da invenção pode ser adicionalmente marcado com ^{99m}Tc por meio de um precursor no qual um resíduo de histidina é adicionado na terminação-N do CPB, preferivelmente via um ligante acetila. Há maneiras alternativas pelas quais a histidina pode ser ligada no CPB para formar um precursor adequado para marcação com ^{99m}Tc :



nas quais CPB é um CPB da invenção como previamente definido.

Dependendo de como está conjugada, histidina proporciona quer dois quer três sítios de coordenação que podem reagir com $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3-$

(CO)₃]⁺ em uma geometria facial para formar um agente de formação de imagem da invenção. Conjugados preferido proporcionam três sítios de coordenação, i.e. Fórmulas IVa-c acima.

Métodos para preparar tais compostos precursores e agente de formação de imagem são detalhados por Banerjee *et al.* [Nuc. Med. Biol. 2005 32 pp1-20] e por Pak *et al.* [Chem. Eur. J. 2003 9 pp 2053-2061].

Os ligantes descritos acima são particularmente adequados para complexação de tecnécio e.g. ^{94m}Tc ou ^{99m}Tc, e são descritos mais completamente por Jurisson *et al.* [Chem.Rev., 99, 2205-2218 (1999)]. Os ligantes também são úteis para outros metais, tais como cobre (⁶⁴Cu ou ⁶⁷Cu), vanádio (e.g. ⁴⁸V), ferro (e.g. ⁵²Fe), ou cobalto (e.g. ⁵⁵Co).

Outros ligantes adequados são descritos em Sandoz WO 91/01144, que inclui ligantes que são particularmente apropriados para índio, ítrio e gadolínio, especialmente ligantes de ácido amino-fosfônico e de amino-carboxilato macrocíclico. Ligantes que formam complexos de metal não-iônico (i.e. neutro) de gadolínio são conhecidos e são descritos em US 4885363. Particularmente preferidos para gadolínio são quelantes incluindo DTPA, ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA), ácido trietilenotetraamino-hexaacético (TTNA), ácido 1,4,7, 10-tetraaza-ciclo-dodecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 10-(2-hidróxi-propil)-1,4,7,10-tetraaza-ciclo-dodecano-1,4,7-triacético (DO3A) e derivados destes.

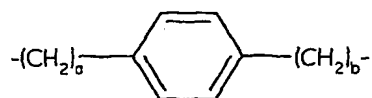
É considerado que o papel do grupo ligante -(L)_n- é para distanciar o complexo de tecnécio relativamente volumoso, que resulta em coordenação de metal, do sítio ativo do CBP de modo que e.g. a ligação em substrato não seja prejudicada. Isto pode ser realizado por uma combinação de flexibilidade (e.g. cadeias alquila simples), de maneira que o grupo volumoso tenha a liberdade para se posicionar longe do sítio ativo e/ou rigidez de tal modo como um espaçador ciclo-alquila ou arila que orienta o complexo de metal para longe do sítio ativo. A natureza do grupo ligante também pode ser

usada para modificar a biodistribuição do complexo de tecnécio resultante do conjugado. Assim, e.g. a introdução de grupos éter no ligante ajudará a minimizar a ligação de proteína de plasma, ou o uso de grupos ligantes poliméricos tal como poli(alquilenoglicol), especialmente polietileno glicol (PEG) pode auxiliar a prolongar o tempo de vida do agente no sangue *in vivo*.

Grupos ligantes $-(L)_n-$ preferidos no contexto destes quelantes possuem uma cadeia de estrutura principal (i.e. os átomos ligados que compõem o grupo $-(L)_n-$) que contém 2 a 10 átomos, mais preferivelmente 2 a 10 átomos, mais preferivelmente 2 a 5 átomos, com 2 ou 3 átomos sendo especialmente preferidos. Uma cadeia de estrutura principal de grupo ligante mínima de 2 átomos confere a vantagem de que o quelante está bem separado do grupo selecionador biológico de modo que qualquer interação é minimizada. Ademais, o CBP provavelmente não competirá efetivamente com a coordenação do quelante no íon de metal. Nesta maneira, ambas as características de seleção biológica do CBP, e a capacidade de complexação de metal do quelante são mantidas. É fortemente preferido que o CBP seja ligado no quelante em uma tal maneira que a ligação não sofra metabolismo fácil no sangue. Isto é porque tal metabolismo resultaria na clivagem do complexo de metal de formação de imagem antes de o CBP marcado alcançar o sítio alvo *in vivo* desejado. O CBP é portanto preferivelmente covalentemente ligado nos complexos de metal da presente invenção via grupos ligantes $-(L)_n-$ que não são prontamente metabolizados. Tais ligações adequadas são ligações de carbono-carbono, ligações amida, ligações uréia ou tio-uréia, ou ligações éter.

Grupos ligantes de não-peptídeo tais como grupos alquilenos ou grupos arílenos possuem a vantagem de que não há interações de ligação de hidrogênio significativas com o CBP conjugado de modo que o ligante não embrulha o CBP. Grupos espaçadores alquilenos preferidos são $-(CH_2)_q-$ onde q é um número inteiro de valor de 2 a 5. Preferivelmente q é 2 ou 3.

Espaçadores arileno preferidos são de Fórmula:



onde: a e b são cada um independentemente 0,1 ou 2.

Um grupo Y' ou Y'' preferido é portanto $-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{L})_p-\text{CBP}-$, onde p é um número inteiro de valor 0 a 3. Mais preferivelmente, $-(\text{L})_p-$ é -CO- ou -NR-. Para Fórmula I, quando G é N e $-(\text{L})_p-$ é -NH-, este agrupamento possui a vantagem adicional de que ele provém do intermediário simétrico $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_3$, que está comercialmente disponível.

Quando o metal de formação de imagem é tecnécio, o material inicial de tecnécio normal é pertecnetato, i.e. TcO_4^- que é tecnécio no estado de oxidação Tc(VII). O próprio pertecnetato não forma complexos de metal, por isso a preparação de complexos de tecnécio normalmente requer a adição de um agente redutor adequado tal como íon estanoso para facilitar a complexação por redução do estado de oxidação do tecnécio para os estados de oxidação inferiores, normalmente Tc(I) a Tc(V). O solvente pode ser orgânico ou aquoso, ou suas misturas. Quando o solvente compreende um solvente orgânico, o solvente orgânico é preferivelmente um solvente biocompatível, tal como etanol ou DMSO. Preferivelmente o solvente é aquoso, e é mais preferivelmente solução salina isotônica.

Onde o grupo de formação de imagem é radioiodo, precursores preferidos são aqueles que compreendem um derivado que quer sofre iodação eletrofílica ou nucleofílica quer sofre condensação com um aldeído ou uma cetona marcado(a). Exemplos da primeira categoria são:

(a) derivados organometálicos tais como trialquil-estanano (eg. trimetil-estanila ou tributil-estanila), ou um trialquil-silano (eg. trimetil-silila) ou um composto de organoboro (e.g. ésteres de boronato ou organotrifluoroboratos);

(b) um brometo de alquila não-radioativo para troca de

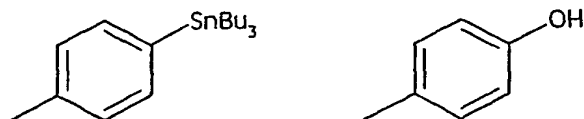
halogênio ou tosilato, mesilato ou triflato de alquila para iodação nucleofílica;

(c) anéis aromáticos ativados para iodação nucleofílica (e.g. sal de aril-iodônio, sais de aril-diazônio, aril-trialquil-amônio ou derivados de nitro-arila.

- 5 O precursor preferivelmente compreende: um átomo de halogênio não-radioativo tal como um iodeto ou brometo de arila (para permitir troca de radioiodo); um composto precursor organometálico (e.g. composto de trialquil- estanho, trialquil-silila ou de organoboro); ou um precursor orgânico tal como triazenos ou um bom grupo de saída para substituição nucleofílica tal como um sal de iodônio. Preferivelmente para radioiodação, o precursor compreende um composto precursor organometálico, mais preferivelmente trialquil-estanho.

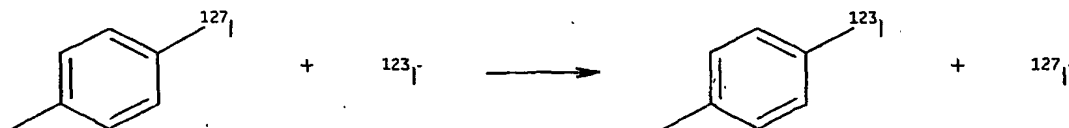
15 Precursores e métodos de introdução de radioiodo em moléculas orgânicas são descritos por Bolton [J. Lab.Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002)]. Compostos de organoboro de éster de boronato adequados e sua preparação são descritos por Kabalka *et al.* [Nucl.Med.Biol., 29, 841-843 (2002) e 30, 369-373(2003)]. Organotrifluoroboratos adequados e sua preparação são descritos por Kabalka *et al.* [Nucl. Med.Biol., 31, 935-938 (2004)].

- 20 Exemplos de grupos arila nos quais iodo radioativo ser ligados são descritos abaixo:



- 25 Ambos contêm substituintes que permitem fácil substituição de radioiodo no anel aromático. Onde houver resíduos de tirosina já presentes na seqüência de peptídeo CBP, radioiodação pode ser realizada usando o grupo fenol inerente. Em uma estratégia alternativa, um resíduo de tirosina pode ser adicionado na seqüência de peptídeo para radioiodação, desde que as características de ligação em colágeno não sejam prejudicadas.

Substituintes alternativos contendo iodo radioativo podem ser sintetizados por iodação direta via troca de radio-halogênio, e.g.



O átomo de radioiodo é preferivelmente ligado via uma ligação covalente direta em um anel aromático tal como um anel benzeno, ou um grupo vinila porque é sabido que átomos de iodo ligados em sistemas alifáticos saturados são propensos ao metabolismo *in vivo* e por isso perdem o radioiodo.

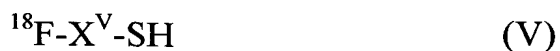
Radiofluoração pode ser realizada via marcação direta usando a reação de flúor ^{18}F com um grupo químico adequado no precursor possuindo um grupo de saída adequado, tal como um brometo de alquila, mesilato de alquila ou tosilato de alquila. ^{18}F também pode ser introduzido por alquilação de grupos N-halo-acetila com um reagente $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$, para dar derivados de $-\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_3^{18}\text{F}$. Para sistemas de arila, deslocamento nucleofílico de fluoreto ^{18}F de um sal de aril-diazônio, composto de aril-nitro ou um sal de aril-amônio quaternário são rotas adequadas para derivados de aril- ^{18}F .

Um composto marcado com ^{18}F da invenção pode ser obtido pela formação de ^{18}F fluoro-dialquil-aminas e formação de amida subsequente quando a ^{18}F -fluoro-dialquil-amina é reagida com um precursor contendo, e.g. cloro, $\text{P}(\text{O})\text{Ph}_3$ ou um éster ativado.

Uma outra abordagem para radiofluoração, que é particularmente adequada para radiofluoração de peptídeos, é descrita em WO 03/080544 e usa copulação de tiol. Um composto precursor de CBP de uma das seguintes fórmulas:



com um composto de Fórmula V:



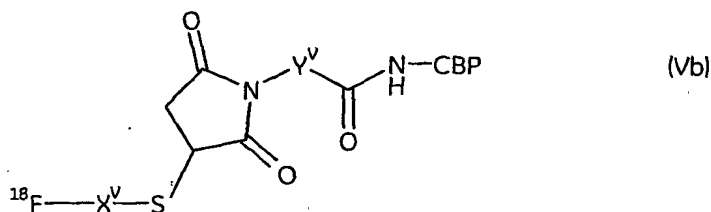
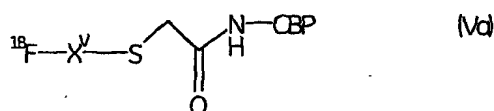
na qual

Y^{V} é um ligante de Fórmula $-(\text{L})_{\text{o}}-$ na qual L é como previamente definido, o é 1-10 e opcionalmente inclui 1-6 heteroátomos;

5 X^{V} é um ligante de Fórmula $-(\text{L})_{\text{p}}-$ na qual L é como previamente definido, p é 1-30 e opcionalmente inclui 1 a 10 heteroátomos; e,

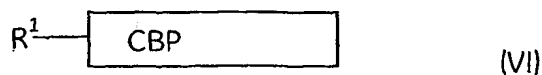
CBP é um peptídeo ligante de colágeno como previamente definido;

10 para dar agentes de formação de imagem radiofluorados de Fórmula (Va) ou (Vb) respectivamente:



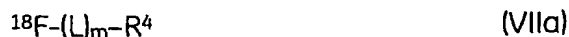
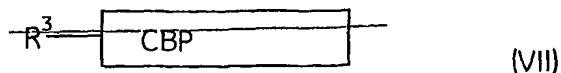
nas quais X^{V} e Y^{V} são como definidos acima, e CBP é um peptídeo ligante de colágeno como previamente definido.

15 Uma abordagem adicional particularmente adequada para radiofluoração de peptídeos é descrita em WO 04/080492 e faz uso de copulação de amino-oxila. Radiofluoração é realizada pela reação de um composto precursor de CBP de Fórmula (VI) com um composto de Fórmula (VIa):



ou,

pela reação de um composto precursor de CBP de Fórmula (VII) com um composto de Fórmula (VIIa)



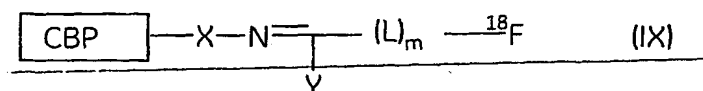
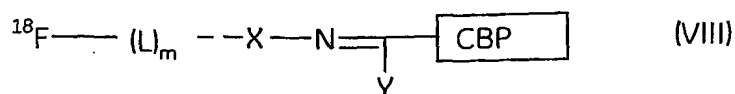
na qual;

R^1 é um grupo aldeído, um grupo cetona, um aldeído protegido tal como um acetal, uma cetona protegida, tal como um cetel, ou uma funcionalidade, tal como um diol ou resíduo de serina N-terminal, que pode ser rápida e eficientemente oxidado usando um agente oxidante;

R^2 é um grupo funcional que, sob condições brandas tal como tampão aquoso, reaja sítio-especificamente com R^1 dando um conjugado estável. R^2 pode ser derivados de amônia tais como amina primária, amina secundária, hidroxil-amina, hidrazina, hidrazida, amino-oxila, fenil-hidrazina, semicarbazida, ou tiosemicarbazida, e é preferivelmente um grupo hidrazina, hidrazida ou amino-oxila;

R^3 é um grupo funcional que reage sítio-especificamente com R^4 . R^3 pode ser derivados de amônia; tais como amina primária, amina secundária, hidroxil-amina, hidrazina, hidrazida, amino-oxila, fenil-hidrazina, semicarbazida, ou tiosemicarbazida, e é preferivelmente um grupo hidrazina, hidrazida ou amino-oxila;

R^4 é um grupo aldeído, um grupo cetona, um aldeído protegido tal como um acetal, uma cetona protegida, tal como um cetel, ou uma funcionalidade, tal como um diol ou resíduo de serina N-terminal, que pode ser rápida e eficientemente oxidado usando um agente oxidante; para dar um conjugado de Fórmula (VIII) ou (IX), respectivamente:



nas quais X é -CO-NH-, -NH-, -O-, -NHCONH-, ou -NHCSNH-, e é preferivelmente -CO-, NH-, -NH- ou -O-; Y é H, substituintes alquila ou arila, e nos quais L é como previamente definido e m é 0-10.

Outros detalhes das rotas de síntese para derivados marcados com ^{18}F são descritos por Bolton, J.Lab.Comp.Radiopharm., 45, 485-528 (2002).

Precusores são sintetizados primeiro por montagem do CPB relevante. Peptídeos podem ser montados em uma escala de 0,1 em resina de amida MBHA-Rink (0,58 mmol/g), usando um sintetizador AB1433A.

Derivados de Fmoc aminoácido são ativados *in situ* em um excesso molar de 10 vezes usando HBTU-HOBt-DIEA em NMP e Fmoc é desprotegido em solução de piperidina 20% / NMP. Após a montagem a resina é transferida para uma aparelhagem borbulhadora de N_2 para copulação de um grupo químico capaz de reagir com um grupo de formação de imagem, como definido acima. Testes de Kaiser são realizados para garantir conversão de 100% para o composto precursor. Clivagem do suporte sólido e remoção de quaisquer grupos protetores de cadeia lateral são efetuadas simultaneamente. TFA excessivo é depois removido em vácuo e compostos precusores são precipitados pela adição de dietil-éter. Compostos precusores brutos são liberados como um sólido branco seguido de trituração com dietil-éter. O resíduo é dissolvido em TFA 0,1% / MeCN: H_2O (1:1), liofilizado, purificado por HPLC e analisado por LC-MS.

Os seguintes são exemplos de compostos precusores preferidos da presente invenção (retendo numeração de agentes de formação

de imagem correspondentes):

#	Precursor
1	[Quelato II]-ANAALKAGELYKCILY-NH ₂
2	[Quelato II]-PEG12-ANAALKAGELYKCILY-NH ₂
3	[Quelato II]-DARKSEVQK-NH ₂
4	[Quelato II]-GELYKCILY
5	[Quelato II]-[PEG(12)]-GELYKCILY
6	[Quelato II]-RRANAALKAGELYK-[Abu]-ILY
7	[Quelato H]-CDARKSEVQKC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
8	[Quelato II]-KELNLVYT
9	[Quelato II]-CVWLWENC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
10	[Quelato II]-CVWLWEQC-NH ₂ [ciclizado via resíduos Cys terminais]
11	[Quelato U]-CVWTLPDQC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
12	[Quelato II]- NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPLKRFPVQ
13	[Quelato I]-ANAALKAGELYKCILY-NH ₂
14	[Quelato I]-[PEG(12)]-ANAALKAGELYKCILY-NH ₂ ,
15	[Quelato I]-DARKSEVQK-NH ₂
16	[Quelato I]-GELYKCILY
17	[Quelato I]-[PEG(12)]-GELYKCILY
18	[Quelato I]-RRANAALKAGELYK-[Abu]-ILY
19	[Quelato I]-CDARKSEVQKC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
20	[Quelato I]-KELNLVYT
21	[Quelato I]-CVWLWENC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
22	[Quelato I]-CVWLWEQC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
23	[Quelato I]-CVWTLPDQC [ciclizado via resíduos Cys terminais]
24	[Quelato I]- NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPLKRFPVQ
38	α -His-[Ac]-ANAALKAGELYK-[Abu]-ILY
39	HYNIC-ANAALKAGELYK-[Abu]-ILY
40	Quelato I-ANAALKAGELYK-[Abu]-ILY
41	Quelato II-MIVVELTNPLKSSGIENGAFQGMKK
42	Quelato I-ANAALKAGELYK-[Abu]-ILY-[PEG(4)]1-[diglicolil]-NH ₂
43	Quelato I-ANAALKAGELY-[NMe-Lys]-[Abu]-ILY-[PEG(41)]-[diglicolil]-NH ₂

Em um terceiro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo o agente de formação de imagem como descrito acima, junto com um veículo biocompatível, em uma forma adequada para administração a mamífero. Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica é uma composição radiofarmacêutica.

O "veículo biocompatível" é um fluido, especialmente um líquido, no qual o agente de formação de imagem está suspenso ou dissolvido, de tal modo que a composição seja fisiologicamente tolerável, i.e. possa ser administrada ao corpo de mamífero sem toxicidade ou desconforto indevido. O meio veículo biocompatível é adequadamente um líquido veículo injetável tal como água estéril para injeção livre de pirogênio; uma solução aquosa tal

como solução salina (que pode ser vantajosamente equilibrada de modo que o produto final para injeção seja quer isotônico quer não hipotônico); uma solução aquosa de uma ou mais substâncias ajustadoras de tonicidade (e.g. sais de cátions de plasma com contra-íons biocompatíveis), açúcares (e.g. glicose ou sacarose), álcoois de açúcar (e.g. sorbitol ou manitol), glicóis (e.g. glicerol), ou outros materiais de poliálcool não-iônicos (e.g. poli(etileno-glicóis), poli(propileno-glicóis) e semelhantes). O meio veículo biocompatível também pode compreender solventes orgânicos biocompatíveis tal como etanol. Tais solventes orgânicos são úteis para solubilizar formulações ou compostos mais lipofílicos. Preferivelmente o meio veículo biocompatível é água para injeção livre de pirogênio, solução salina isotônica ou uma solução aquosa de etanol. O pH do meio veículo biocompatível para injeção intravenosa está adequadamente dentro da faixa de 4,0 a 10,5.

Tais composições farmacêuticas são adequadamente fornecidas em qualquer recipiente que é proporcionado com uma vedação que é adequada para perfuração única ou múltipla com uma agulha hipodérmica (e.g. um fecho de vedação de septo crimpado) enquanto mantém a integridade estéril. Tais recipientes podem conter uma dose ou múltiplas doses para paciente. Recipientes de múltiplas doses preferidos compreendem um único frasco volumoso (e.g. de volume de 10 a 30 cm³) que contém múltiplas doses para paciente, deste modo doses individuais para paciente podem ser portanto removidas para dentro de seringas de grau clínico em vários intervalos de tempo durante o tempo de vida viável da preparação para adequar à situação clínica. Seringas pré-enchidas são projetadas para conterem uma dose única para humano, ou "dose unitária", e são portanto preferivelmente uma seringa descartável ou outra seringa adequada para uso clínico. Onde, a composição farmacêutica é uma composição radiofarmacêutica, a seringa pré-cheia pode ser opcionalmente proporcionada com uma blindagem de seringa para proteger o operador da dose radioativa. Tais blindagens de seringa

radiofarmacêutica adequadas são conhecidas na arte e preferivelmente compreendem quer chumbo quer tungstênio.

Os fármacos da presente invenção podem ser preparados a partir de kits, como é descrito no quarto aspecto abaixo. Alternativamente, podem ser preparados sob condições de manufatura asséptica para dar o produto estéril desejado. Os fármacos também podem ser preparados sob condições não-estéreis, seguido por esterilização terminal usando e.g. irradiação gama, autoclave, calor seco ou tratamento químico (e.g. com óxido de etileno). Preferivelmente, os fármacos da presente invenção são preparados a parti de kits.

Como descrito acima em relação à primeira modalidade, para as composições radiofarmacêuticas, os grupos de formação de imagem radioativos mais preferidos da invenção são ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{11}C e ^{18}F .

Em um quarto aspecto, a presente invenção proporciona kits para a preparação dae composições farmacêuticas da terceira modalidade. Tais kits compreendem um precursor adequado da segunda modalidade, preferivelmente na forma estéril não-pirogênica, de modo que a reação com uma fonte estéril de um grupo de formação de imagem dê o fármaco desejado com um número mínimo de manipulações. Tais considerações são particularmente importantes no caso de radiofármacos, em particular de radiofármacos onde o radioisótopo possui uma meia-vida relativamente curta, para facilitar o manuseio e como consequência dose de radiação reduzida para o radiofármaco. Por isso, o meio de reação para reconstituição de tais kits é preferivelmente um "veículo biocompatível" como definido acima, e é mais preferivelmente aquoso.

Recipientes de kit adequados compreendem um recipiente vedado que permite manutenção de integridade estéril e/ou segurança radioativa, mais opcionalmente um gás inerte de espaço confinante (e.g. nitrogênio ou argônio), enquanto que permite adição e remoção de soluções

por seringa. Um tal recipiente preferido é um frasco vedado por septo, no qual o fecho impermeável a gás é crimpado com uma sobrevedação (tipicamente de alumínio). Tais recipientes possuem a vantagem adicional de que o fecho pode suportar vácuo se desejado e.g. para mudar o gás de espaço confinante ou desgaseificar soluções.

Aspectos preferidos do precursor quando empregado no kit são como descritos para a segunda modalidade acima. Os precursores para uso no kit podem ser empregados sob condições de manufatura asséptica para dar o material estéril, não-pirogênico desejado. Os precursores também podem ser empregados sob condições não-estéreis, seguido por esterilização terminal usando e.g. irradiação gama, autoclave, calor seco ou tratamento químico (e.g. óxido de etileno). Preferivelmente, os precursores são empregados em forma estéril, não-pirogênica. Mais preferivelmente os precursores estéreis, não-pirogênicos são empregados no recipiente vedado como descrito acima.

O precursor do kit é preferivelmente fornecido covalentemente ligado em uma matriz de suporte sólido como descrito acima em relação à segunda modalidade.

Para ^{99m}Tc , o kit é preferivelmente liofilizado e é projetado para ser reconstituído com ^{99m}Tc -pertechnetato (TcO_4^-) estéril de um gerador de radioisótopo ^{99m}Tc para dar uma solução adequada para administração a humano sem manipulação adicional. Kits adequados compreendem um recipiente (e.g. frasco vedado com septo) contendo o agente quelante não-complexado, junto com um agente redutor farmacologicamente aceitável tal como ditionito de sódio, bissulfito de sódio, ácido ascórbico, ácido formamidina-sulfínico, íon estanoso, Fe(II) ou Cu(I) ; junto com pelo menos um sal de um ácido orgânico fraco com um cátion biocompatível. O termo "cátion biocompatível" significa um contra-íon positivamente carregado que forma um sal com um grupo ionizado, negativamente carregado, onde o citado contra-íon positivamente carregado também é não-tóxico e como

consequência adequado para administração ao corpo de mamífero, especialmente ao corpo de humano. Exemplos de cátions biocompatíveis adequados incluem: os metais alcalinos sódio ou potássio; os metais alcalino-terrosos cálcio e magnésio; e o íon amônio. Os cátions biocompatíveis preferidos são sódio e potássio, mais preferivelmente sódio.

Os kits para preparação de agentes de formação de imagem de complexo de metal radiometálico podem opcionalmente adicionalmente compreender um segundo ácido orgânico fraco ou seu sal com um cátion biocompatível, que funciona como um transquelante. O transquelante é um composto que reage rapidamente para formar um complexo fraco com o radiometal, então é deslocado pelo quelante do kit. Para tecnécio, isto minimiza o risco de formação de tecnécio hidrolisado reduzido (RHT) devido à redução rápida de pertecnetato competindo com complexação de tecnécio. Tais transquelantes adequados são os ácidos orgânicos fracos e seus sais descritos acima, preferivelmente tartaratos, gliconatos, glico-heptanatos, benzoatos, ou fosfonatos, preferivelmente fosfonatos, mais especialmente difosfonatos. Um tal transquelante preferido é MDP, i.e. ácido metileno-difosfônico, ou um seu sal com um cátion biocompatível.

Também em relação aos kits para a preparação de complexos de radiometal, uma alternativa ao uso do quelante na forma livre, o kit pode opcionalmente conter um completo de metal não-radioativo do quelante que, sob adição do radiometal, sofre transmetalção (i.e. troca de ligante) dando o produto desejado. Tais complexos desejados para transmetalção são complexos de cobre ou de zinco.

O agente redutor farmacêuticamente aceitável no kit de agente de formação de imagem de ^{99m}Tc é preferivelmente um sal estanoso tal como cloreto estanoso, fluoreto estanoso ou tartarato estanoso, e pode estar na forma quer anidra quer hidratada. O sal estanoso é preferivelmente cloreto estanoso ou fluoreto estanoso.

Os kits podem opcionalmente compreender componentes adicionais tais como um radioprotetor, conservante antimicrobiano, agente ajustador de pH ou carga.

5 O termo "radioprotetor" significa um composto que inibe reações de degradação, tais como processos redox, pelo aprisionamento de radicais livres elevadamente reativos, tais como radicais livres contendo oxigênio decorrentes da radiólise de água. Os radioprotetores da presente invenção são adequadamente escolhidos de: ácido ascórbico, ácido para-amino-benzóico (i.e. ácido 4-amino-benzóico), ácido gentísico (i.e. ácido 2,5-
10 di-hidróxi-benzóico) e seus sais com um cátion biocompatível. O "cátion biocompatível" e suas modalidades preferidas são como descrito acima.

O termo "conservante antimicrobiano" significa um agente que inibe o crescimento de microorganismos potencialmente nocivos tais como bactérias, leveduras ou bolores. O conservante antimicrobiano também pode
15 exibir algumas propriedades bactericidas, dependendo da dose. O papel principal do(s) conservante(s) antimicrobiano(s) da presente invenção é inibir o crescimento de qualquer tal microorganismo na composição radiofarmacêutica após reconstituição, i.e. no próprio produto diagnóstico radioativo. O conservante antimicrobiano pode, contudo, também ser
20 opcionalmente usado para inibir o crescimento de microorganismos potencialmente nocivos em um ou mais componentes do kit não-radioativo da presente invenção antes da reconstituição. Conservante(s) antimicrobiano(s) adequado(s) inclui (incluem): os parabenos, i.e. metil-, etil-, propil- ou butil-parabeno ou suas misturas; benzil-álcool; fenol; cresol; cetrimida e tiomersal.
25 O(s) conservante(s) antimicrobiano(s) preferido(s) é (são) parabenos.

O termo "agente ajustador de pH" significa um composto ou uma mistura de compostos úteis para garantir que o pH do kit reconstituído esteja dentro de limites aceitáveis (aproximadamente de pH 4,0 a 10,5) para administração a mamífero ou humano. Tais agentes ajustadores de pH

adequados incluem tampões farmacologicamente aceitáveis, tais como tricina, fosfato ou TRIS [i.e. tris(hidróxi-metil)-amino-metano], e bases farmacologicamente aceitáveis tais como carbonato de sódio, bicarbonato de sódio ou suas misturas. Quando o precursor é empregado em forma de sal ácido, o agente ajustador de pH pode ser opcionalmente proporcionado em um frasco ou recipiente separado, de modo que o usuário do kit pode ajustar o pH como parte de um procedimento de multietapas.

O termo "carga" significa uma agente encorpante farmacologicamente aceitável que pode facilitar o manuseio do material durante a produção e a liofilização. Cargas adequadas incluem sais inorgânicos tal como cloreto de sódio, e açúcares ou álcoois de açúcar solúveis em água tais como sacarose, maltose, manitol ou trealose.

Os agentes de formação de imagem da invenção são úteis para formar imagem *in vivo*. Conseqüentemente, em um quinto aspecto, a presente invenção proporciona um agente de formação de imagem da invenção para uso em um método de formação de imagem ou diagnóstico *in vivo*, e.g. SPECT ou PET. Preferivelmente o citado método refere-se à formação de imagem *in vivo* de uma condição na qual formação de colágeno está supra-regulada e portanto possui utilidade na diagnose de condições associadas com fibrose, tais como fibrose pulmonar idiopática, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, escleroderma, retinopatia diabética, AMD, aterosclerose, placa vulnerável, nefropatia diabética, glomerulosclerose, nefropatia por IgA, fibrose hepática, artrite reumatóide e insuficiência cardíaca congestiva. Mais preferivelmente, o citado método de formação de imagem ou diagnóstico *in vivo* é um método útil na diagnose de doença pulmonar obstrutiva crônica, retinopatia diabética, AMD, aterosclerose, placa vulnerável, nefropatia diabética, glomerulosclerose, fibrose hepática e insuficiência cardíaca congestiva, especialmente preferivelmente de fibrose hepática.

Este aspecto da invenção também proporciona um método

para a formação de imagem ou diagnose *in vivo* em um indivíduo de uma condição na qual formação de colágeno está supra-regulada, compreendendo administração prévia da composição farmacêutica do terceiro aspecto da invenção. O citado indivíduo é preferivelmente um mamífero e mais preferivelmente um humano. Em uma modalidade alternativa, este aspecto da invenção adicionalmente proporciona o uso do agente de formação de imagem da invenção para formar imagem *in vivo* de uma condição na qual formação de colágeno está supra-regulada na qual o citado indivíduo é previamente administrado com a composição farmacêutica do terceiro da invenção.

"Previamente administrado" significa que a etapa de envolver o clínico, na qual o fármaco é dado ao paciente e.g., injeção intravenosa, já tem sido realizada. Este aspecto da invenção também inclui o uso de agente de formação de imagem de primeira modalidade para manufatura de fármaco para a formação de imagem diagnóstica *in vivo* de uma condição na qual formação de colágeno está supra-regulada.

Em um sexto aspecto a invenção proporciona um método de monitoração do efeito de tratamento de um corpo de animal ou de humano com uma droga para combater uma condição na qual a formação de colágeno está supra-regulada, o citado método compreendendo administrar ao citado corpo um agente de formação de imagem da invenção e detectar a captação de citado agente de formação de imagem, citadas administração e detecção opcionalmente mas preferivelmente sendo efetuadas repetidamente, e.g. antes, durante e após tratamento com a citada droga.

Descrição breve dos exemplos

Exemplo 1 descreve a síntese de Quelato I.

Exemplo 2 descreve a síntese de derivado de glutarilamida de Quelato I.

Exemplo 3 descreve a síntese de Quelato II.

Exemplos 4 a 17 descrevem a síntese de Agentes de formação de imagem 1, 3, 8, 10, 29, e 35 a 43.

Exemplo 18 descreve um método para avaliar a afinidade de ligação em colágeno *in vitro* dos agentes de formação de imagem da invenção.

Exemplo 19 descreve a biodistribuição *in vivo* de Agente de formação de imagem 1 da invenção em um modelo animal de fibrose hepática.

Exemplo 20 descreve um modelo *in vivo* adequado para avaliação do potencial de compostos para formação de imagem de fibrose hepática (modelo de ligação de duto biliar).

Exemplos

Lista de abreviações usadas em Exemplos

Acm	acetamidometila
ACN	acetonitrila
AcOH	ácido acético
BDL	ligação de duto biliar
Boc	t-butóxi-carbonila
DCM	diclorometano
DIEA	diisopropil-etil-amina
DMI-	dimetil-formamida
ESI-MS	espectrometria de massa com ionização por pulverização de elétrons
HBTU	hexafluoro-fosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-urônio
HOBt	N-hidróxi-benzotriazol
HPLC	cromatografia líquida de desempenho alto
IR	infravermelho
LC-MS	cromatografia líquida-espectrometria de massa
MS	espectrometria de massa
N MM	N-metil-morfolina
NMP	N-metil-pirrolidona
RMN	ressonância magnética nuclear
OtBu	t-butil-éster
PyAOP	hexafluoro-fosfato de (7-aza-benzotriazol-1-il-óxi)-tripirrolidino-fosfônio
RF	fração de retenção
s.c	subcutâneo
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetraidrofurano
TLC	cromatografia em camada fina
Trt	trifenil-metila

Exemplo 1: Síntese de Quelato I [bis[N-(1,1-dimetil-2-N-hidróxi-imina-propil)-2-amino-etil-(2-amino-etil)-metano]
(Etapa a): Preparação de tris(metil-óxi-carbonil-metil)-metano

Dimetil-éster de ácido 3-(metóxi-carbonil-metileno)-glutárico (89 g, 267 mmol) em metanol (200 ml) foi agitado com (paládio 10% sobre carbono: água 50%) (9 g) sob uma atmosfera de gás hidrogênio (350 kPa) por (30 h). A solução foi filtrada através de terra diatomácea e concentrado em
 5 vácuo para dar dimetil-éster de ácido 3-(metóxi-carbonil-metileno)-glutárico, rendimento (84,9 g, 94%).

RMN ^1H (CDCl₃), δ 2,48 (6H, d, J=8Hz, 3xCH₂), 2,78 (1H, hexteto, J=8Hz CH,) 3,7 (9H, s, 3xCH₃).

RMN ^{13}C (CDCl₃), δ 28,6, CH; 37,50, 3xCH₃; 51,6, 3xCH₂; 172,28,3xCOO.

10 (Etapa b): Amidação de trimetil-éster com p-metóxi-benzil-amina

Tris(metil-óxi-carbonil-metil)-metano [2 g, 8,4 mmol] foi dissolvido em p-metóxi-benzil-amina (25 g, 178,6 mmol). A aparelhagem foi configurada para destilação e aquecida para 120°C por 24 horas sob fluxo de nitrogênio. O progresso da reação foi monitorado pela quantidade de metanol
 15 coletada. A mistura reacional foi esfriada para a temperatura ambiente e 30 ml de acetato de etila foram adicionados, então do produto de triamida foi agitado por 30 min. A triamida foi isolada por filtração e o bolo do filtro foi lavado várias vezes com quantidades suficientes de acetato de etila para remover excesso de p-metóxi-benzil-amina. Após secagem 4,6 g, 100%, de
 20 um pó branco foram obtidos. O produto elevadamente insolúvel foi usado diretamente na etapa seguinte sem purificação ou caracterização adicional.

(Etapa c): Preparação de 1,1,1-tris[2-(p-metóxi-benzil-amino)-etil]-metano.

Em um frasco de fundo redondo de 3 bocas de 1.000 ml esfriado em um banho de gelo-água a triamida da etapa 2(a) (10 g, 17,89
 25 mmol) é cuidadosamente adicionada em 250 ml de solução de borano 1 M (3,5 g, 244,3 mmol). Após adição completa o banho de gelo-água é removido e a mistura reacional é lentamente aquecida para 60°C. A mistura reacional é agitada a 60°C por 20 horas. Uma amostra da mistura reacional (1 ml) foi retirada, e misturada com 0,5 ml de HCl 5 N e deixada em repouso por 30

min. Na amostra 0,5 ml de NaOH 50 foi adicionado, seguido por 2 ml de água e a solução foi agitada até que todo o precipitado branco dissolvesse. A solução foi extraída com éter (5 ml) e evaporada. O resíduo foi dissolvido em acetonitrila em uma concentração de 1 mg/ ml e analisado por MS. Se mono-
 5 e diamida ($M+H/z = 520$ e 534) são vistas no espectro de MS, a reação não está completa. Para completar a reação, mais 100 ml de solução 1 M de borano em THF são adicionados e a mistura reacional é agitada por mais 6 horas a 60°C e uma amostra nova é retirada seguindo o procedimento de amostragem prévio. Adição extra de borano 1 M em solução de THF é
 10 continuada até a conversão completa para a triamina.

A mistura reacional é esfriada para a temperatura ambiente e HCl 5 N é lentamente adicionado, [CUIDADO: ocorre formação vigorosa de espuma!]. HCl foi adicionado até não ser mais observada evolução de gás. A mistura foi agitada por 30 min e então evaporada. O bolo foi suspenso em
 15 solução aquosa de NaOH (20-40%, 1:2 p/v) e agitada por 30 minutos. A mistura foi então diluída com água [3 volumes]. A mistura foi então extraída com dietil-éter [2 x 150 ml] [CUIDADO: não use solventes halogenados]. As fases orgânicas combinadas foram então lavadas com água (1x 200 ml), salmoura (150 ml) e secas sobre sulfato de magnésio. Rendimento após
 20 evaporação: 7,6 g, 85% como óleo.

RMN $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$, δ : 1,45, (6H, m, $3\times\text{CH}_2$; 1,54, (1H, septeto, CH); 2,60 (6H, t, $3\times\text{CH}_2\text{N}$); 3,68 (6H, s, ArCH_2); 3,78 (9H, s, $3\times\text{CH}_3\text{O}$); 6,94(6H, d, $6\times\text{Ar}$), 7,20(6H, d, $6\times\text{Ar}$).

RMN $^{13}\text{C}(\text{CDCl}_3)$, δ : 32,17, CH; 34,44, CH_2 ; 47,00, CH_2 ; 53,56, ArCH_2 ;
 25 55,25, CH_3O ; 113,78, Ar; 129,29, Ar; 132,61, Ar; 158,60, Ar.

(Etapa d): Preparação de 1,1,1-tris(2-amino-etil)-metano.

1,1,1-tris[2-(p-metóxi-benzil-amino)-etil]-metano (20,0 gramas, 0,036 mol) foi dissolvido em metanol (100 ml) e $\text{Pd}(\text{OH})^2$ (5,0 gramas) foi adicionado. A mistura foi hidrogenada (300 kPa, 100°C , em um

autoclave) e agitada por 5 horas. Pd(OH) foi adicionado em mais duas porções (2 x 5 g) após 10 e 15 horas respectivamente.

A mistura reacional foi filtrada e o filtrado foi lavado com metanol. A fase orgânica combinada foi evaporada e o resíduo foi destilado sob vácuo (1×10^{-2} , 110°C) para dar 2,60 gramas (50%) de 1,1,1-tris(2-amino-etil)-metano.

RMN ^1H (CDCl₃), δ 2,72 (6H, t, 3xCH₂N), 1,41 (H, septeto, CH), 1,39 (6H, q, 3xCH₂).

RMN ^{13}C (CDCl₃), δ 39,8 (CH₂NH₂), 38,2 (CH₂), 31,0 (CH).

10 (Etapa e): Preparação de Quelato I

Em uma solução de tris(2-amino-etil)-metano (4,047 g, 27,9 mmol) em etanol seco (30 ml) foi adicionado carbonato de potássio anidro (7,7 g, 55,8 mmol, 2 eq) na temperatura ambiente com agitação vigorosa sob uma atmosfera de nitrogênio. Uma solução de 3-cloro-3-metil-2 nitroso-butano (7,56 g, 55,8 mmol, 2 eq) foi dissolvido em etanol seco (100 ml) e 75 ml desta solução foram gotejados lentamente para dentro da mistura reacional. A reação foi seguida por TLC sobre sílica [placas corridas em diclorometano, metanol, amônia concentrada (0,88 s); 100/30/5 e a placa de TLC foi revelada por pulverização de ninidrina e aquecimento]. Os produtos mono-, di- e tri-
alquilados foram vistos com RF's aumentando naquela ordem. HPLC analítica foi corrida usando coluna de fase reversa RPR em um gradiente de acetonitrila de 7,5-75% em amônia aquosa de 3%. A reação foi concentrada em vácuo para remover o etanol e ressuspensa em água (110 ml). A lama aquosa foi extraída com éter (100 ml) para remover um pouco do composto trialquilado e impurezas lipofílicas deixando o produto mono- e dialquilado desejado na camada aquosa. A solução aquosa foi tamponada com acetato de amônio (2 eq, 4,3 g, 55,8 mmol) para garantir cromatografia boa. A solução aquosa foi armazenada a 4°C durante a noite antes da purificação por HPLC preparativa automatizada.

Rendimento (2,2 g, 6,4m mol, 23%).

Espectro de massa; Voltagem de cone de 10 V de íon positivo. Verificado: 344; calculado M+H= 344.

RMN ^1H (CDCl_3), δ 1,24(6H, s, 2x CH_3), 1,3(6H, s, 2x CH_3), 1,25-1,75(7H, m, 3x CH_2 ,CH), (3H, s, 2x CH_2), 2,58 (4H, m, CH_2N), 2,88(2H, t CH_2N_2), 5,0 (6H, s, NH_2 , 2xNH, 2xOH).

RMN ^1H ((CD_3) $_2\text{SO}$) δ 1,1 4xCH; 1,29, 3x CH_2 ; 2,1 (4H, t, 2x CH_2);

RMN ^{13}C ((CD_3) $_2\text{SO}$), δ 9,0 (4x CH_3), 25,8 (2x CH_3), 31,0 2x CH_2 , 34,6 CH_2 , 56,8 2x CH_2N ; 160,3, C=N.

10 Condições de HPLC: vazão 8 ml/min usando uma coluna PRP de 25 mm

A=solução de amônia 3% (peso específico = 0,88) /água; B = Acetonitrila

Tempo	%B
0	7,5
15	75,0
20	75,0
22	7,5
30	7,5

Carregar 3 ml de solução aquosa por corrida, e coletar em uma janela de tempo de 12,5-13,5 min.

15 **Exemplo 2: Síntese do derivado de glutarilamida de Quelato I [bis[(1,1-dimetil-2N-hidróxi-imina-propil)-2-amino-etil]-(2-(glutarilamida)-etil)-metanol**

Quelato I (0,5 g, 1,45 mmol) em acetonitrila seca (50 ml) e trietil-amina (150 m g, 1,45 mmol) sob uma atmosfera de nitrogênio foi esfriado em um banho de gelo para 0°C. Anidrido glutárico (165 m g, 1,45 mmol) foi adicionado na reação agitada e permitido aquecer para a temperatura ambiente e deixado agitar durante a noite. O precipitado que formou durante a noite foi coletado por filtração e seco em vácuo para dar uma amostra impura do composto do título (267 m g, 0,583m mol, 40%). O filtrado foi concentrado em vácuo para dar um vidro incolor que junto com o precipitado que havia sido coletado foi redissolvido em 0,880 grama de amônia 5%, água (50 ml) e purificado por HPLC preparativa automática.

Condições de HPLC: vazão 8 ml/min, usando uma coluna PRP de 150 mm x 25 mm. Amostra carregada em 2 ml de solução por corrida.

A = solução de amônia 3% (sp.gr = 0,88) /água.

B = Acetonitrila

Tempo	%B
0	7,5
15	75,0
20	75,0
22	7,5
31	7,5

- 5 O produto requerido eluiu a 15,25-16,5 min. A solução de produto foi evaporada em vácuo para dar (304 mg, 0,68mmol, 47%) de uma espuma vítrea incolor de p.f. de 54,8°C. O produto foi analisado como uma mancha sobre ambas TLC e HPLC analítica.

10 RMN ¹H(DMSO), 0,7(12H, s, 4xCH₃), 0,85(4H, m, 2xCH₂), 1,0(1H, m, CH), 1,3(6H, s, 2xCH₃), 1,3(4H, m, 2xCH₂), 1,6(2H, m, CH₂), 1,75 (6, m, 3xCH₂), 2,6(2, m, 2xOH) 3,2 (2H, t, NH) 7,3(1H, t, NH).

RMN ¹³C(CD₃SO) 8,97, 20,51, 20,91, 25,09, 25,60, 31,06, 33,41, 33,86, 56,89, 66,99 160,07, 1712,34, 174,35 174,56

M/S C₂₂H₄₃N₅O₅ M+H = 457 Verificado 457,6

- 15 **Exemplo 3: Síntese de terc-butil-éster de ácido (8-amino-2-[[terc-butoxi-carbonil-(2-terc-carbonil-amino-etil)-amino]-metil]-octil)-(2-terc-butil-óxi-carbonil-amino-etil)-carbâmico (Quelato II protegido com Boc).**

Etapa (a): 2-(6-Cloro-hexil-óxi)-tetraidopirano.

- 20 6-Cloro-hexanol (6,85 g, 10 mmol) e ácido p-tolueno-sulfônico (500 mg), foram dissolvidos em éter seco (75 ml) e esfriados para 0-5°C em banho de gelo. Diidropirano (4,3 g, 10 mmol) em éter seco (25 ml) foi adicionado em gotas com agitação constante por um período de 30 minutos. Após diluição completa, o banho de esfriamento foi removido e agitação foi continuada por 16 horas. A solução foi extraída com água (50 ml
- 25 x 2), seca (mgSO₄), filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para deixar um óleo amarelo pálido. Este óleo foi mostrado por

espectrometria ^{13}C RMN como estando suficientemente puro para ser usado sem purificação nas reações subseqüentes. Rendimento de 10,1g (91%).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 19,7 (CH_2), 25,5 (CH_2), 25,6 (CH_2), 26,7 (CH_2), 29,6 (CH_2), 30,8 (CH_2), 32,6 (CH_2), 45,0 (CH_2Cl), 62,3 (OCH_2), 67,4 (OCH_2), 98,8 (OCHO).

^1H RMN (CDCl_3): δ 1,30-1,71 (14H, m, $\text{CH}_2 \times 7$), 3,24-3,32 (1H 3,41- 3,48 (3H, m CH e CH_2), 3,60-3,67 (1H, m, CH), 3,72-3,82 (1H, bm, CH), 4,44-4,49 (1H, bm, OCHO).

Etapa (b): Dietil-éster de ácido 2-[6-(tetraidropiran-2-il-óxi)-hexil]-malônico.

Sódio (1,13 g, 49 mmol) em quantidades pequenas foi dissolvido em etanol seco (100 ml) com agitação constante sob uma atmosfera de nitrogênio seco. Malonato de dietila (8,0 g, 50 mmol) foi adicionado em uma porção e a solução foi aquecida a 60°C por 1 hora. 2-(6-Cloro-hexil-óxi)-tetraidropirano (9,3 g, 42,2 mmol) foi adicionado em uma porção e a temperatura foi aumentada para $75\text{-}80^\circ\text{C}$ e mantida neste nível por 24 horas. Após esfriamento, o sólido inorgânico foi removido por filtração e o solvente foi evaporado do filtrado. O resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 (50 ml), extraído com água (30 ml \times 2), seco (mgSO_4) filtrado e os voláteis foram removidos para deixar um óleo amarelo pálido. Este óleo foi submetido à cromatografia sobre gel de sílica usando éter de petróleo 40:60 / éter (200:40) como o eluente. O produto requerido eluiu com um $r_f = 0,15$ e foi isolado como um óleo incolor. Rendimento de 8,7 g, (60%).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 14,0 ($\text{CH}_3 \times 2$), 19,6 (CH_2), 25,5 (CH_2), 27,2 (CH_2), 28,6 (CH_2), 29,0 (CH_2), 29,6 (CH_2), 30,0 (CH_2), 30,8 (CH_2), 52,0 (CH), 61,2 ($\text{OCH}_2 \times 2$), 62,2 (OCH_2), 67,4 (OCH_2), 98,8 (OCHO), 169,4 ($\text{C=O} \times 2$).

^1H RMN (CDCl_3): δ 1,10 -1,25 (14H, m, $\text{CH}_3 \times 2$, $\text{CH}_2 \times 4$), 1,36 -1,50 (6H, bm, $\text{CH}_2 \times 3$), 1,70-1,81 (2H, bm, CH_2), 3,17-3,28 (2H, m, CH_2), 3,56-3,66 (1H, m, CH), 3,70-3,80 (1H, m, OCH), 4,04-4,16 (4H, m, $\text{OCH}_2 \times 2$), 4,03-4,08 (1H, m, OCHO).

Etapa (c): N,N'-Bis-(2-amino-etil)-2-[6-(tetraidropiran-2-il-óxi)-hexil]-malonamida.

Dietil-éster de ácido 2-[6-(Tetraidropiran-2-il-óxi)-hexil]-malônico (5,1 g, 14,8 mmol) foi dissolvido em 1,2-diamino-etano (10 g, 167 mmol) e agitado na temperatura ambiente por 16 horas. Voláteis foram removidos em vácuo (40 – 50°C a 1,33 Pa) para deixar um resíduo viscoso verde pálido que foi submetido à cromatografia em coluna eluindo com CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (50:50:5). O composto do título eluído com um r_f 0,2 e foi colhido como um óleo viscoso verde pálido que se solidifica em repouso.

(Rendimento de 3,9 g, 71%).

¹³C RMN (CDCl₃): δ 19,8 (CH₂), 25,5 (CH₂), 26,0 (C₁₋₁₂), 27,5 (CH₂), 29,2 (CH₂), 29,7 (CH₂), 30,8 (CH₂), 31,9 (CH₂), 41,0 (NCH₂ x 2), 41,9 (NCH₂ x 2), 54,6 (CH), 62,5 (OCH₂), 67,5 (OCH₂), 98,9 (OCHO), 171,6 (C=O x 2).

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,15-1,28 (6H, bs, CH₂ x 3), 1,39 -1,44 (6H, bm, CH₂ x 3), 1,69 -1,74 (4H, bm, CH₂ x 2), 2,64 (4H, bs, NH₂ x 2), 2,73 4H, t, J = 6 Hz, CH₂ x 2), 3,08-3,29 (6H, m, CH₂ x 3), 3,35-3,41 (1H, m CH), 3,55-3,63 (1H, m, CH), 3,70-3,78 (1H, m, CH), 4,43 (1H, bt, J = 4 Hz, OCHO), 7,78 (2H, bt, J = 5 Hz, OCNH x 2)

IR (filme fino) cm⁻¹:- 3417, 3082, 2936, 2862, 1663, 1558, 1439, 1354, 1323, 1261, 1200, 1189, 1076, 1026, 956, 907, 867, 810.

Etapa (d): N,N'-Bis(2-amino-etil)-2-(6-hidróxi-hexil)-malonamida.

N,N'-Bis(2-amino-etil)-2-[6-(tetraidropiran-2-il-óxi)-hexil]-malonamida (3,9 g, 10,6 mmol), ácido p-tolueno-sulfônico mono-hidratado (8,5 g, 3 mmol) e etanol (50 ml) foram aquecidos sob refluxo a 70-75°C por 16 horas. Após esfriamento (0,880) foi adicionado em gotas até ser alcançado um pH 9 permanente. O sólido branco precipitado foi removido por filtração através de Celite e o bolo do filtro foi lavado com etanol (30 ml). O etanol foi removido sob pressão reduzida (2 kPa, 40°C) para deixar uma cera semi-sólida. Este resíduo foi submetido à cromatografia sobre gel de sílica eluindo

com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (100:50:10) e foi verificado que o composto do título possui um $r_f = 0,2$. Este produto foi colhido e co-evaporado com etanol (100 ml x 3) para remover qualquer água residual. Foi obtido um resíduo viscoso verde pálido que se solidifica em repouso. (Rendimento de 2,1 g, 69%).

^{13}C RMN (CD_3OD): δ 25,4 (CH_2), 27,3 (CH_2), 28,9 (CH_2), 30,4 (CH_2), 32,2 (CH_2), 40,6 ($\text{NCH}_2 \times 2$), 41,7 ($\text{NCH}_2 \times 2$), 54,1 (CH), 61,6 (CH_2OH), 171,7 ($\text{C}=\text{O} \times 2$).

^1H RMN (CD_3OD): δ 1,28 -1,38 (6H, bs, $\text{CH}_2 \times 3$), 1,46 -1,55 (2H, bm, CH_2), 1,79 -1,87 (2H, bm, CH_2), 2,73 (4H, t, $J = 6$ Hz, $\text{H}_2\text{NCH}_2 \times 2$), 3,13 (1H t, $J = 7$ Hz, CH), 3,27 (4H, dt, $J = 6$ e 2 Hz, $\text{HNCH}_2 \times 2$), 3,53 (2H t, $J = 7$ Hz OCH_2).

IR (filme fino) cm^{-1} : 3364, 2932, 2862, 2527, 1663, 1558, 1462, 1327, 1223, 1192, 1034. Espectro de Massa (Fabs) m/e : Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) 289 Verificado 289.

Etapa (e): terc-Butil-éster de ácido (2-terc-butóxi-carbonil-amino-etil-2-{[terc-butóxi-carbonil-(2-terc-butóxi-carbonil-amino-etil)-amino]metil}-8-hidróxi-octil)-carbônico

Sob uma atmosfera de nitrogênio seco, o aduto de borano-dimetil-sulfeto puro (15 ml, 150 mmol) foi adicionado em gotas via uma seringa em uma mistura agitada de $\text{N,N}'$ -bis-(2-amino-etil)-2-(6-hidróxi-hexil)-malonamida (2,1 g, 7,3 mmol) em dioxano (50 ml). Após adição completa, a mistura foi aquecida cuidadosamente sob refluxo a 110°C por 5 dias. Durante este período um pouco de sólido branco restou. Após esfriamento os voláteis foram removidos sob pressão reduzida para deixar um sólido branco no qual metanol (50 ml) foi adicionado em gotas dando uma solução incolor. Esta solução foi aquecida sob refluxo por 3 horas, esfriada, HCl concentrado (5 ml) foi adicionado e aquecimento continuou sob refluxo a $70\text{-}75^\circ\text{C}$ for 48 horas. O solvente foi removido para deixar um resíduo viscoso verde que foi co-evaporado com metanol (100 ml x 3) para deixar um

sólido verde pálido. Este sólido foi redissolvido em metanol seco e carbonato de potássio anidro (4,0 g, 30 mmol) foi adicionado seguido por dicarbonato de di-terc-butila (7,0 g, 32 mmol). A mistura foi agitada na temperatura ambiente por 48 horas. O sólido inorgânico foi removido por filtração através de Celite e o solvente foi evaporado do filtrado para deixar um resíduo viscoso. Este resíduo foi misturado com água (50 ml) e extraído com CH₂Cl₂ (50 ml x 3). As frações orgânicas foram combinadas, secas (mgSO₄), filtradas e o solvente foi evaporado para deixar um resíduo amarelo pálido.

Nota: Neste ponto é conveniente monitorar a reação por ¹³C RMN.

10 O resíduo foi submetido à cromatografia sobre gel de sílica CH₂Cl₂/MeOH (95: 5) como eluente. O composto do título eluído com um $r_f=0,41$ e foi isolado como um óleo viscoso incolor (Rendimento de 2,5 g, 52%).

¹³C RMN (CDCl₃): δ 25,6 (CH₂), 26,4 (CH₂), 28,4 (CH₃ x 12), 29,8 (CH₂ x 2), 32,6 (CH₂), 36,5 (muito largo, CH), 39,2 (NCH₂ x 2, adjacente CH), 46,9 (singleto largo, HNCH₂ x 2), 50,0 (singleto largo, NCH₂ x 2), 62,4 (HOCH₂), 79,0 (OC x 2), 79,9 (OC x 2), 156,4 (singleto largo C=O x 4)

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,05 -1,18 (8H, bs, CH₂ x 4), 1,27 (18h, s, CH₃ x 6, t-butila), 1,31 (18H, s, CH₃ x 6, t-butila), 1,41 (2H, m, CH₂), 1,81 (1H bs, CH), 2,63 (1H, bs, OH), 2,98 (4H, bs, NCH₂ x 2), 3,11 (8H, bs, NCH₂ x 4), 3,44 (2H,t, J = 8 Hz, CH₂O), 5,2 (2H, bs, NH x 2)

IR (filme fino) cm⁻¹:- 3350, 2976, 2931, 2859, 1674, 1516, 1455, 1418, 1393, 1260, 1250, 1165, 1069, 965, 871, 775.

Espectro de Massa (Fabs) m/e:- Calculado para C₃₃H₆₅N₄O₉ (M+H) 661
25 Verificado 661.

Etapa (f): 8-[terc-Butóxi-carbonil-(2-terc-butóxi-carbonil-amino-etil-amino)]-7-{[terc-butóxi-carbonil-(2-terc-butóxi-carbonil-amino-etil)-amino)-metil]}-octil-éster de ácido tolueno-4-sulfônico

terc-Butil-éster de ácido (2-terc-butóxi-carbonil-amino-etil-2-

{[terc-butóxi-carbonil-(2-terc-butóxi-carbonil-amino-etil)amino]-metil}-8-hidróxi-octil-carbônico (2,52 g, 3,82 mmol), cloreto de p-tolueno-sulfonila (1,0 g, 5,2 mmol), trietil-amina (1,3 g, 12,8 mmol) e CH_2Cl_2 (30 ml) foram agitados na temperatura ambiente com a evaporação lenta do solvente. A
 5 reação foi monitorada por RMN de carbono e após 3 dias pouco material inicial restou. O volume de reação foi completado para 30 ml com CH_2Cl_2 , extraído com água (50 ml x 3), seco (mgSO_4), filtrado e o solvente foi evaporado para deixar um resíduo marrom. Este resíduo foi submetido à cromatografia sobre gel de sílica usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:5) como
 10 eluente. O primeiro composto a eluir foi cloreto de tosila não reagido com um $r_f = 0,95$. O composto do título eluído com um $r_f = 0,2$ e foi isolado como um óleo viscoso amarelo pálido. Rendimento (1,20 g, 39%).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 21,7 (CH_3 tosila), 25,3 (CH_2), 26,3 (CH_2), 28,5 (CH_3 x 12), 28,8 (CH_2), 29,5 (CH_2), 29,9 (CH_2), 36,5 (CH muito largo), 39,4 (NCH_2
 15 x 2), 47,0 (largo NCH_2 x 2), 50,5 (largo, NCH_2 x 2), 70,6 (TsOCH_2), 79,1 (OC x 2), 80,0 (OC x 2), 127,9 (CH x 2), 129,9 (CH x 2), 133,2 (C), 144,7 (C-S Ts), 156,1 (largo, $\text{C}=\text{O}$ x 4).

^1H RMN (CDCl_3): δ 1,16 (8H, bs, CH_2 x 4), 1,35 (18H, s, CH_3 x 6), 1,39 (18H, s, CH_3 x 6), 1,88 (1H, bs, CH), 2,38 (3H, s, CH_3 Tosil), 3,10-3,12 (4H,
 20 bs, NCH_2 x 2), 3,19 (8H, bs, NCH_2 x 4), 3,93 (2H, t, $J = 7$ Hz, CH_2OTs), 5,0 (1H, bs, NH), 5,08 (1H, bs, NH), 7,29 (2H, d, $J = 8$ Hz, CH x 2, Ar), 7,72 (2H, d, $J = 8$ Hz CH x 2, Ar)

IR (filme fino) cm^{-1} : 3360, 2974, 2932, 2862, 1693, 1516, 1479, 1418, 1391, 1366, 1250, 1177, 1069, 959, 816, 775.

25 Espectro de Massa (Fabs) m/e:-Calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{71}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{S}$ (M+H) 815 Verificado 815.

Etapa (g): terc-Butil-éster de ácido (8-azido-2-{[terc-butóxi-carbonil-(2-terc-carbonil-amino-etil)-amino]-metil}-octil)-(2-terc-butil-óxi-carbanil-amino-etil)-carbâmico

8-[terc-Butóxi-carbonil-(2-terc-butóxi-carbonil-amino-etilamino)]-7-{{[terc-butóxi-carbonil-(2-terc-butóxi-carbonil-amino-etil)-amino]-metil}}-octil-éster de ácido tolueno-4-sulfônico (1,105 g, 1,36 mmol), azida de sódio (350 m g, 5,4 mmol) e metanol (10 ml) foram aquecidos sob refluxo a 70-75 °C por 16 horas. Após esfriamento, metanol foi removido na temperatura ambiente sob pressão reduzida até restar cerca de 1- 2 ml. Este resíduo foi diluído com água (25 ml) e extraído com CH₂Cl₂ (25 ml x 4). Os extratos orgânicos foram combinados, secos (mgSO₄), filtrados e os voláteis foram evaporados na temperatura ambiente (Nota: azidas são potencialmente explosivas e esta etapa deve ser realizada atrás de um escudo de segurança) para deixar um resíduo viscoso amarelo pálido que foi o composto desejado em um estado puro. (Rendimento de 820 m g, 88%).

¹³C RMN (CDCl₃): δ 26,3 (CH₂), 26,5 (CH₂), 28,3 (CH₃ x 12), 28,7 (CH₂), 29,6 (CH₂), 29,8 (CH₂), 36,8 (largo, CH), 39,3 (NCH₂ x 2), 46,9 (largo, NCH₂ x 2), 50,0 (largo, NCH₂ x 2), 51,3 (CH₂N₃), 79,0 (OC x 2), 79,8 (OC x 2), 156,0 (C=O x 4).

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,16 (8H, bs, CH₂ x 4), 1,29 (18H, s CH₃ x 6), 1,33 (18H, s, CH₃ x 6), 1,47 (2H, bt, J = 6,5 Hz CH₂ adjacente CH), 1,86 (1H, bs, CH), 2,95-3,05 (4H, bs, NCH₂ x 2), 3,05 -3,20 (10H, bs, NCH₂ x 4 e CH₂N₃), 5,09 (2H, bs, NH x 2)

IR (filme fino) cm⁻¹:- 3350, 2974,2932, 2860, 2097 (Banda forte N₃), 1694, 1520, 1470, 1418, 1391, 1366, 1250, 1167, 1069, 870, 777.

Etapa (h): terc-Butil-éster de ácido (8-amino-2-{{[terc-butóxi-carbonil-(2-terc-carbonil-amino-etil)-amino]-metil}}-octil)-(2-terc-butil-óxi-carbonil-amino-etil)-carbâmico (Quelato II).

terc-Butil-éster de ácido (8-azido-2-{{[terc-butóxi-carbonil-(2-terc-carbonil-amino-etil)-amino]-metil}}-octil)-(2-terc-butil-óxi-carbonil-amino-etil)-carbâmico (820 m g, 1,20 mmol), paládio 10% sobre carvão (100 mg) e metanol (10 ml) foram tratados com gás hidrogênio sob uma pressão de

3.039 kPa na temperatura ambiente por 16 horas.

Os sólidos foram removidos por filtração através de Celite e o bolo do filtro foi lavado com metanol (50 ml). Voláteis foram removidos do filtrado para deixar um óleo viscoso que foi o material desejado em um estado puro. (Rendimento de 700 mg, 89%).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 26,4 (CH_2), 26,6 (CH_2), 28,4 ($\text{CH}_3 \times 12$), 32,9 ($\text{CH}_2 \times 2$), 36,8 (largo, CH). 39,2 ($\text{NCH}_2 \times 2$), 41,8 (H_2NCH_2), 46,9 (largo, $\text{NCH}_2 \times 2$), 49,8 (largo, $\text{NCH}_2 \times 2$), 78,9 ($\text{OC} \times 2$), 79,7 ($\text{OC} \times 2$), 156,0 ($\text{C}=\text{O} \times 4$).

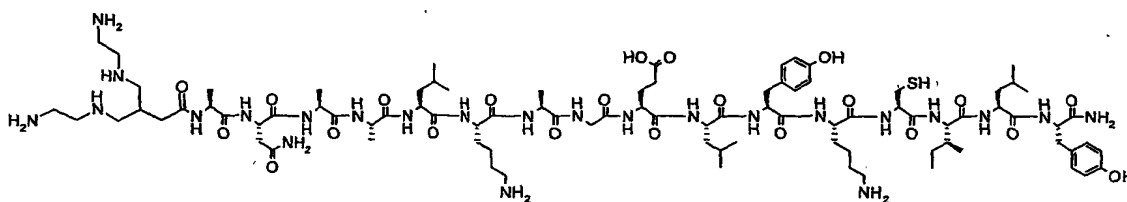
^1H RMN (CDCl_3): δ 1,08 (8H, bs, $\text{CH}_2 \times 4$), 1,23 (18H, s, $\text{CH}_3 \times 6$), 1,27 (20H, bs, $\text{CH}_3 \times 6$ e CH_2), 1,77 (1H, bs, CH), 2,40 (2H, bs, NH_2), 2,50 (2H, t, $J=7$ Hz, CH_2NH_2), 2,97 (4H, bm, $\text{NCH}_2 \times 2$), 3,00-3,16 (8H, bm, $\text{NCH}_2 \times 4$), 5,21 (1H, bs, NH), 5,30 (1H, bs, NH).

IR (filme fino) cm^{-1} : 3360, 1693, 1520, 1459, 1418, 1392, 1367, 1250, 1170, 1068, 964, 922, 871, 775, 733.

Espectro de Massa (Fabs) m/e : Calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}$) 660 Verificado 660.

Exemplo 4: Síntese de Agente de formação de imagem 1

(a) Síntese de Precursor 1



O peptídeo foi montado em um sintetizador automático ABI 433A pelo uso de resina Nova Biochem Rink MBHA (0,58 mmol/g ou 0,72 mmol/g). O peptídeo foi sintetizado em uma escala de 0,1 mmol ou uma escala de 0,25 mmol. Foi usado protocolo padrão.

Reagente copulante HBTU/HOBt, Base: DIEA, Solvente: NMP.

Fases móveis de HPLC A) TFA 0,1%/H₂O B) TFA

0,1%/MeCN.

Colunas de HPLC: Analytical: Phenomenex, Gemini, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m

Prep: Phenomenex, Gemini, 250 mm x 21 mm, 10 μ m.

5 Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (130 m g, 0,05 mmol) foi intumescida por 10 min em DMF. TetraBoc-Quelato II NHS éster (148 m g, 0,2 mmol; Quelato II protegido com Boc descrito em Exemplo 3) foi misturado com PyAOP (104 m g, 0,2 mmol) e N MM (40 μ L, 0,4 mmol) em DMF (5 ml) por 3 min. N MM (20 ml, 0,2- mmol) foi
10 adicionada na resina e depois a solução de Quelato II/PyAOP/N MM foi adicionada. A solução de resina foi deixada borbulhar overnight e um teste de Kaiser negativo demonstrou conversão de 100% para o peptídeo conjugado. Subseqüente à clivagem e à liofilização o peptídeo bruto foi analisado por LC-MS (20-40%B em 20 min). A análise demonstrou que o MW correto
15 estava presente, mas também uma proporção grande de um peptídeo de deleção (provavelmente -Leu) foi observada. RT: 13,7 min.

A mistura de peptídeo bruto foi purificada usando um gradiente de 20-35% B em 40 min. Várias frações foram colhidas, analisadas e liofilizadas. Rendimento: 5,8 mg de sólido branco fofo. Pureza por HPLC:
20 98%. ESI-MS: MW Teórico: 1940,40. Obtido $(M+H)^{2+}$ /2: 971,2

(b) Radiomarcção de Precursor 1

O agente de formação de imagem foi formado pela adição de 20 μ g do precursor em 20 μ L de MeOH em um frasco que havia sido permitido aquecer para a temperatura ambiente com os seguintes reagentes:

Reagente	Quantidade (mg)
SnCl ₂ .2H ₂ O	0,016
MDP(H ₄)	0,025
NaHCO ₃	4,5
Na ₂ CO ₃	0,6
NaOAc.3H ₂ O	0
NaPABA	0,200

25 1 ml de eluato de DrytecTM ^{99m}Tc (0,74,6 GBq) foi

adicionado no frasco, a solução foi permitida repousar na temperatura ambiente por 20 min e então analisada por HPLC e ITLC.

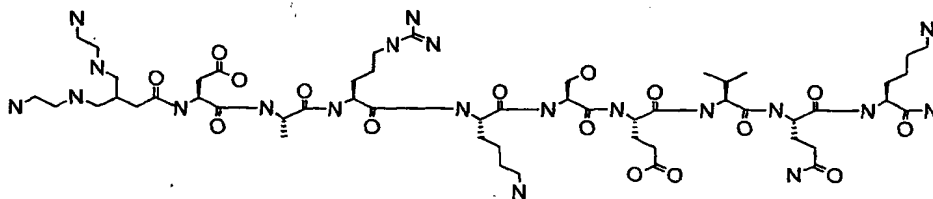
Análise por HPLC foi realizada usando uma coluna Phenomenex Gemini (C₁₈ 150 mm x 4,6 mm, 5µm) Solvente A = amônia 0,06% e solvente B = MeCN. UV Dual foram medidos em 225 e 254 nm.

Gradiente de HPLC	
Fluxo 1,00 ml / minuto	
0 min	20%B
20 min	40%B
22 min	95%B
26 min	95%B
27 min	20%B
30 min	20%B

ITLC (tiras SG – fase móvel = solução salina ou 2-butanona (MEK)

Exemplo 5: Síntese de Agente de formação de imagem 3

(a) Síntese de Precursor 3



O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (110 m g, 0,05 mmol) foi intumescida por 10 min em DMF. TetraBoc-Quelato II NHS éster (148 m g, 0,2 mmol; Quelato II protegido com Boc descrito em Exemplo 3) foi misturado com PyAOP (104 m g, 0,2 mmol) e N MM (40 µl, 0,4 mmol) em DMF (5 ml) for 3 min. N MM (20 µL, 0,2 mmol) foi adicionada na resina e depois solução de Quelato II/PyAOP/N MM foi adicionada. A solução de resina foi deixada borbulhar durante a noite e um teste de Kaiser negativo demonstrou conversão de 100% para o peptídeo conjugado. Subseqüente à clivagem e à liofilização o peptídeo bruto foi analisado por LC-MS (2-12%B em 20 min). A análise demonstrou que o MW correto estava presente como um pico maior. RT: 12 min.

A mistura de peptídeo bruto foi purificada usando um gradiente de 2-10% B em 40 min. Três frações foram colhidas, analisadas e liofilizadas para dar 3 mg de peptídeo puro. Análise por HPLC inicial quando dissolvendo o peptídeo em H₂O pura demonstrou dois picos separados de linha base devido às espécies diferentemente carregadas presentes. O peptídeo foi então dissolvido em TFA 0,1%/H₂O e foi obtido um pico com a massa correta. Pureza por HPLC: 98%.

MW Teórico: 1259,49. Obtido (M+H)²⁺/2: 630,6.

(b) Radiomarcagem de Precursor 3

10 Radiomarcagem foi realizada de acordo com o método descrito acima para Agente de formação de imagem 1, mas usando 50 µg de precursor, e HPLC como segue:

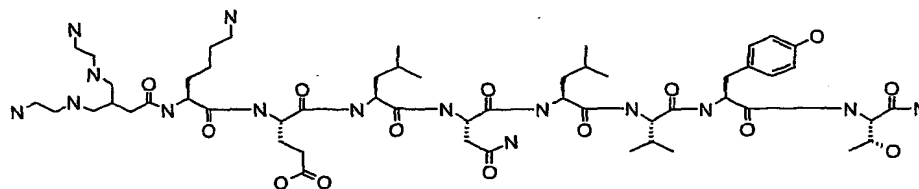
Gradiente de HPLC

Fluxo 1,00 ml / minuto

0 min	5%B
10 min	40%B
15 min	40%B
17 min	10%B
20 min	5%B

Exemplo 6: Síntese de Agente de formação de imagem 8

(a) Síntese de Precursor 8



15 O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (133 m g, 0,05 mmol) foi intumescida em DMF por 10 min. TetraBoc-Quelato II-NHS éster (148 m g, 0,2 mmol), PyAOP (104 m g, 0,2 mmol) foi dissolvido em DMF, misturado e N MM (40 µl, 0,4 mmol) foi adicionada na solução e deixada repousar por 2 min. N MM (20 µL, 0,2 mmol) foi adicionada na resina e depois solução de Quelato II/PyAOP/N MM foi adicionada. A

mistura de resina foi deixada com borbulhamento de N₂ por 24 h, e então um teste de Kaiser demonstrou que a reação havia alcançado a completitude. Subseqüente às lavagens com DMF/DCM a resina foi clivada em TFA/TIS/H₂O (10:0,25:0,25) por 2 h, então filtrada, triturada em dietil-éter, evaporada em rotavapor e liofilizada. O peptídeo bruto foi analisado por LC-MS (10-30%B em 20 min). A análise demonstrou a presença de um pico principal. A mistura de peptídeo bruto foi purificada usando HPLC preparativa (10-30%B em 40 min). Duas frações foram colhidas, analisadas e liofilizadas. Rendimento: 8,7 mg de sólido branco fofo. Pureza por HPLC: 99%. ESI-MS: MW Teórico: 1178,45. Obtido (M+H)²⁺/2: 590,0.

(b) Radiomarcção de Precursor 8

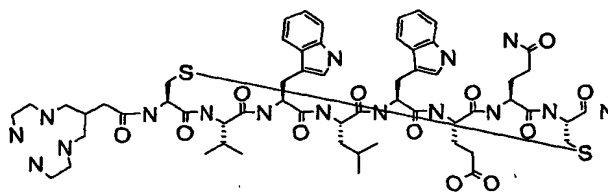
Radiomarcção foi realizada de acordo com o método descrito em Exemplo 4 para Agente de formação de imagem 1, com HPLC como segue:

Gradiente de HPLC

0 min	10%B
20 min	30%B
21 min	95%B
26 min	95%B
27 min	10%B
30 min	10%B

Exemplo 7: Síntese de Agente de formação de imagem 10

(a) Síntese de Precursor 10



O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

A peptidil-resina H-Cys(Acm)-Val-Trp(Boc)-Leu-Trp(Boc)-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Cys(Acm)-R foi tratada com uma solução de 2,5% água e 2,5% TIS em TFA (10 ml) por 2 horas. A resina foi removida por filtração e

o filtrado evaporado em vácuo. Dietil-éter foi adicionado no resíduo. O precipitado resultante foi lavado com dietil-éter e seco com ar dando 84 mg de H-Cys(Acm)-Val-Trp-Leu-Trp-Glu-Gln-Cys(Acm)-NH₂ bruto.

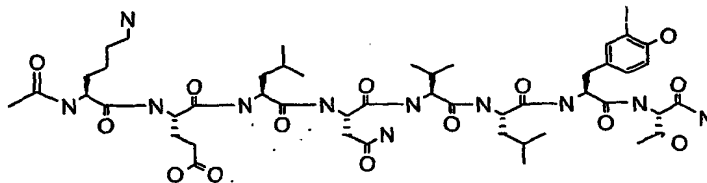
5 H-Cys(Acm)-Val-Trp-Leu-Trp-Glu-Gln-Cys(Acm)-NH₂ bruto (8,4 mg) foi dissolvido em AcOH aquoso 75% (80 ml) sob uma atmosfera de argônio. HCl 1 M (8 ml), anisol (0,4 ml) e I₂ 0,025 M em AcOH (26,6 ml) foram adicionados naquela ordem. Após meia hora, ácido ascórbico 1 M foi adicionado com o objetivo de interromper a reação. A maior parte do solvente foi evaporada em vácuo. O resíduo foi diluído com água/TFA 0,1% e o
10 produto foi purificado duas vezes por HPLC preparativa dando 17 mg de Cys 1-8; H-Cys-Val-Trp-Leu-Trp-Glu-GlnCys-NH₂ puro.

Cys 1-8; H-Cys-Val-Trp-Leu-Trp-Glu-Gln-Cys-NH₂ (17 mg), tetra-Boc-Quelato II NHS éster (17 mg), 1-hidróxi-7-aza-benzotriazol (HOAt) (3 mg) e N-metil-morfolina (17 pl) foram dissolvidos em DMF (1 ml) e a
15 mistura reacional foi agitada na temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi então diluída com ACN 60%/água/TFA 0,1% (7 ml) e o produto foi purificado por HPLC preparativa dando 16 mg de Cys 1-8; tetra-Boc-Quelato I 1-Cys-Val-Trp-Leu-Trp-Glu-Gln-Cys-NH₂ puro.

Cys 1-8; tetra-Boc-Quelato II-Cys-Val-Trp-Leu-Trp-Glu-Gln-
20 Cys-NH₂ foi tratado com uma solução de 2,5% de água e 2,5% de TIS em TFA (10 ml) por 2 horas. TFA foi evaporado em vácuo e o resíduo foi dissolvido em DMF (0,5 ml) e diluído com ACN 20%/água/TFA 0,1% (5 ml) e o produto foi purificado por HPLC preparativa (gradiente: 20-40% B durante 40 minutos onde A = H₂O/TFA 0,1% e B = ACN/TFA 0,1%, vazão:
25 10 ml/minuto, coluna: Phenomenex LunaTM 5μm C₁₈ (2) 250 mm x 21,20 mm, detecção: UV 214 nm, tempo de retenção do produto: 24,7 minutos) dando 8,7 mg Cys 1-8 puro; Quelato II-Cys-Val-Trp-Leu-Trp-Glu-Gln-Cys-NH₂). O produto foi caracterizado usando Espectrometria de massa (MH⁺ calculado: 1263,6, MH⁺ verificado: 1263,8).

(b) Radiomarcção de precursor 10

Radiomarcção foi realizada de acordo com o método descrito em Exemplo 4 para Agente de formação de imagem 1, mas usando 50 g de precursor.

5 Exemplo 8: Síntese de Agente de formação de imagem 29**(a) Síntese de Precursor 29**

O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (65 m g, 0,025 mmol) foi intumescida em DMF por 10 min. A resina foi depois acetilada usando; Ac₂O (450 µL)/DIEA (250 µL)/HOBt em DMP (10 ml) por 2 h. Um teste de Kaiser negativo demonstrou acetilação completa. Devido ao contaminante esterificação do (31)Y-OH, a resina foi tratada com piperidina 20% em DMF por 2x20 min. A resina foi então intensamente lavada com DMF/DCM e seca na RT. A resina foi clivada em TFA/TIS/H₂O (10:0,25:0,25) por 2 h, então filtrada, triturada em dietil-éter, evaporada em rotavapor e liofilizada. O peptídeo bruto foi analisado por LC-MS (20-40%B em 20 min). A análise demonstrou a presença de dois picos principais. A mistura de peptídeo bruto foi purificada por HPLC preparativa (20-35% B em 40 min). Duas frações foram colhidas, analisadas e liofilizadas. Rendimento: 0,5 mg de sólido branco. Pureza por HPLC: 99%. ESI-MS: MW Teórico: 1146,1. Obtido (M+H)²⁺/2: 573,6.

(b) Radiomarcção de Precursor 29

10 µL de Na¹²⁷I (1 mm, 10⁻⁸ mol) em NaOH 0,05 M foram inicialmente adicionados em 200 µL de tampão acetato de amônio 0,2 M em pH 4. A solução foi então adicionada em ~25 µl de solução de Na¹²³I em

NaOH 0,05 M (450 MBq) (GE Healthcare Cygne) no frasco de Na¹²³I. O conteúdo foi transferido para um frasco silanizado e 10 µL de ácido peracético (5 mm, 5 x 10⁻⁸ mol) foram adicionados. O precursor (100 µg em 70 µL de MeOH, 8,1 x 10⁻⁸ mol) foi então adicionado e o conteúdo do frasco foi misturado por pipeta. Após aproximadamente 5 min, a mistura reacional foi analisada por HPLC.

Análise por HPLC foi realizada usando uma coluna Phenomenex LunaTM (C₁₈ 150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Solvente A = TFA 0,1%/H₂O e solvente B = TFA 0,1%/H₂O. UV dual foi medido em 225 e 254 nm.

Gradiente de HPLC

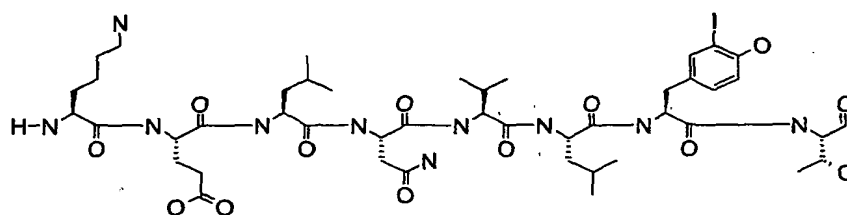
Fluxo 1 ml / minuto

0 min	10%B
20 min	50%B
22,5 min	100%B
27 min	100%B
27,5 min	20%B
31 min	20%B

ITLC (tiras SG – fase móvel = solução salina)

Exemplo 9: Síntese de Agente de formação de imagem 35

(a) Síntese de Precursor 35



O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (150 mg) foi clivada em TFA/TIS/H₂O (10:0,25:0,25) por 2 h, então filtrada, triturada em dietil-éter, evaporada em rotavapor e liofilizada. O peptídeo bruto foi analisado por LC-MS (10-30%B em 20 min). A análise demonstrou a presença de dois picos principais. A mistura de peptídeo bruto foi purificada

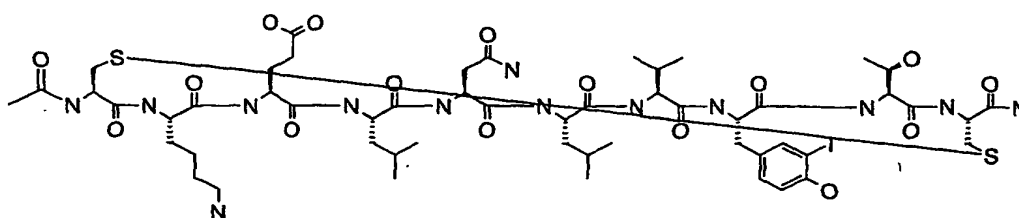
usando um gradiente de 10-30%B em 40 min. Duas frações foram colhidas, analisadas e liofilizadas. Rendimento: 1,5 mg de sólido branco fofo. Pureza por HPLC: 99%. ESI-MS: MW Teórico: 1104,06. Obtido $(M+H)^{2+}/2$: 552,8.

(b) Radiomarcção de precursor 35

5 Radiomarcção foi realizada de acordo com o método descrito em Exemplo 8 para Agente de formação de imagem 29.

Exemplo 10: Síntese de agente de formação de imagem 36

(a) Síntese de Precursor 36



10 O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (130 m g, 0,05 mmol) foi intumescida em DMF por 10 min. A resina foi depois acetilada usando Ac_2O (450 μL)/DIEA (250 μL)/HOBt em DMF (10 ml) por 2 h. Um teste de Kaiser negativo demonstrou acetilação completa. Devido ao contaminante esterificação de (31)Y-OH, a resina foi tratada com piperidina 20% em DMF por 2x20 min. A resina foi então intensamente lavada com DMF/DCM e seca na RT. A resina foi clivada em TFA/TIS/ H_2O (10:0,25:0,25) por 2 h, então filtrada, triturada em dietil-éter, evaporada em rotavapor e liofilizada. O peptídeo bruto foi analisado por LC-MS (20-40%B em 20 min). A análise demonstrou a presença de dois picos principais. O peptídeo bruto (17 mg) foi oxidado na seguinte solução H_2O (24 ml) MeCN (16 ml) e DMSO (160 μL). pH foi ajustado para aproximadamente 9 por NH_3 25%. A solução foi deixada agitando na RT durante a noite. Análise por LC-MS demonstrou que a oxidação havia alcançado a completitude e o pH foi ajustado para 4 por AcOH. O peptídeo foi liofilizado e depois purificado por

HPLC preparativa (20-35% B em 40 min).

Duas frações foram colhidas e analisadas. Rendimento: 2,5 mg de sólido branco fofo. Pureza por HPLC: 99%. ESI-MS: MW Teórico: 1350,37. Obtido $(M+H)^{2+}$ /2: 675,6

5 (b) Radiomarcção de precursor 36

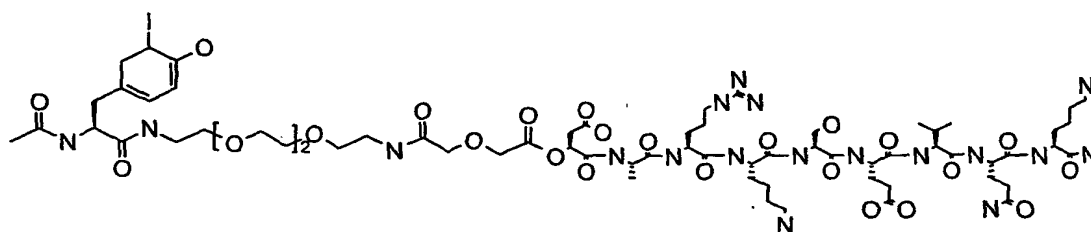
Radiomarcção foi realizada de acordo com o método descrito em Exemplo 8 para Agente de formação de imagem 29, mas com HPLC como segue:

Fluxo 1 / minuto

0 min	20%B
20 min	35%B
22,5 min	100%B
27 min	100%B
27,5 min	20%B
31 min	20%B

10 Exemplo 11: Síntese de Agente de formação de imagem 37

(a) Síntese de Precursor 37



O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

15 Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (65 m g, 0,025 mmol) foi intumescida em DMF por 10 min. Fmoc-PEG4-COOH (100 m g, 0,2 mmol) foi dissolvido em DMF e adicionado em uma solução de PyAOP (100 m g, 0,2 mmol)/DMF. N MM (40 μ L, 0,4 mmol) foi adicionada e a solução foi deixada em repouso por 2 min. N MM (20 μ L, 0,2 mmol) foi
20 adicionada na resina e depois solução de copulação foi adicionada. A mistura de resina foi deixada borbulhando durante a noite. Um teste de Kaiser demonstrou que a reação não estava completa e o procedimento de copulação foi repetido duas vezes para dar um teste de Kaiser negativo. Desproteção de

Fmoc foi realizada usando piperidina 20% em DMF (2x7 ml) por 1x10 e 1x5 min. Fmoc-(31)Y-COOH (0,5 mmol) foi copulado usando PyAOP (211 m g, 0,4 mmol)/N MM (80 μ L, 0,8 mmol) em DMF por 3 h. Um teste de Kaiser demonstrou que a reação havia alcançado a completitude.

5 Subseqüente à lavagem com DMF, a resina foi acetilada usando; Ac₂O (450 μ L)/DIEA (250 pl)/HOBt em DMP (10 ml) por 2 h. Um teste de Kaiser negativo demonstrou acetilação completa. Devido ao contaminante esterificação de (31)Y-OH, a resina foi tratada com piperidina 20% em DMF por 2x20 min. A resina foi então intensamente lavada com
10 DMF/DCM e seca na RT. A resina foi clivada em TFA/TIS/H₂O (10:0,25:0,25) por 2 h, então filtrada, triturada em dietil-éter, evaporada em rotavapor e liofilizada. O peptídeo bruto foi analisado por LC-MS (2,0-40%B em 2,0 min) e demonstrou um único pico principal em pureza de aproximadamente 90%. Visto que o peptídeo era apenas para ser usado como
15 um padrão frio o peptídeo bruto não foi adicionalmente purificado. ESI-MS: MW Teórico: 1681,6 Obtido (M+H)²⁺/2: 840,3.

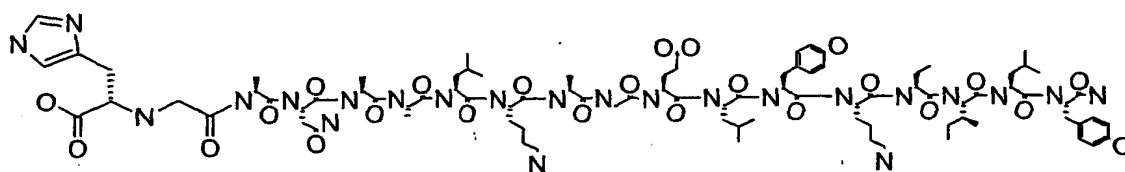
(b) Radiomarcagem de Precursor 37

Radiomarcagem foi realizada de acordo com o método descrito em Exemplo 8 para Agente de formação de imagem 29, mas com Gradiente
20 de HPLC como segue:

0 min	5%B
20 min	25%B
22,5 min	100%B
27 min	100%B
27,5 min	25%B
31 min	5%B

Exemplo 12: Síntese de Agente de formação de imagem 38

(a) Síntese de Precursor 38



O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (80 m g, 0,03 mmol) foi intumescida por 10 min em DMF. Ácido bromo-acético (250 m g,) e DCC (200 m g,) misturado e DCM (10 ml) foi adicionado. A lama foi deixada agitando por 1 h na RT e depois foi filtrada. A solução de DCM foi evaporada em rotavapor e DMF (10 ml) foi adicionada no resíduo. Depois DIEA (50 pl, 0,5 mmol) foi adicionada e a solução de DMF/DIEA foi adicionada na resina. A mistura de resina foi deixada borbulhando por 90 min e um teste de Kaiser negativo demonstrou que a reação havia alcançado a completitude. Após lavagem com DMF His(trc)OtBu (100 m g, 0,3 mmol) em DMF e DIEA (50 µL, 0,5 mmol) foi adicionado na resina. A mistura de resina foi deixada borbulhando durante a noite. A resina foi lavada intensamente com DMF/DCM e deixada na RT durante a noite. A resina foi clivada em TFA/TIS/H₂O (10:0,25:0,25) por 2 h, então filtrada, triturada em dietil-éter, evaporada em rotavapor e liofilizada. O peptídeo bruto foi analisado por LC-MS (20-40%B em 20 min). A análise demonstrou a presença de dois picos principais. A mistura de peptídeo bruto foi purificada por HPLC preparativa (20-35% B em 40 min). Uma fração foi colhida, analisada e liofilizada. Rendimento: 2 mg de sólido branco. Pureza por HPLC: 98%. ESI-MS: MW Teórico: 1917,3. Obtido (M+H)²⁺/2: 958,8.

(b) Radiomarcção de Precursor 38

1 ml de ^{99m}TcO₄ eluído de um gerador foi adicionado em um kit de Tc-carbonila (IsolinkTM, Mallinckrodt, Petten, Países-Baixos), 5 ml de espaço confinante foram removidos e o frasco foi aquecido a 100°C por 20 min. O frasco foi esfriado para temperatura ambiente, 1 ml de PBS 0,1M (pH 7,4) foi adicionado, o pH da solução foi medido e então ela foi analisada por TLC (Gel de Sílica da Merck – fase móvel = 99% de MeOH/1% de HCl).

200 µL de solução de ^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃ foram adicionados

em um frasco novo silanizado, juntos com 50µL/50µg de precursor em MeOH e 200 µL de tampão ácido 2-(N-morfolino)-etano-sulfônico 1M de pH 6,5. A solução foi aquecida a 60°C por 60 min e então foi analisada por HPLC e ITLC (tiras SG - fase móvel = solução salina).

- 5 Análises por HPLC inicial foram realizadas usando uma coluna Phenomenex Gemini (C₁₈ 150 mm x 4,6 mm, 5µm), solvente A = TFA 0,1%/H₂O, solvente B = TFA 0,1%/MeCN. UV medido a 254 nm.

Gradiente de HPLC:

Fluxo 1 ml / minuto

0 min	20%B
20 min	40%B
21 min	95%B
26 min	95%B
27 min-	20%B
32 min	20%B

- 10 Análises por HPLC subseqüentes foram realizadas usando quer uma coluna Phenomenex Gemini C₁₈ 150 mm x 2,1 mm (5 µm) -Vazão 0,2 ml/min para análises quer uma coluna Phenomenex Gemini C₁₈150 mm x 4,6 mm (3 µm) - Vazão 1,0 ml/min para purificações.

Solvente A = 0,06% amônia e solvente B = MeCN. UV foi medido em 214

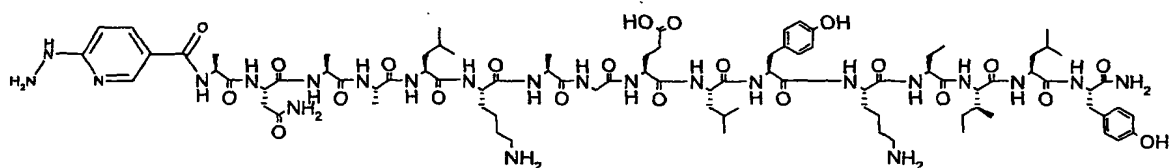
- 15 nm.

Gradiente de HPLC:

0 min	25%B
20 min	95%B
26 min	95%B
27 min	25%B
30 min	25%B

Exemplo 13: Síntese de Agente de formação de imagem 39

(a) Síntese de Precursor 39



- 20 O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (13 m g, 0,01 mmol) foi transferida para um frasco de microondas e Boc-HYNIC-NHS éster (5 m g, 0,015 mmol)/HOBt (2 m g, 0,015 mmol)/DIEA (8 µL, 0,0,6 mmol) em DMF (3 ml) foi adicionado. A mistura de resina foi deixada em repouso por 15 min na RT e depois foi deixada dentro de forno de microondas por 2 h a 60°C. A resina foi clivada em TFA/TIS/H₂O (10:0,25:0,25) por 2 h, então filtrada, triturada em dietil-éter, evaporada em rotavapor e liofilizada. O peptídeo bruto foi analisado por LC-MS (20-40%B em 20 min). A análise demonstrou a presença de dois picos principais. A mistura de peptídeo bruto foi purificada por HPLC preparativa (20-35% B em 40 min). Uma fração foi colhida, analisada e liofilizada. Rendimento: 1 mg de sólido branco. Pureza por HPLC: 98%. ESI-MS: MW Teórico: 1857,2. Obtido (M+H)²⁺/2: 929,5.

(b) Radiomarcagem de Precursor 39

50µL/50µg de precursor (em MeOH) foram adicionados em um frasco silanizado. 0,3 ml de tricina (30 mg em tampão acetato de amônio 0,1% pH 5) foi então adicionado no frasco seguido por 1 ml de tampão acetato de amônio 0,1% (pH 5). 0,5 ml de ^{99m}TcO₄⁻ (atividade 0,7-4,4 GBq) foi então adicionado no frasco seguido por 0,1 ml de solução salina de SnCl₂ purgada com N₂ (0,44 mm dm⁻³). Esta foi deixada reagir na temperatura ambiente por 30 min.

Análise por HPLC foi realizada usando uma coluna Phenomenex Gemini (C¹⁸ 150 mm x 4,6 mm, 5µm) Solvente A = tampão fosfato 10 mm de pH 6 e solvente B = MeCN. UV foi medido a 254 nm.

Gradiente de HPLC:

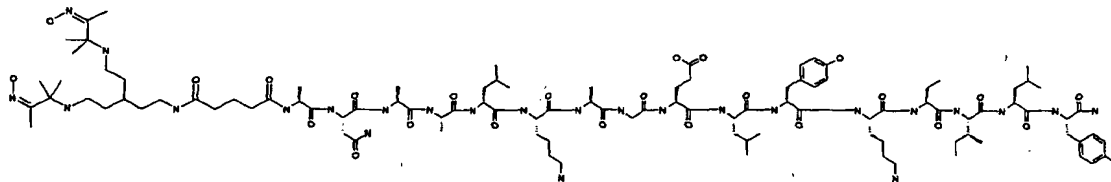
Fluxo 1 ml / minuto

0 min	20%B
20 min	40%B
21 min	95%B
26 min	95%B
27 min	20%B
32 min	20%B

ITLC tiras SG - fase móvel = solução salina

Exemplo 14: Síntese de Agente de formação de imagem 40

(a) Síntese de Precursor 40



O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (proteção de ivDde em Lisina) (182 mg, 0,1 mmol) foi clivada em TFA/TIS/H₂O (10:0,25:0,25) por 2 h, então filtrada, triturada em dietil-éter, evaporada em rotavapor e liofilizada. Quelato I-ácido glutárico (23 mg), PyAOP (25 mg), N MM (6 µL) foi dissolvido em DMF (3 ml) e adicionado no resíduo de peptídeo. A solução foi deixada agitando na RT durante a noite. O peptídeo bruto foi analisado por LC-MS (25-70%B em 20 min). A análise demonstrou a presença de dois picos principais. A mistura de peptídeo bruto (Lisina protegida) foi purificada por HPLC preparativa (30-60% B em 40 min). Três frações foram colhidas, analisadas e liofilizadas. Rendimento: 4,3 mg de sólido branco. Pureza por HPLC: 98%. Os grupos protetores ivDde foram removidos por dissolução do peptídeo (4 mg) em DMF (8 ml) e adição de hidrato de hidrazina (160 µL). A desproteção foi monitorada por HPLC, e após 20 min a reação alcançou a completitude. A amostra foi diluída com MeCN 10% /H₂O e o pH foi ajustado para 4. Depois o peptídeo foi purificado por HPLC (20-40% B em 40 min) e liofilizado para rendimento de 2,5 mg de sólido branco fofo. Pureza por HPLC: 98%. ESI-MS: MW Teórico: 2161,7. Obtido (M+H)²⁺/2: 1082,2.

(b) Radiomarcagem de Precursor 40

Radiomarcagem foi realizada como descrito em Exemplo 4 para Agente de formação de imagem 1, por 20 minutos na temperatura

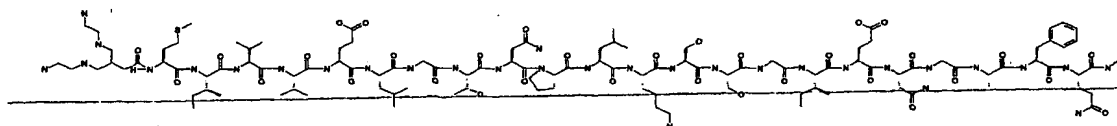
ambiente, com o seguinte gradiente de HPLC:

Fluxo 1,00 ml / minuto

0 min	25%B
20 min	60%B
21 min	95%B
27 min	25%B
32 min	25%B

Exemplo 15: Síntese de Agente de formação de imagem 41

(a) Síntese de Precursor 41



5 O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

Subseqüente à montagem automática a resina de peptídeo (70 m g, 0,03 mmol) foi intumescida por 10 min em DMF. TetraBoc-Quelato II NHS éster (70 m g, 0,1 mmol; Quelato II protegido com Boc descrito em Exemplo 3) foi misturado com PyAOP (50 m g, 0,1 mmol) e N MM (30 μ L, 0,3 mmol) em DMF (5 ml) por 3 min. N MM (20 μ L, 0,2 mmol) foi adicionada na resina e depois solução de Quelato II/PyAOP/N MM foi adicionada. A solução de resina foi deixada borbulhar durante a noite e um teste de Kaiser negativo demonstrou conversão de 100% para o peptídeo conjugado. O peptídeo foi clivado em TFA/TIS/H₂O (10:0,25:0,25) por 2 h, então filtrado, triturado em dietil-éter, evaporado em rotavapor e liofilizado. LC-MS (20-40% B em 20 min) demonstrou um único pico principal e o peptídeo bruto foi purificado por HPLC preparativa (20-30% B em 40 min). Uma fração foi colhida e deu 1 mg de sólido branco após liofilização. Pureza por HPLC: 98%. ESI-MS: MW Teórico: 2948,6. Obtido (M+H)³⁺/3: 983,4.

10

15

20

(b) Radiomarcção de precursor 41

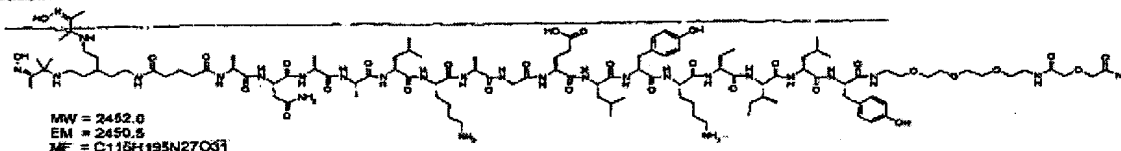
Radiomarcção foi realizada como descrito em Exemplo 4 para Agente de formação de imagem 1, com 50 μ g de precursor, por 20

minutos, na temperatura ambiente, com o seguinte gradiente de HPLC:

0 min	20%B
20 min	40%B
21 min	95%B
26 min	95%B
27 min	20%B
32 min	20%B

Exemplo 16: Síntese de Agente de formação de imagem 42

(a) Síntese de Precursor 42



O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

A peptidil-resina (0,05 mmol) foi tratada com uma solução de 2,5% de água e 2,5% de triisopropil-silano (TIS) em TFA (5 ml) por 2 horas. A resina foi removida por filtração e o filtrado foi evaporado em vácuo. Dietil-éter foi adicionado no resíduo. O precipitado resultante foi lavado com éter e seco com ar dando 95 mg de H-Ala-Asn-Ala-Ala-Leu-Lys(ivDdel-Ala-Gly-Glu-Leu-Tyr-Lys(ivDde)-Abu-Ile-Leu-Tyr-PEG(4)-diglicoloil-NH₂ bruto.

H-Ala-Asn-Ala-Ala-Leu-Lys(ivDde)-Ala-Gly-Glu-Leu-Tyr-Lys(ivDde)-Abu-Ile-Leu-Tyr-PEG(4)-diglicoloil-NH₂ (24 mg), Quelato 1-Glut éster ativo (62 mg), 1-hidróxi-7-aza-benzotriazol (HOAt) (7 mg) e sim.-colidina (66 µL) foram dissolvidos em 1-metil-2-pirrolidinona (NMP) (1 ml) e a mistura reacional foi agitada a 37°C durante a noite. A mistura reacional foi diluída com NMP (0,5 ml), água/TFA 0,1% (1 ml) e acetonitrila (ACN)/TFA 0,1% (1 ml) e o produto foi purificado usando HPLC preparativa dando 5 mg de Quelato I-Glut-Ala-Asn-Ala-Ala-Leu-Lys(ivDde)-Ala-Gly-Glu-Leu-Tyr-Lys(ivDde)-Abu-Ile-Leu-Tyr-PEG(4)-diglicoloil-NH₂ puro.

Quelato I-Ala-Asn-Ala-Ala-Leu-Lys(ivDde)-Ala-Gly-Glu-Leu-Tyr-Lys(ivDde)-Abu-Ile-Leu-Tyr-PEG(4)-diglicoloil-NH₂ (5 mg) foi

tratado com hidrazina mono-hidratada 2% /NMP (1 ml) por 30 minutos. ACN 10%/água/TFA 0,1% (4 ml) foi adicionado na mistura reacional e o produto foi purificado por HPLC preparativa (gradiente: 10-40% B durante 40 minutos onde A = H₂O/TFA 0,1% e B = ACN/TFA 0,1%, vazão: 10 ml/minuto, coluna: Phenomenex LunaTM 5 μm C₁₈ (2) 250 mm x 21,20 mm, detecção: UV 214 nm, tempo de retenção do produto: 35,0 min) dando 2,3 mg de produto puro. O produto bruto foi analisado por HPLC analítica (gradiente:10-40% B durante 5 minutos onde A = H₂O/TFA 0,1% e B = ACN/TFA 0,1%, vazão: 0,3 ml/minuto, coluna: Phenomenex LunaTM 3 μm C₁₈ (2) 20 mm x 2 mm, detecção: UV 214 nm, tempo de retenção do produto: 4,02 min). Caracterização adicional de produto foi realizada usando espectrometria de massa (MH₂²⁺ calculado: 1226,3, MH₂²⁺ verificado: 1226,3).

(b) Radiomarcção de precursor 42

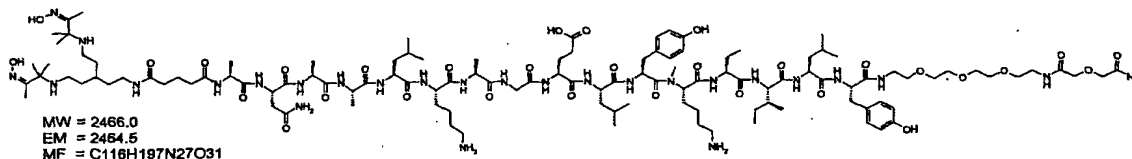
Radiomarcção foi realizada como descrito em Exemplo 4 para Agente de formação de imagem 1, por 20 minutos na temperatura ambiente, com o seguinte gradiente de HPLC:

Fluxo 1,00 ml / minuto

0 min	25%B
20 min	60%B
21 min	95%B
27 min	25%B
32 min	25%B

Exemplo 17: Síntese de Agente de formação de imagem 43

(a) Síntese de Precursor 43



O peptídeo foi montado como descrito para Agente de formação de imagem 1 em Exemplo 4 acima.

A peptidil-resina (0,05 mmol) foi tratada com uma solução de

2,5% de água e 2,5% de TIS em TFA (5 ml) por 2 horas. A resina foi removida por filtração e o filtrado foi evaporado em vácuo. Dietil-éter foi adicionado no resíduo. O precipitado resultante foi lavado com éter e seco com ar dando 77 mg de H-Ala-Asn-Ala-Ala-Leu-Lys(ivDde)-AlaGly-Glu-Leu-Tyr-N-Me-Lys(ivDde)-Abu-Ile-Leu-Tyr-PEG(4)-diglicolil-NH₂ bruto.

H-Ala-Asn-Ala-Ala-Leu-Lys(ivDde)-Ala-Gly-Glu-Leu-Tyr-N-Me-Lys(ivDde)-Abu-Ile-Leu-Tyr-PEG(4)-diglicolil-NH₂ (24 mg), Quelato I Glut éster ativo (62 mg), 1-hidróxi-7aza-benzotriazol (HOAt) (7 mg) e sim.-colidina (66 µL) foram dissolvidos em NMP (1 ml) e a mistura reacional foi agitada a 37 °C durante a noite. A mistura reacional foi diluída com NMP (0,5 ml), água/TFA 0,1% (1 ml) e ACN/TFA 0,1% (1 ml) e o produto foi purificado usando HPLC preparativa dando 6,5 mg de Quelato I-Glut-Ala-Asn-Ala-Ala-Leu-Lys(ivDde)-Ala-Gly-Glu-Leu-Tyr-N-Me-Lys(ivDde)-Abu-Ile-Leu-Tyr-PEG(4)-diglicolil-NH₂ puro.

Quelato I-Ala-Asn-Ala-Ala-Leu-Lys(ivDde)-Ala-Gly-Glu-Leu-Tyr-N-Me-Lys(ivDde)-Abu-Ile-Leu-Tyr-PEG(4)-diglicolil-NH₂ (6,5 mg) foi tratado com mono-hidrato de hidrazina 2% /NMP (1 ml) por 35 minutos. ACN10% /água/TFA 0,1% (8 ml) foi adicionado na mistura reacional e o produto foi purificado por HPLC preparativa (gradiente: 10-40% B durante 40 minutos onde A = H₂O/TFA 0,1% e B = ACN/TFA 0,1%, vazão: 10 ml/minuto, coluna: Phenomenex LunaTM 5 µm C₁₈ (2) 250 mm x 21,20 mm, detecção: UV 214 nm, tempo de retenção do produto: 31,0 min) dando 5,3 mg de produto puro. O produto bruto foi analisado por HPLC analítica (gradiente: 10-40% B durante 5 minutos onde A = H₂O/TFA 0,1% e B = ACN/TFA 0,1%, vazão: 0,3 ml/minuto, coluna: Phenomenex LunaTM 3 µm C₁₈ (2) 20 mm x 2 mm, detecção: UV 214 nm, tempo de retenção do produto: 3,52 min). Caracterização adicional de produto foi realizada usando espectrometria de massa (MH₂²⁺ calculado: 1233,3, MH₂²⁺ verificado: 1233,3).

(b) Radiomarcção de Precursor 43

Radiomarcção foi realizada como descrito em Exemplo 4 para Agente de formação de imagem 1, por 20 minutos na temperatura ambiente, com o seguinte gradiente de HPLC:

Fluxo 1,00 ml / minuto

0 min	20%B
20 min	55%B
21 min	95%B
27 min	20%B
32 min	20%B

5 **Exemplo 18: Ligação *in vitro* de Agente de formação de imagem 1 em colágeno de tipo I**

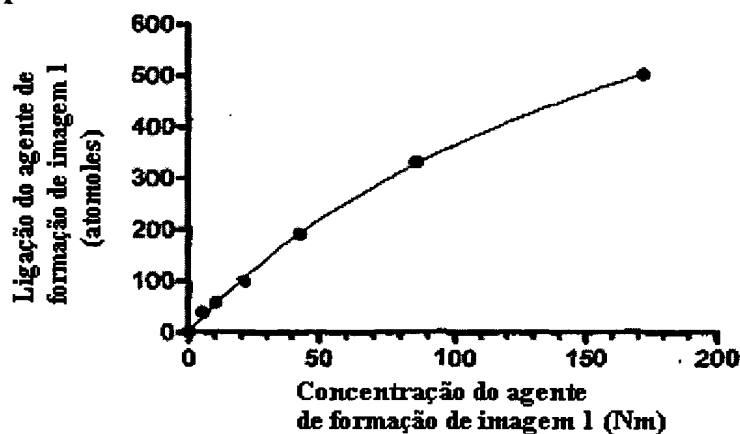
Uma placa Maxisorp foi incubada durante a noite a 4°C com 50µL ou 10 µL 0,1 mg/ ml de colágeno de tipo I. Todas as soluções foram removidas das cavidades usando uma pipeta. As cavidades foram lavadas
10 duas vezes com 200 µL de PBS, e então incubadas com 150µL de PBS contendo 0,1% de BSA por 30 minutos na temperatura ambiente. Cavidades foram lavadas cinco vezes com 200 µL de PBS, e então 90 µL de PBS foram adicionados em cada cavidade. 10 µL de Agente de formação de imagem I puro (e duas vezes serialmente diluído em PBS) foram adicionados nas
15 cavidades em quadruplicata. A placa foi vedada e incubada por 1 hora a 37°C.

As cavidades foram lavadas sete vezes com PBS gelado (200 µL); e então as cavidades foram transferidas para um frasco de vidro e contadas (medidas) para atividade de ^{99m}Tc usando um contador Wallac para uma contagem de 60 s para cada amostra.

20 Figura 1 abaixo ilustra a ligação de Agente de formação de imagem 1 em cavidades revestidas com colágeno de tipo I de um experimento. A curva (traço preto) foi ajustada usando uma hipérbole de ligação de um sítio de regressão não-linear modelada com GraphPad PRISM e derivada $B_{\text{max}}=1068$ atomoles e $K_d=194,2$ nM usando os dados ajustados (r^2
25 $= 0,9992$).

Ligação de Agente de formação de imagem I em placa revestida com

colágeno de tipo I



Exemplo 19: Biodistribuição *in vivo* de Agente de formação de imagem 1

18 Ratos machos Sprague Dawley (180-200 g) foram operados. Cada abdômen de animal foi raspado e esfregado com solução de betadina seguido por 5 mg/kg de carprofeno s.c. e 5 mg/kg de bupronorfina s.c. Sob anestesia de isoflurano uma laparotomia na linha média foi realizada e o duto biliar comum foi localizado. O duto biliar foi duplamente ligado (n = 9). A primeira ligação feita entre a junção dos dutos hepáticos e a segunda acima da entrada dos dutos pancreáticos. Antes do fechamento ~2-3 ml de solução salina foram administrados no peritônio. Fáscia e pele foram fechadas e animais foram administrados com 2 mg/kg de metacloprômida s.c, 5 mg/kg de Baytril s.c., ~2 ml de solução salina s.c. Carprofeno foi dado (5 mg/kg) conforme requerido durante os dois dias seguintes. Animais de controle sofreram cirurgia simulada onde o duto biliar foi manipulado e uma sutura foi passada sob o duto biliar (n = 9). Animais foram rigorosamente monitorados por 15 dias. No dia 16 após a cirurgia sob anestesia de isoflurano os animais foram injetados com 0,1 ml de Agente de formação de imagem 1 i.v. via veia da cauda (~1MBq). Órgãos foram dissecados a 5, 60 & 120 min após injeção (animais BDL). Órgãos foram dissecados a 5, 60 & 120 min (Animais simulados).

A tabela abaixo mostra a dose injetada percentual em vários instantes de tempo estudados.

	2 minutos		5 minutos		30 minutos		60 minutos		120 minutos	
	BDL	Simulado	BDL	Simulado	BDL	Simulado	BDL	Simulado	BDL	Simulado
Osso	3,9	2,9	3,0	3,0	0,8	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1
Músculo	18,5	16,1	19,0	16,6	3,9	1,6	1,6	0,5	1,1	0,2
Sangue	21,4	14,5	15,5	11,3	3,2	1,1	1,2	0,4	0,7	0,1
Rins	13,0	14,4	21,8	13,1	14,1	12,2	11,5	10,1	11,1	11,2
B & U	0,1	0,1	1,2	0,1	21,9	14,2	25,9	15,7	55,5	17,7
Pulmão	2,3	1,3	1,4	1,3	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1
Fígado	15,9	18,5	11,6	18,2	27,7	4,3	19,8	2,8	5,7	2,3
Baço	0,6	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1
Estômago	0,9	0,6	0,7	1,9	0,6	0,9	0,5	0,3	0,4	0,2
SI&LI	6,9	7,3	4,5	10,9	19,0	60,2	35,6	67,2	22,7	67,1
Coração	0,5	0,3	0,3	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tiróide	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pele	13,0	13,3	16,4	15,2	6,9	3,8	2,6	1,3	2,0	0,6
Carcaça	2,8	10,4	4,2	7,8	1,4	1,0	0,5	1,2	0,2	0,2
Sítio de Injeção	9,1	5,5	2,6	2,0	1,8	3,0	0,5	2,2	0,4	0,3

Exemplo 20: Modelo de ligação de duto biliar de fibrose hepática

Este modelo de ligação de duto biliar foi adaptado daqueles previamente descritos na literatura (e.g. Biecker *et al.* 2005 J. Pharm. Exp. Ther. 313(3) 952-961; Martinez-Prieto *et al.* 2000 Clinical Science 98(5) 611-617; Ubeda *et al.* 1994 Hepatology 19(6) 1431-1436).

1. Um abdômen de rato macho Sprague Dawley (180-200g) foi raspado e esfregado com solução de betadina seguida por 5 mg/kg de carprofeno s.c e 5 mg/kg de bupronorfina subcutaneamente (sc.).

2. Sob anestesia de isoflurano uma laparotomia de linha média foi realizada e o duto biliar comum foi localizado.

3. Duto biliar foi duplamente ligado. A primeira ligação foi feita entre a junção dos dutos hepáticos e a segunda cima da entrada dos dutos pancreáticos.

4. Antes do fechamento ~2-3 ml de solução salina foram administrados no peritônio.

5. Fáscia, e pele foram fechadas e os animais foram administrados com 2 mg/kg de metaclopromida s.c, 5 mg/kg de Baytril s.c., e ~2 ml de solução salina s.c.

6. Carprofeno foi dado (5 mg/kg) conforme requerido durante os dois dias seguintes.

7. Animais de controle sofreram cirurgia simulada onde o duto biliar foi manipulado e uma sutura passada sob o duto biliar.

8. Animais foram rigorosamente monitorados no período requerido.

5 9. No dia de biodistribuição sob anestesia de isoflurano os animais foram injetados intravenosamente (i.v.) via veia da cauda com 0,3 ml de composto radiomarcado (~2MBq)

10 10. Órgãos foram dissecados a 5, 60 & 120 min após injeção (animais BDL).

11. Órgãos foram dissecados a 5, 60 & 120 min (Animais simulados)

12. Radioatividade por grama de tecido em cada órgão foi determinada usando um contador Wallac.

REIVINDICAÇÕES

1. Agente de formação de imagem compreendendo um peptídeo ligante de colágeno (CBP) e um grupo de formação de imagem, caracterizado pelo fato de que o citado CBP é selecionado dos seguintes peptídeos:

- (i) RRANAALKAGELYKXaaILY
- (ii) GELYKXaaILY
- (iii) DARKSEVQK
- (iv) KELNVLYT

ou citado CBP é uma versão estabilizada, truncada e/ou cíclica de qualquer um destes peptídeos, ou é um homo- ou heterodímero de dois destes peptídeos ou versões truncadas dos mesmos;

nos quais Xaa pode ser qualquer um de cisteína, ácido 2-amino-butírico, metionina ou alanina;

e no qual o citado grupo de formação de imagem quer é uma parte integral de CBP quer está conjugado no CBP via um grupo químico adequado.

2. Agente de formação de imagem de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que o citado CBP é selecionado de:

(a) peptídeo (i) modificado em um ou mais dos seguintes modos:

- truncado para remover as 2 argininas N-terminais
- Xaa = ácido 2-amino-butírico ou cisteína
- resíduos de alanina metiladas
- resíduos de lisina metilada
- substituição de tirosina é com lisina
- adição de polietileno glicol e/ou diglicolila na terminação-C;

(b) peptídeo (i) modificado como em (a), e convertido em sua sequência retroinversa;

(c) peptídeo (ii) no qual Xaa = cisteína;

(d) peptídeo (iii) não-modificado ou ciclizado por meio de 2 resíduos de cisteína, cada um adicionado nas terminações-N e -C;

(e) peptídeo (iv) não-modificado, ou modificado por qualquer uma das ou ambas as seguintes maneiras:

- valina⁵ e leucina⁶ revertidas
- ciclizado por meio de 2 resíduos de cisteína, cada um adicionado nas terminações-N e -C.

3. Agente de formação de imagem de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que citado CBP é selecionado de:

- a) ANAALKAGELYKCILY-NH₂;
- b) ANAALKAGELYK-[Abu]-ILY,-NH₂;
- c) Ac-ANAALKAGELFK-[Abu]-ILY-NH₂;
- d) Ac-ANAALKAGELYK-[Abu]-ILF-NH₂;
- e) Ac-ANAALKAGELY-[NMeLys]-[Abu]-ILF-NH₂;
- f) Ac-AN-ENMeAlaJ-ALKAGELYK-[Abu]-ILF-NH₂;
- g) Ac-AN-[NMeAla]-ALKAGELY-[NMeLys]-[Abu]-ILF-NH₂;
- h) ANAALKAGELYK-[Abu]-ILY-[PEG(4)]-[diglicolil]-NH₂;
- i) ANAALKAGELY-[NMeLys]-[Abu]-ILY-[PEG(4)]-[diglicolil]-NH₂;
- j) ANAALKAGELYK-[Abu]-ILY-[PEG(4)]-[diglicolil]-COOH;
- k) D-ILI-[Abu]-KILEGAKLAANA-NH₂;
- l) GELYKCILY-NH₂;
- m) DARKSEVQK-NH₂;
- n) CDARKSEVQKC-NH₂ ciclizado via dois resíduos de cisteína adicionados;
- o) KELNVLYT-NH₂;
- p) KELNLVYT-NH₂;
- q) Ac-KELNLVYT-NH₂;

r) Ac-CKELNLVYTC-NH₂ ciclizado por ligação em ponte de dois resíduos de cisteína terminais adicionados; nas quais "Ac" é um grupo acetila, "Abu" é ácido 2-amino-butírico, "NMeLys" é lisina N-metilada, "NMeAla" é alanina N-metilada, e "PEG(X)" é uma cadeia de polietileno glicol de X unidades.

4. Agente de formação de imagem, caracterizado pelo fato de que o citado grupo de formação de imagem é selecionado de:

- (i) um íon de metal radioativo;
- (ii) um íon de metal paramagnético;
- (iii) um halogênio radioativo emissor de raios gama;
- (iv) um não-metal radioativo emissor de pósitron;
- (v) um núcleo RMN-ativo hiperpolarizado; e
- (vi) um repórter adequado para formação de imagem ótica *in vivo*.

5. Precursor para a preparação de agente de formação de imagem como definido nas reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de compreender o CBP como definido nas reivindicações 1-4 e um grupo químico capaz de reagir com uma fonte de um grupo de formação de imagem, no qual o citado grupo químico compreende:

- (i) um quelante capaz de complexar um grupo metálico de formação de imagem;
 - (ii) um derivado organometálico tal como trialquil-estanano ou um trialquil-silano;
 - (iii) um derivado contendo um haleto de alquila, tosilato de alquila ou mesilato de alquila para substituição nucleofílica; ou,
 - (iv) um derivado que alquila compostos contendo tiol para dar um produto contendo tio-éter,
- e no qual o citado grupo químico é quer uma parte integral de citado CBP ou está conjugado no citado CBP.

6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender o agente de formação de imagem como definido em qualquer uma das reivindicações 1-4 junto com um veículo biocompatível, em uma forma adequada para administração a humano.

5 7. Kit para a preparação da composição farmacêutica como definida na reivindicação 6, caracterizado pelo fato de compreender o precursor como definido na reivindicação 5.

10 8. Agente de formação de imagem de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de ser para uso em um método diagnóstico ou de formação de imagem *in vivo*.

 9. Método para diagnose ou formação de imagem *in vivo* em um indivíduo de uma condição na qual colágeno é formado, caracterizado pelo fato de compreender a administração da composição farmacêutica como definida na reivindicação 6.

15 10. Uso de agente de formação de imagem como definido em qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de ser para formar imagem *in vivo* em um indivíduo de uma condição na qual colágeno é formado no qual o citado indivíduo é previamente administrado com a composição farmacêutica como definida na reivindicação 6.

20 11. Uso de agente de formação de imagem de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de uma composição farmacêutica para formar imagem *in vivo* de uma condição na qual colágeno é formado.

25 12. Método de monitoração do efeito de tratamento de um corpo de animal ou de humano com uma droga para combater uma condição na qual colágeno é formado, caracterizado pelo fato de compreender a administração ao citado corpo de agente de formação de imagem como definido em qualquer uma das reivindicações 1-4 e detecção da captação de citado agente de formação de imagem.

RESUMO

“AGENTE DE FORMAÇÃO DE IMAGEM, PRECURSOR PARA A
PREPARAÇÃO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT
PARA A PREPARAÇÃO DA MESMA, MÉTODO PARA DIAGNOSE OU
5 FORMAÇÃO DE IMAGEM *IN VIVO* EM UM INDIVÍDUO DE UMA
CONDIÇÃO, USO DE AGENTE DE FORMAÇÃO DE IMAGEM, E,
MÉTODO DE MONITORAÇÃO DO EFEITO DE TRATAMENTO DE UM
CORPO DE ANIMAL OU DE HUMANO COM UMA DROGA”

A presente invenção proporciona um novo agente de formação
10 de imagem adequado para a visualização não invasiva de fibrose. Um
precursor para a preparação do agente de formação de imagem também é
proporcionado pela invenção, bem como uma composição farmacêutica
compreendendo o agente de formação de imagem e um kit para a preparação
da composição farmacêutica. Em um outro aspecto, uso do agente de
15 formação de imagem para formar imagem *in vivo* e na preparação de um
medicamento para diagnose que compreende fibrose é proporcionado.