(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 297 862**

(51) Int. Cl.:
A61K 51/08 (2006.01)
A61K 103/00 (2006.01)
A61K 103/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **97934115 .3**
(86) Fecha de presentación : **11.07.1997**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0975374**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2000**

(54) Título: **Análogos de péptidos que se unen a radiometales.**

(30) Prioridad: **12.07.1996 US 21662 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

(73) Titular/es: **Immunomedics, Inc.**
300 American Road
Morris Plains, New Jersey 07950, US

(72) Inventor/es: **McBride, William, J. y**
Griffiths, Gary, L.

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Análogos de péptidos que se unen a radiometales.

Antecedentes de la invención

Esta invención proporciona derivados de péptidos cíclicos y acíclicos biológicamente útiles en los que una o más cadenas laterales de aminoácidos o un segmento fijado a la cadena peptídica contienen restos quelantes que pueden unir firmemente iones metálicos, que incluyen radionúclidos. Los péptidos marcados llevan el metal a objetivos específicos *in vivo* tales como receptores y antígenos, y son útiles para la preparación de composiciones para la formación de imágenes radiodiagnósticas, para la terapia y la radioterapia. También se proporcionan métodos nuevos para preparar los péptidos.

Los péptidos radiomarcados son útiles en el diagnóstico y la terapia de una diversidad de enfermedades humanas que se caracterizan por la sobreexpresión de receptores de hormonas peptídicas. Así, por ejemplo, se ha demostrado que los análogos radiomarcados de LHRH (hormona liberadora de hormona luteinizante) y de somatostatina se unen selectivamente a tumores sensibles a hormonas caracterizados por la sobreexpresión en la superficie celular de receptores hormonales de LHRH. De forma similar, se han usado análogos de hormonas peptídicas tales como ^{123}I-péptido intestinal vasoactivo (VIP), ^{99m}Tc-P829, ^{111}In-DTPA-octreótido y ^{111}In-bis-MSH-DTPA para formar imágenes de tumores humanos que sobreexpresan receptores de VIP, somatostatina, somatostatina y hormona estimulante de melanocitos (MSH), respectivamente. Véase: Virgolini *et al*. Engl. J. Med. 169:1116 (1994); Virgolini *et al*. J. Nucl. Med. 36:1732, (1995); Lister-James *et al*. Nucl. Med., 36, 91P, #370, resumen de la reunión de 1995; Pearson *et al*. J. Med. Chem. 39:1361, (1996); Krenning *et al*. J. Nucl. Med., 33:652 (1992); y Wraight *et al*. Brit. J. Radiol. 65:112 (1992).

Muchos péptidos que contienen tirosina se pueden marcar con ^{125}I mediante métodos conocidos y usarlos para estudios de unión a receptores. Por ejemplo, la incidencia del aumento del receptor de VIP se ha estudiado *in vitro* en una gran diversidad de tipos de cáncer mediante el uso de ^{125}I-[Tyr^{10}]-VIP como radioligando. Véase Reubi, *Nucl. Med.* 36:1846 (1995). El receptor de VIP se detectó en una gran diversidad de tipos de cáncer, que incluyen tumores de mama, de próstata, ováricos, pancreáticos, endometriales, de vejiga, de colon, esofágicos, SCLC, astrocitoma, glioblastoma, meningioma, feocromocitoma, linfoma, neuroblastoma, adenoma, y GEP. También se ha usado un análogo de VIP yodado, ^{123}I-[Tyr^{10}]-VIP, para formar imágenes de tumores ricos en receptores de VIP en humanos. Véase Virgolini *et al*, anteriormente mencionado.

Sin embargo, el uso de radioyodo para usos diagnósticos y terapéuticos *in vivo* tiene diferentes desventajas. ^{123}I, el isótopo más útil *in vivo*, es muy caro (45,30 dólares/mCi) y se debe producir en un ciclotrón. Este isótopo, además, tiene una semivida de solamente 13,2 horas, por lo que es necesario que se produzca en una ubicación geográfica cercana al lugar en el que se debe usar cualquier agente radioyodado para la formación de imágenes. Se prefieren otros radioisótopos, tales como ^{99m}Tc y ^{188}Re, para usos diagnósticos y terapéuticos, respectivamente. ^{99m}Tc, por ejemplo, es barato (0,50 dólares/mCi), se puede conseguir fácilmente (se produce en un generador a partir de ^{99}Mo, un producto de reactor), y tiene una energía de emisión γ ideal para la formación de imágenes con una cámara γ.

Algunos péptidos contienen directamente o son susceptibles a la introducción de residuos que permiten la unión directa de radiometales tales como ^{99m}Tc y ^{188}Re al péptido. Por ejemplo, somatostatina contiene un enlace disulfuro que, tras la reducción, proporciona dos cadenas laterales de cisteína que contienen sulfhidrilo que pueden unir directamente ^{99m}Tc. Véase la patente de EE.UU. nº 5.225.180. Véanse además los documentos WO 94/28942, WO 93/21962 y WO 94/23758. Los complejos de este tipo tienden, sin embargo, a ser heterogéneos e inestables, lo que limita su utilidad clínica. Además, el uso de sulfhidrilos libres de esta manera limita los radiometales que se pueden usar para marcar el péptido a aquellos que se unen firmemente a los grupos S-B libres. Este método experimenta además el problema de que la unión directa del metal a una cadena lateral de aminoácido puede influir enormemente en la conformación del péptido, por lo que se alteran de manera adversa las propiedades de unión al receptor del compuesto.

La mayoría de los péptidos no contienen un motivo de secuencia de aminoácidos de unión de metal o, por diversas razones tales como las descritas anteriormente, no son susceptibles a modificaciones adecuadas de la secuencia que permitirían la introducción de tal motivo. Se debe introducir en el péptido, por lo tanto, algún medio para hacer que el péptido sea capaz de unir radiometales. Una aproximación preferida es fijar un ligando de unión de metal en un sitio especificado dentro del péptido, de manera que se forma un único complejo definido y estable. Los ligandos usados para unir metales contienen a menudo una diversidad de heteroátomos tales como nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno que tienen una elevada afinidad por los metales. Por ejemplo, el documento US 5.449.761 se refiere a construcciones de polipéptidos que seleccionan objetivos y con unión de metales que contienen un esqueleto de hidrocarburo unido al menos a dos unidades, y cada una comprende un resto -N-C(zs)- y un péptido. Además, el documento WO 96/40756 describe el resto de unión de radiometal PtscGC como se define en los ejemplos de referencia de la presente solicitud que comprende un residuo de tiourea, de glicocola y de cisteína, y dicho resto de unión está unido a análogos de péptidos de LHRH.

Los quelatos se han fijado convencionalmente por medio de enlaces covalentes al extremo N-terminal de un péptido o análogo de péptido, tras la síntesis independiente del péptido y de los restos de quelato. Por ejemplo, Maina *et al*. han descrito el acoplamiento de un quelador de tetra-amina al extremo N-terminal de un análogo de somatostatina,

lo que permite el marcado con ^{99m}Tc del péptido. Véase J. Nucl. Biol. Med. 38:452 (1994). El acoplamiento de esta manera es indeseable, sin embargo, cuando el extremo N-terminal del péptido desempeña un papel importante en sus propiedades de unión al receptor. Por lo tanto, la aplicación de este método está limitada por la necesidad de que el extremo N-terminal del péptido acomode la presencia de un quelador (habitualmente voluminoso estéricamente) sin afectar de manera adversa a las propiedades de unión del péptido.

De forma alternativa, se han introducido agentes quelantes en las cadenas laterales de péptidos por medio de reacciones selectivas de sitio que afectan a residuos de aminoácidos particulares. Por ejemplo, el residuo de lisina de la posición 6 de LHRH se ha acilado directamente con un grupo quelante. Véase Bajusz, S. *et al*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6313 (1989). Este método está limitado intrínsecamente por la carencia de selectividad química disponible cuando más de una cadena lateral puede reaccionar potencialmente con el quelador, o cuando la secuencia del péptido no contiene un aminoácido que se pueda derivatizar de esta manera. Una limitación adicional de esta aproximación puede surgir cuando se usan ligandos multidentados. Una única molécula de ligando puede reaccionar con múltiples moléculas de péptido, lo que da como resultado la formación de cantidades significativas de productos entrecruzados.

Se han introducido agentes quelantes en la cadena lateral de un péptido por medio de tris-aminoácidos como describió Dunn T.J. *et al*., documento WO 94/26294. Este método no proporciona un método para ciclar los péptidos. Los grupos protectores de las cadenas laterales usados para introducir el ligando descrito en este trabajo son los mismos que se usan generalmente para la ciclación amida de péptidos. Véase Felix *et al*. Int. J. Peptide Protein Res. 32:441 (1988).

Se ha sintetizado un agente quelante de BAT (bisaminotiol) completamente protegido y se ha acoplado a la cadena lateral de un residuo de lisina, que se pudo incorporar después en un péptido. Véase Dean et al., documento WO 93/25244. Estos precursores completamente protegidos consumen mucho tiempo, son caros y engorrosos de preparar. La dificultad y el gasto para preparar tales precursores hacen que este método sea insostenible para preparar una serie variada de ligandos fijados a la diversidad de ligadores que se necesitan para diseñar un agente de selección de objetivo que porta un metal.

Una solución potencial para este problema es usar una estrategia con grupos protectores que permita el acoplamiento selectivo de un resto quelador a posiciones especificadas dentro de una cadena peptídica. La diversidad de reactividades químicas presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos de un péptido ha llevado, sin embargo, a dificultades para conseguir una selectividad suficiente en la desprotección específica de sitio de los grupos protectores. Esta carencia de selectividad también ha dificultado hasta ahora los intentos de desproteger de manera selectiva dos o más grupos funcionales diferentes dentro de un péptido para permitir el acoplamiento de estos grupos, por ejemplo, en un péptido cíclico.

Edwards *et al*., J. Med. Chem. 37:3749 (1994), ha descrito un método con fragmentos para construir un disulfuro cíclico en una resina con la fijación posterior de un ligando intacto (DTPA). Esta aproximación proporcionó el agente conocido de selección de objetivo de somatostatina DTPA-octreótido. Esta aproximación se diseñó específicamente para la preparación de un compuesto conocido. Una situación más típica, sin embargo, requiere una diversidad de péptidos marcados para optimizar la unión a un objetivo particular. Tal situación requiere, por lo tanto, una aproximación más amplia que permita la construcción de múltiples ligandos, construidos mejor en fragmentos, colocados en cualquier punto deseado de una secuencia que también se puede ciclar en una diversidad de posiciones de la secuencia peptídica.

Las consideraciones adicionales para la síntesis de péptidos que pueden unir metales de manera selectiva incluyen el efecto del quelato sobre la conformación del péptido. La mayoría de los péptidos son sumamente flexibles conformacionalmente, mientras la unión eficaz al receptor requiere habitualmente que el péptido adopte una conformación específica. El hecho de si el péptido puede o no adoptar esta conformación específica se ve sumamente afectado por las interacciones entre cargas e hidrofílicas/hidrofóbicas, lo que incluye el efecto de un resto quelante de metal fijado de manera covalente. Es posible incrementar la afinidad y la selectividad por el receptor del péptido restringiendo las conformaciones que puede adoptar el péptido, preferiblemente mediante el bloqueo del péptido en una conformación activa. Esto se consigue a menudo más fácilmente preparando péptidos cíclicos. Los péptidos cíclicos tienen la ventaja añadida de una resistencia incrementada hacia las proteasas, y por lo tanto con frecuencia manifiestan una semivida biológica más larga que el péptido lineal correspondiente.

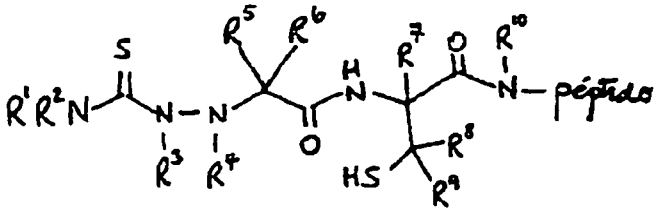
Los péptidos se pueden ciclar mediante una diversidad de métodos, tales como la formación de disulfuros, sulfuros y, en especial, la formación de lactamas entre las funciones carboxilo y amino de los extremos N- y C-terminales o de las cadenas laterales de los aminoácidos. Sin embargo, la plétora de funciones en una cadena peptídica significa generalmente que, para la mayoría de los péptidos excepto los más cortos, es muy difícil conseguir el acoplamiento selectivo entre dos grupos funcionales deseados de un péptido.

Está claro, por lo tanto, que son muy deseables los péptidos cíclicos que pueden quelar iones metálicos a la vez que mantienen la capacidad de unirse específicamente con una afinidad elevada a un receptor. También es deseable tener un medio para fijar un resto quelante a cualquier posición predeterminada de un péptido, y tener un medio para formar de manera selectiva péptidos cíclicos entre dos posiciones preseleccionadas cualesquiera de una cadena peptídica. Además, es deseable tener acceso a un método que permitiría acoplar un resto quelante a un péptido en cualquier etapa deseada durante la síntesis del péptido.

Resumen de la invención

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar péptidos que pueden unir radionúclidos a la vez que mantienen la capacidad de unirse específicamente al receptor del péptido. Es un objetivo adicional de la invención proporcionar métodos para preparar y radiomarcar péptidos que pueden unir radionúclidos a la vez que mantienen la capacidad de unirse específicamente al receptor del péptido. Es otro objetivo adicional de la invención usar los péptidos radiomarcados para la preparación de composiciones diagnósticas y terapéuticas para la formación de imágenes o para el tratamiento de un tumor, una lesión infecciosa, un infarto de miocardio, un coágulo, una placa ateroesclerótica, o un órgano o tejido normal.

Al llevar a cabo los anteriores objetivos de la invención se ha proporcionado, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, un péptido que comprende un resto de unión de radiometal, en el que dicho resto de unión comprende la estructura I:



en la que R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, y un grupo protector que se puede eliminar en las condiciones de síntesis peptídica, con tal de que al menos uno de R^1, R^2 o R^3 sea H. R^5, R^7, R^8, R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, arilo y arilo sustituido, y R^4 y R^6 juntos forman un enlace directo. R^8 y R^9 juntos o R^7 y R^9 juntos pueden formar un anillo cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, y NR^{10} está localizado en el extremo N-terminal de dicho péptido, o está localizado en una cadena lateral de aminoácido de dicho péptido.

En las realizaciones preferidas de la invención, R^1 es H, R^3 es H, R^4 es H, o R^4 y R^6 juntos forman un enlace directo. En otras realizaciones preferidas, R^2 es alquilo C_1-C_6 o fenilo sustituido o sin sustituir, o más preferiblemente metilo o fenilo. En otras realizaciones preferidas, R^8 y R^9 son metilo.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, los péptidos comprenden además un átomo metálico unido. En las realizaciones preferidas el átomo de metal es ^{99m}Tc, ^{186}Re o ^{188}Re.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar una composición quelante de metales, en el que se pone en contacto una disolución de un péptido que comprende un resto de unión de radiometal con iones estañosos, en el que el resto de unión tiene la estructura expuesta anteriormente, tras lo cual se pone en contacto la disolución con un radionúclido, y se recupera el péptido radiomarcado. En una realización preferida del método el radionúclido es ^{188}Re- o ^{186}Re-perrenato o ^{99}Tc-pertecnetato.

De acuerdo con aún otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de péptidos radiomarcados para la preparación de composiciones diagnósticas para la formación de imágenes de un tumor, una lesión infecciosa, un infarto de miocardio, un coágulo, una placa ateroesclerótica, o un órgano o tejido normal, que comprende administrar a un paciente humano un péptido radiomarcado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y, después de un tiempo suficiente para que se localice dicho péptido radiomarcado y para que se aclare la señal de fondo fuera del objetivo, el sitio o sitios de aumento de dicho péptido radiomarcado se detectan mediante una cámara externa de formación de imágenes, en el que el péptido radiomarcado se prepara poniendo en contacto una disolución de un péptido con iones estañosos, en el que el péptido comprende un resto de unión de radiometal que tiene la estructura expuesta anteriormente, y después poniendo en contacto dicha disolución con un radionúclido y recuperando el péptido radiomarcado.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporcionan péptidos que tienen una estructura seleccionada del grupo que consiste en:

(Chel)γAbuNleDHF$_d$RWK-NH$_2$

(Chel) γAbuHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH$_2$,

KPRRPYTDNYTRLRK (Chel) QMAVKKYLNSILN-NH$_2$

(Chel) γAbuVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH$_2$

(Chel) γAbuYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH$_2$

HSDAVFTDNYTRLRK (Chel) QMAVKKYLNSILN-NH$_2$

<GHWSYK (Chel) LRPG-NH$_2$, <GHYSLK (Chel) WKPG-NH$_2$.

AcNal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$ (Chel) LRPA$_d$-NH$_2$,

(Chel)γAbuSYSNleDHF$_d$RWK-NH$_2$, (Chel)γAbuNle<u>DHF$_d$RWK</u>-NH$_2$,

(Chel) Nle<u>DHF$_d$RWK</u>-NH$_2$,

Ac-HSDAVFTENYTKLRK(Chel)QNleAAK<u>KYLND</u>LKKGGT-NH$_2$,

(Chel)γAbuHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH$_2$,

(Chel)γAbuVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH$_2$,

(Chel)γAbuNle<u>DHF$_d$RWK</u>-NH$_2$[c], <GHWSYK (Chel) LRPG-NH$_2$,

<GHYSLK (Chel) WKPG-NH$_2$, AcNaldCpa$_d$W$_d$SRK$_d$ (Chel) LRPA$_d$-NH$_2$,

<GHYSYLK (Chel) WKPG-NH$_2$, <GHYSLK (Chel) WRPG-NH$_2$,

Nal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$ (Chel) WKPG-NH$_2$, <GHWSYK$_d$ (Chel) LRPG-NH$_2$,

AcNal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$ (Chel) LRPA$_d$-NH$_2$,

AcNal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$ (Chel) LRPA$_d$-NH$_2$,

AcNal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$ (Chel) LRPA$_d$-NH$_2$, <GHWSYK(Chel)LRPG-NH$_2$,

AcK(Chel) F$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-OH, AcK(Chel) DF$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-OH,

AcK(Chel)F$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-ol, AcK (Chel) DF$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-ol,

(Chel) DF$_d$<u>CFW$_d$ KTCT</u>-OH, K(Chel)DF$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-ol,

K(Chel)KKF$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-ol, K(Chel) KDF$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-OH,

K(Chel) DSF$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-OH, K(Chel)DF$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-OH,

K(Chel) DF$_d$<u>CFW$_d$KTCD</u>-NH$_2$, K (Chel) DF$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-NH$_2$,

K (Chel) KDF$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-NHNH$_2$, AcK (Chel) F$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-NHNH$_2$,

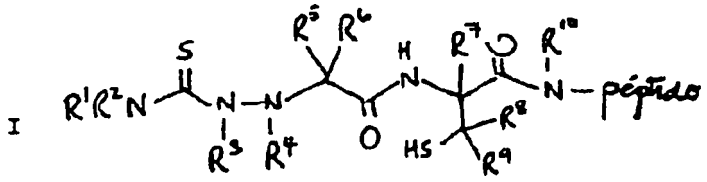
K (Chel) F$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>-ol, y F$_d$<u>CFW$_d$KTCT</u>K (Chel)-NH$_2$,

en las que (Chel) es un resto de unión de radiometal que tiene la estructura expuesta anteriormente.

Descripción detallada

La presente invención proporciona restos quelantes nuevos que se pueden unir de forma covalente a péptidos, péptidos cíclicos y análogos de péptidos. Los restos quelantes permiten que los péptidos, péptidos cíclicos y análogos de péptidos unan metales de manera estable, especialmente radiometales. También se proporcionan métodos para preparar estos queladores, péptidos y análogos de péptidos. Los péptidos y los análogos de péptidos se preparan introduciendo de forma específica de sitio los restos quelantes de metales en los péptidos que se sintetizan mediante métodos en fase sólida o en fase líquida. Los restos quelantes se pueden fijar a una cadena lateral que tiene amino de un aminoácido de la cadena peptídica, o se pueden fijar al extremo N-terminal del péptido. Los péptidos según la invención incluyen análogos cíclicos con unión de metal de LHRH, péptido intestinal vasoactivo (VIP), heregulinas (péptidos de unión a *erbB*) α, β1, β2 y β3, melanotropina (α-MSH), somatostatina, calcitonina, factor de crecimiento epidérmico, hormona liberadora de gonadotropina, hormona liberadora de hormona del crecimiento, dinorfina, péptido relacionado con el gen de calcitonina, vasotocina, mesotonina, hormona adrenocorticotrópica, corticotropina, gonadotropina, prolactina, vasopresina, oxitocina, sustancia P, sustancia K y angiotensina.

Los restos quelantes se representan mediante la fórmula general I:



en la que R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, y un grupo protector que se puede eliminar en las condiciones de síntesis peptídica. Al menos uno de R^1, R^2 o R^3 debe ser H. R^5, R^7, R^8, R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, arilo y arilo sustituido. R^4 y R^6 juntos forman un enlace directo, y R^8 y R^9 juntos o R^7 y R^9 juntos pueden formar también un anillo cicloalquilo o cicloalquilo sustituido. NR^{10} está localizado en el extremo N-terminal del péptido al que está fijado el quelador, o está localizado en una cadena lateral de aminoácido de ese péptido. Cuando R^1, R^2, R^5 o R^6 albergan una función sustituida con heteroátomo, el heteroátomo se puede usar también para llevar a cabo reacciones adicionales de acoplamiento al péptido.

Los ejemplos de grupos alquilo C_1-C_6 incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, s-butilo, t-butilo, n-pentilo, i-pentilo y n-hexilo. Cicloalquilo incluye cicloalquilo C_3-C_6, tal como ciclohexilo. Heterocicloalquilo incluye tetrahidrofurano, tetrahidropirano, pirrolidina y piperidina. Heteroarilo incluye pirrolilo, furanilo, tienilo, imidazolilo, oxazolilo, oxazoliltio, tiazolilo, pirazolilo pirrolidinilo, piridinilo, pirimidinilo, morfolinilo y piperizinilo. Arilo incluye arilo C_6-C_{12} tal como fenilo, α-naftilo o β-naftilo.

Alcarilo incluye: aril C_6-C_{12}-alquilo C_1-C_6, tal como fenilalquilo C_1-C_6, o α- o β-naftilalquilo C_1-C_6, tal como bencilo, feniletilo, fenilpropilo, fenilbutilo, fenilpentilo, α- o β-naftilmetilo, naftiletilo, naftilpropilo, naftilbutilo o naftilpentilo.

Los ejemplos de grupos sustituyentes incluyen: alcoxi C_1-C_6, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi; alquiltio C_1-C_6, por ejemplo metiltio, etiltio, propiltio; aril C_6-C_{12}-alcoxi C_1-C_6, por ejemplo fenilalcoxi C_1-C_6 tal como benciloxi; aralquiltio, por ejemplo fenilalquiltio C_1-C_6 tal como benciltio; amino, amino sustituido, por ejemplo alquilamino C_1-C_6 tal como metilamino, etilamino; aril C_6-C_{12}-alquilo C_1-C_6, tal como fenilalquilo C_1-C_6, por ejemplo bencilo; arilo C_6-C_{12} tal como fenilo; cicloalquilo C_3-C_8 tal como ciclohexilo; y cicloalquil C_3-C_8-alquilo C_1-C_6 tal como ciclohexilmetilo.

Las realizaciones preferidas de la invención incluyen compuestos en los que R^2 es H, metilo o fenilo, y en los que R^8 y R^9 son metilo. Otras realizaciones preferidas son aquellas en las que R^1, R^3, R^5, R^7 y R^{10} son H.

Los péptidos se pueden sintetizar mediante el uso de derivados de bis-aminoácidos protegidos de forma diferencial en los que cada función amino se puede desproteger selectivamente. Estos derivados se introducen en una cadena peptídica en crecimiento durante la síntesis del péptido mediante una metodología convencional de acoplamiento a péptidos. Después se desprotege selectivamente una de las funciones amino, lo que permite el acoplamiento posterior de todo o parte de una molécula quelante, o la adición de residuos de aminoácidos adicionales para continuar la síntesis del péptido. La síntesis del péptido se puede continuar mediante acoplamiento en el grupo α-amino, lo que lleva a un péptido con un esqueleto amida convencional, o en el grupo amino de la cadena lateral para producir un péptido cuyo esqueleto amida está interrumpido por la estructura de la cadena lateral. De forma alternativa, se puede usar la función amino libre para ciclar sobre un grupo funcional reactivo localizado en otra parte del péptido, por lo que se produce un péptido cíclico. Los bis-aminoácidos adecuados serán fácilmente aparentes para el técnico experto, e incluyen lisina, ornitina y ácido 2,3-diaminopropiónico (amino-serina). De forma alternativa, el resto quelante se puede introducir al final de la síntesis del péptido acoplando el resto quelante al extremo N-terminal desprotegido del péptido unido a la resina. El resto quelante se puede añadir como una unidad completa, en forma protegida o desprotegida, o se puede sintetizar por etapas para construir la estructura quelante completa.

Los bis-aminoácidos usados en la presente invención se pueden representar en general mediante la fórmula: ZHN-CH(-R-NHY)-CO_2H en la que R es $(CH_2)_n$ o $(CH_2)_n$-X-$(CH_2)_n$ en la que X es un heteroátomo tal como O, S o N y n=1-20. De forma alternativa, los átomos de hidrógeno de los grupos CH_2 se pueden sustituir con grupos alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido o alquenilo, o anillos cíclicos o heterocíclicos tales como ciclohexano, benceno y piperidina, u otros grupos conocidos para el técnico experto. Los sustituyentes Z e Y pueden ser independientemente H, N, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, arilo o arilo sustituido.

Si la síntesis del péptido continúa, se puede llevar a cabo la desprotección selectiva del segundo grupo amino del bis-aminoácido en cualquier momento durante la síntesis del péptido para introducir el resto quelante. Se puede sintetizar el resto quelante completo antes del acoplamiento al péptido, o se puede sintetizar mediante el acoplamiento secuencial de segmentos al péptido. Una vez que se completa la construcción de toda la estructura péptido/quelador, la escisión, desprotección y purificación proporciona el derivado deseado del péptido. Este derivado se marca después con un radiometal para el uso en aplicaciones radiodiagnósticas y radioterapéuticas.

De forma alternativa, si todo o parte de la molécula quelante se acopla primero al grupo amino desprotegido, la segunda etapa es desproteger el otro grupo amino y continuar con la síntesis del péptido. Si se acopla solamente parte del resto de quelador al péptido en esta etapa, la síntesis del quelador se puede finalizar en cualquier momento durante o después de la síntesis de la cadena peptídica mediante reacciones apropiadas de desprotección y acoplamiento. Las etapas finales de escisión, desprotección y purificación proporcionan de nuevo el derivado del péptido puro, que se radiomarca después como se mencionó anteriormente.

La fijación del quelador al péptido antes de la escisión de la resina da como resultado la formación reducida de productos de entrecruzamiento, incluso cuando se usan queladores multidentados activados tales como dianhídrido de DTPA.

La preparación de péptidos cíclicos se consigue mediante la desprotección selectiva de dos restos funcionales compatibles en posiciones especificadas de la secuencia del péptido, seguida de ciclación entre los restos compatibles. La ciclación se puede llevar a cabo entre dos puntos cualesquiera de la secuencia del péptido, lo que incluye entre los extremos N- y C-terminales, entre un extremo y un grupo funcional interno dentro de la secuencia del péptido, o entre dos grupos funcionales internos. La ciclación se puede llevar a cabo mediante el uso de síntesis de péptidos en fase líquida o en fase sólida, pero se lleva a cabo preferiblemente mediante el uso de técnicas en fase sólida.

La desprotección y la ciclación se pueden llevar a cabo en cualquier momento durante la síntesis del péptido antes de las reacciones finales de desprotección. Por ejemplo, se puede preparar la secuencia completa del péptido protegida antes de la ciclación, o la ciclación se puede llevar a cabo en un intermedio del péptido protegido, seguido por la finalización de la síntesis. De forma similar, la ciclación se puede llevar a cabo antes o después de que todo o parte del resto quelante de metal se acople al péptido. El uso de una resina fotoescindible o de otro tipo conocida para los expertos en la técnica en un sintetizador de péptidos en fase sólida permite también la liberación de un péptido protegido desde un soporte sólido, con la posterior desprotección y ciclación selectiva en fase líquida. De forma alternativa, las cadenas laterales a ciclar se pueden desproteger selectivamente antes de la escisión desde la resina, y la ciclación se lleva a cabo en fase líquida.

Las reacciones que afectan al extremo C-terminal del péptido, que incluyen pero no se limitan a las reacciones de ciclación, se pueden llevar a cabo por medio de la liberación de un péptido protegido de la resina de la manera descrita anteriormente. De forma alternativa, se puede fijar la cadena peptídica en crecimiento a la resina por medio de la cadena lateral de un residuo, y proteger de forma adecuada el grupo carboxilo C-terminal. Cuando se desea una reacción con el grupo carboxilo C-terminal, se desprotege selectivamente y se permite que se desarrolle la reacción. En el caso de las reacciones de ciclación, la desprotección del extremo C-terminal se puede llevar a cabo antes, durante o después de la desprotección selectiva del grupo reactivo compatible.

Los péptidos quelantes de radiometales de la presente invención retienen de forma estable el radionúclido en la sangre y otros líquidos y tejidos corporales. Tanto los reactivos como las condiciones del método presente se simplifican en gran medida con respecto a los del estado de la técnica, y los péptidos marcados son especialmente adecuados para la preparación de composiciones para aplicaciones de radiodiagnóstico y radioterapia mediante el uso de marcado con tecnecio o renio.

La aproximación resumida anteriormente permite la colocación de un resto de unión de radiometal en cualquier parte de una secuencia peptídica. La colocación del resto quelante en una cadena lateral de aminoácido, directamente o por medio de un grupo espaciador, en vez de en el extremo N-terminal de un péptido, tiene la ventaja añadida de distanciar espacialmente el complejo metálico del esqueleto del péptido, por lo que se minimiza el efecto del complejo metálico sobre la conformación del péptido. Esto también permite que se use el extremo N-terminal del péptido para ciclar el péptido, si es necesario.

Se sabe que la conformación peptídica está muy influida por las interacciones entre cargas e hidrofílicas/hidrofóbicas, y por lo tanto es importante considerar estas variables cuando se diseña un ligando quelante para usarlo en péptidos. Se prefiere que se prepare y se ensaye una diversidad de complejos quelantes de cargas e hidrofobicidades variables y que contengan grupos espaciadores de diversas longitudes para seleccionar el péptido con metal complejado que exhibe la combinación óptima de selectividad por el objetivo, farmacocinética y estabilidad del quelato. El técnico experto apreciará que tales ensayos son rutinarios en la técnica.

Los péptidos radiomarcados de la presente invención se unen específicamente a una célula o tejido enfermo que exhibe una densidad elevada de receptores y una afinidad elevada por el péptido. La radiactividad del radionúclido permite el diagnóstico y/o tratamiento del tumor o del tejido enfermo. La invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de al menos uno de los péptidos radiomarcados de la invención en combinación con un vehículo estéril farmacéuticamente aceptable, como se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences; Drug Receptors and Receptor Theory, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). La invención también incluye equipos para marcar péptidos que son útiles y fáciles de usar en un entorno clínico.

A. *Diseño y síntesis de péptidos lineales que incorporan restos quelantes*

(i) *En general*

Los péptidos de la invención contienen derivados de aminoácidos quelantes de radiometales como se definen en la reivindicación 1, que se caracterizan por la presencia de al menos un grupo tiol o tiocarbonilo, y al menos un nitrógeno presente como una amina terciaria, una hidrazona, o una amida o hidrazida secundaria. Los átomos de azufre y nitrógeno están dispuestos de manera adecuada para formar un ligando multidentado capaz de unir firmemente y de manera preferente un ión metálico. El ligando multidentado puede contener además un grupo espaciador que sirve para separar el metal quelado del resto del péptido. El ión metálico es preferiblemente un radionúclido reducido, y en una realización preferida es ^{99m}Tc, ^{186}Re o ^{188}Re.

La invención también proporciona un método para colocar ligandos para otros metales en cualquier punto de una secuencia peptídica. Estos ligandos se pueden introducir intactos, por ejemplo DTPA, o como fragmentos. De esta manera los ligandos para otros metales de interés médico que incluyen, pero no se limitan a, In, Ga, Y, Cu, Pt, Mn, Gd, Au, Ag, Hg y Lu, se pueden colocar en una secuencia peptídica de selección de objetivo.

El método permite la introducción de cualquier quelato o fragmento de quelato de metal que está protegido de manera adecuada para la síntesis del péptido. El método también proporciona un método para la introducción de derivados de ligando sensibles a bases que se pueden colocar en cualquier punto de la secuencia del péptido, mientras se introduzcan al final de la síntesis. Un ejemplo de referencia es la síntesis de un ligando fijado a la cadena lateral de lisina mediante el uso del siguiente fragmento de ligando, tritil-S-$COCH_2N(Boc)CH_2CO_2H$. El éster de S-tritilo será sensible a bases, de forma que no sería posible colocar este fragmento de ligando en el péptido en un momento anterior de la síntesis.

Cada uno de los restos quelantes de la invención se pueden preparar mediante métodos bien conocidos para el practicante experto de la técnica de síntesis orgánica. Los restos quelantes se construyen a partir de subunidades que se unen entre sí mediante reacciones simples de acoplamiento o de condensación, tales como la condensación de una función amina, hidrazina o hidrazida con un grupo carboxilo activado, el acoplamiento de hidrazinas con aldehídos, o las reacciones de aminación reductora entre aminas y aldehídos. Como se usa aquí, el término "condensación" pretende abarcar las reacciones que acoplan subunidades del resto quelante, y así abarca reacciones tales como la aminación reductora, además de las reacciones que se adaptan a la definición clásica de una reacción de condensación.

Tras la reacción de condensación, se pueden desproteger grupos funcionales adicionales de la subunidad para permitir reacciones de condensación adicionales. Por ejemplo, se puede condensar una segunda subunidad que porta un grupo carboxilo libre y una función amina protegida con una función amina, hidrazina o hidrazida en una primera subunidad para producir un fragmento mayor protegido de manera adecuada del ligando de unión de metal. La función amina del segundo resto de la subunidad se puede desproteger después y acoplarla adicionalmente a una tercera subunidad. Como se usa aquí, el término "fragmento" pretende abarcar una subunidad o construcción de subunidades que comprende todo o parte del ligando de unión de metal.

Los métodos para activar grupos carboxilo para tales reacciones de condensación son conocidos para los expertos en la técnica de síntesis orgánica y de síntesis de péptidos, e incluyen el uso de ésteres activos y de agentes de acoplamiento de carbodiimida y de fosforilazida. Los grupos protectores adecuados se usan para proteger las funciones de las subunidades cuando la reactividad de las funciones es incompatible con la reacción usada para unir las subunidades, o con las reacciones usadas para la síntesis de la cadena peptídica. Los grupos protectores para las funciones mercapto, amino y ácido carboxílico se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Greene, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley Interscience, NY, 1981). Las subunidades usadas para construir el quelato se preparan fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica, o están disponibles comercialmente de proveedores tales como Advanced ChemTech (Lexington, KY), Milligen (Burlington, MA), Applied Biosystems (Foster City, CA), o Aldrich Chemical Corp. (Milwaukee, WI).

Las reacciones de condensación usadas para unir las subunidades de quelador se pueden llevar a cabo antes de la síntesis del péptido, o durante la síntesis de la secuencia del péptido. Cuando el derivado de aminoácido se construye a partir de sus subunidades antes de la síntesis del péptido, las funciones α-amino y α-carboxilo se deben proteger de forma adecuada de una manera que sea compatible posteriormente con la desprotección y activación selectiva de estas funciones para la síntesis del péptido. Se conocen en la técnica ejemplos de tales grupos protectores, e incluyen los grupos fluorenmetiloxicarbonilo (Fmoc), benciloxicarbonilo (Cbz), butoxicarbonilo (Boc), aliloxicarbonilo (Aloc), 4-metoxitritilo (mtt), y 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etilo (Dde) para la protección de grupos amino. Los grupos para la protección de carboxilo incluyen los ésteres de metilo (Me), bencilo (Bn), 'butilo ('Bu) y alilo, respectivamente.

Los grupos protectores de grupos amino y carboxilo se deben seleccionar de forma que cada grupo se pueda desproteger selectivamente en presencia del otro. Se dice que tales restos protectores son ortogonales. La necesidad de usar grupos protectores ortogonales excluye, por ejemplo, el uso del grupo Cbz para la protección de la función amino en presencia de un grupo carboxilo protegido como un éster de bencilo. Véase Greene, anteriormente mencionado. En una realización preferida el grupo α-amino se protege como un grupo Fmoc, y el grupo α-carboxilo es un éster de metilo. El grupo protector de tiol usado en los compuestos de la invención puede ser cualquier grupo orgánico

o inorgánico que se elimine fácilmente en condiciones suaves, para regenerar el sulfhidrilo libre en presencia del péptido sin alterar sustancialmente la actividad de la proteína. Los grupos protectores adecuados se enumeran en Greene, anteriormente mencionado, págs. 193-217. Los ejemplos de grupos protectores adecuados incluyen grupos tritilo sustituidos y sin sustituir, ésteres de tiol, tiocarbamatos y disulfuros. En una realización preferida el grupo protector de tiol es un grupo tritilo o un grupo 4-metoxitritilo. Los expertos en la técnica están familiarizados con los procedimientos de protección y de desprotección de los grupos tiol. Por ejemplo, los tioésteres de benzoato se pueden desproteger en condiciones suaves y selectivas mediante el uso de hidroxilamina. Una vez que se completa la construcción del resto quelante protegido, la función α-carboxilo se desprotege y se acopla al extremo amino de la cadena peptídica mediante el uso de métodos convencionales de síntesis de péptidos. Véase Bodanszky *et al*., THE PRACTICE OF PEPTIDE SYNTHESIS (Springer Verlag, Heidelberg, 1984).

Cuando el derivado de aminoácido quelante de metal se construye a partir de sus subunidades durante la síntesis peptídica, la cadena del péptido se construye mediante síntesis convencional en fase líquida o, preferiblemente, en fase sólida hasta el momento en el que se debe incorporar el derivado. El bis-aminoácido protegido de manera diferencial se acopla después al extremo amino de la cadena peptídica. La desprotección selectiva posterior de uno de los grupos amino del derivado permite que continúe la síntesis del péptido o la síntesis del quelador.

Si la función α-amino se desprotege primero, todos o parte de los residuos de aminoácidos restantes se acoplan después a la cadena peptídica de manera convencional. La función amino de la cadena lateral del derivado se desprotege después, y el resto quelante se construye como se describió anteriormente. El péptido completo se puede desproteger y purificar después mediante métodos estándar.

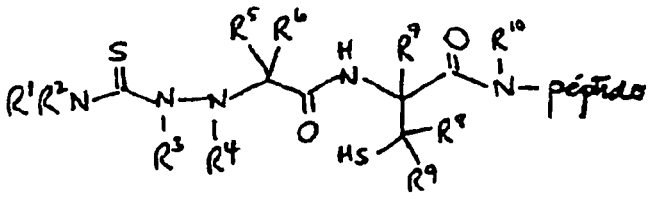
Si la función amino de la cadena lateral se desprotege primero, todo o parte del resto quelante se construye después como se describió anteriormente, seguido de la desprotección del grupo α-amino. La síntesis del péptido se completa de manera convencional como se describió anteriormente.

Una vez que la síntesis del péptido se completa, el péptido completamente protegido se desprotege y se purifica. Los métodos para la desprotección y la purificación de péptidos sintéticos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Bodanszky, anteriormente mencionado. Si el péptido se sintetizó mediante técnicas en fase sólida, el péptido se debe escindir además de la resina usada como soporte sólido para la síntesis. Los métodos para llevar a cabo esta escisión también se conocen en la técnica. Los métodos para purificar péptidos sintéticos tales como los de la presente invención también son conocidos para los expertos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, intercambio de iones, cromatografía de filtración en gel, y cromatografía líquida a alta presión de fase inversa (RP-HPLC). En una realización preferida de la invención, el péptido se purifica mediante RP-HPLC mediante el uso de empaquetamiento de una columna de sílice de octadecilsilano (C18) a escala preparativa, y elución con un gradiente de acetonitrilo en un 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). La pureza del péptido se puede confirmar mediante métodos estándar tales como RP-HPLC analítica o electroforesis capilar. La identidad del péptido se puede confirmar mediante espectroscopía de RMN o, en una realización preferida de la invención, mediante espectroscopía de masas.

Como se expuso anteriormente, es importante que el resto quelante no interfiera con la unión del péptido al receptor apropiado. La determinación de los residuos del péptido que se pueden sustituir sin afectar de manera adversa a la unión al receptor se puede llevar a cabo de una manera sistemática y sencilla preparando una serie de péptidos en la que cada residuo sucesivo se sustituye, por ejemplo, por alanina (un "barrido de alaninas"). Los péptidos sustituidos con alanina se criban después en función de su actividad biológica. Los sintetizadores de péptidos modernos hacen la síntesis de péptidos de esta manera bastante sencilla, y el cribado de un gran número de péptidos es rutinario para el técnico experto. La retención de la afinidad de unión elevada por el receptor en un péptido que contiene tal sustitución de alanina denota que el aminoácido sustituido es menos importante para la unión al receptor, e indica una posición en la que se puede colocar el residuo de unión de metal. La síntesis de péptidos en la que se coloca un quelador en cada una de estas posiciones es sencilla entonces, y el cribado rutinario establece la posición óptima para el quelador.

(ii) *Preparación de restos quelantes*

El quelador contiene un grupo tiol junto con un grupo tiosemicarbazona, y se puede representar mediante la fórmula general I:

I 

en la que R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo y un grupo protector que se puede eliminar en las condiciones de síntesis peptídica. Al menos uno de R^1, R^2 o R^3 debe ser H. R^5, R^7, R^8, R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo

C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, arilo y arilo sustituido. R^4 y R^6 juntos forman un enlace directo, y R^8 y R^9 juntos o R^7 y R^9 juntos pueden formar también un anillo cicloalquilo o cicloalquilo sustituido. NR^{10} está localizado en el extremo N-terminal del péptido al que se fija el quelador, o está localizado en una cadena lateral de aminoácido de ese péptido. Cuando R^1, R^2, R^5 o R^6 albergan una función sustituida con heteroátomo, el heteroátomo se puede usar también para llevar a cabo reacciones adicionales de acoplamiento al péptido.

Aunque para poner en práctica la invención no es necesaria la comprensión del mecanismo de la unión del metal por los restos quelantes, y sin desear limitarse por ninguna teoría, se cree que el metal se une al quelador por medio de los dos átomos de azufre más los dos átomos de nitrógeno. Se realiza la hipótesis de que los nitrógenos de unión del metal son el nitrógeno α del aminoácido que contiene β-tiol y el nitrógeno de tiocarbazona distal respecto del grupo tiocarbonilo. Cuando el metal es radioperrenato reducido o radiopertecnetato reducido, los dos átomos de azufre y los dos átomos de nitrógeno proporcionan cuatro posiciones de coordinación para el metal.

Estos compuestos se pueden preparar mediante métodos que se conocen bien en la técnica de síntesis orgánica. Así, por ejemplo, los compuestos que tienen la fórmula I se pueden preparar mediante acoplamiento amida entre un resto de aminoácido con α-carboxilo protegido que tiene una cadena lateral que contiene β-tiol protegido o sin proteger (un "aminoácido de tipo cisteína"), y un resto de tiosemicarbazona que contiene carboxilo. Este acoplamiento se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos conocidos, tales como acoplamiento mediado por carbodiimida. La desprotección del grupo α-carboxilo del aminoácido permite el acoplamiento amida del resto quelante a una cadena lateral de amina, o al extremo amino, del péptido. De forma alternativa, se puede acoplar primero al péptido un aminoácido de tipo cisteína protegido en S y N que tiene una cadena lateral que contiene β-tiol, seguido por desprotección en N y acoplamiento amida a un resto de tiosemicarbazona que contiene carboxilo.

Los aminoácidos de tipo cisteína se pueden preparar mediante métodos estándar de síntesis de aminoácidos. La configuración en el carbono α puede ser (R) o (S), o el aminoácido puede ser racémico. De forma similar, la configuración del carbono β cuando se sustituye de manera asimétrica puede ser (R), (S) o (R/S). El aminoácido se protege para las reacciones posteriores de acoplamiento mediante el uso de métodos estándar.

Las tiosemicarbazonas se pueden preparar mediante la condensación de semicarbazidas con compuestos de carbonilo. En una realización preferida, se hace reaccionar una tiosemicarbazida con ácido glioxílico para formar la tiosemicarbazona correspondiente.

(iii) *Agentes lineales de selección como objetivo de receptores de VIP*

El VIP natural tiene la secuencia:

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2

Un barrido de alaninas ha revelado varios residuos cuya sustitución con alanina no afecta en gran medida a la unión al receptor. Estos residuos incluyen Lys-15, Gln-16, Val-19, Lys-21, Asn-24, Ser-25 y los extremos N- y C-terminales. Estas posiciones son sitios posibles para la fijación de un ligando de unión de metal según la presente invención.

Los derivados quelantes basados en la fijación del ligando de unión de metal en estas posiciones incluyen aquellos con un resto de unión de metal fijado, directamente o por medio de un grupo espaciador, al farmacóforo por medio de la amina de la cadena lateral de una lisina u otro residuo de bis-aminoácido. Los derivados quelantes específicos de esta estructura general incluyen

MaGCγAbuHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2

AcCGCHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2

KPRRPYTDNYTRLRK(PtscGC)QMAVKKYLNSILN-NH_2

MaGCγAbuVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2

AcCGCVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2

MaGCγAbuYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2

HSDAVFTDNYTRLRK(PtscGC)QMAVKKYLNSILN-NH_2

HSDAVFTDNYTRLRK(Dtpa)QMAVKKYLNSILN-NH_2

HSDAVFTDNYTRLRK(AGC)QMAVKKYLNSILN-NH_2

en las que

Ma es ácido mercaptoacético,

PtscG es ácido 2-(4-fenil-3-tiosemicarbazidil)acético o $PhNHCSNHNHCH_2CO_2H$,

γAbu es ácido γ-aminobutírico, y

en K(PtscGC), los paréntesis indican que los aminoácidos encerrados están fijados a la amina ε de la lisina y el primer aminoácido fijado es C seguido por PtscG.

En cada uno de los compuestos descritos anteriormente el resto quelante se debe sustituir por un quelador de fórmula general I, como se describió anteriormente, para los fines de la presente invención.

(iv) *Agentes lineales de selección como objetivo de receptores de LHRH*

La LHRH natural tiene la secuencia

<GHWSYGLRPG-NH_2

en la que <G es ácido piroglutámico. Se sabe además que el péptido bicíclico $AcNal_dCpa_dW_d$ (ciclo4-10) D (ciclo5-8) $ER_dLKPDap$-NH_2 (en el que W_d indica que se usó el isómero D del aminoácido, Nal es 2-naftilalanina, Cpa es 4-clorofenilalanina y Dap es ácido 2,3-diaminopropiónico) se une al receptor de LHRH. Véase Bienstock *et al*. J. Med. Chem. 36:3265 (1993). Se sabe además que la cadena lateral de la posición 6 de LHRH es muy tolerante a los sustituyentes voluminosos. Véase Barbacci *et al*. J. Biol. Chem. 270:9585 (1995). Esta localización es un sitio posible para la fijación de un ligando de unión de metal según la presente invención.

Los derivados quelantes lineales basados en la fijación del ligando de unión de metal en esta posición incluyen aquellos con un resto de unión de metal fijado, directamente o por medio de un grupo espaciador, al farmacóforo por medio de la amina de la cadena lateral de una lisina o de otro residuo de bis-aminoácido. Los derivados quelantes lineales específicos de estas estructuras generales incluyen

<GHWSYK(MaGC)LRPG-NH_2

<GHYSLK(MaGC)WKPG-NH_2

<GHWSYK(Ma-azaGC)LRPG-NH_2

<GHYSLK(PtscGC)WKPG-NH_2

<GHYSLK(PtscGDap) WKPG-NH_2

<GHWSYK_d (MaGC) LRPG-NH_2

<GHYSLK(azaGGC)WKPG-NH_2

<GHWSYK(iECG)LRFG-NH_2

<GHWSYK_d(MtaGC_a)LRPG-NH_2

<GHYSLK(iECiD)WKPG-NH_2

<GHYSLK(DiGlyGDap)WKPG-NH_2

<GHYSLK(iDGDap)WKPG-NH_2

<GHWSYK(MtaGC)LRPG-NH_2

<GHWSK(MaGC)W_dLRPG-NH_2

<GHWSYK_d(MtaGDap)LRPG-NH_2

<GHWSYK_d(PtscGC)LRPG-NH_2

<GHWSYK_d(E)LRPG-NH_2

<GHWSYK_d(MtscGC)LRPG-NH_2

<GHWSY$_d$(Mta(hqss)GDap)LPG-NH_2

$AcNal_dCpa_dW_dSRK_d$(MaGC)$LRPA_d$-NH_2

$Nal_dCpa_dW_dSRK_d$(PtscGC)$LRPA_d$-NH_2

$AcNal_dCpa_dW_dSRK_d$(MaFC)$LRPA_d$-NH_2

$AcNal_dCpa_dW_dSRK_d$(azaGFC)$LRPA_d$-NH_2

en las que:

<G es ácido piroglutámico,

Ma es ácido mercaptoacético

azaG es azaglicocola o $H_2NNHCH_2CO_2H$,

PtscG es ácido 2-(4-fenil-3-tiosemicarbazidil)acético o $PhNHCSNHNHCH_2CO_2H$,

Dap es ácido 2,3-diaminopropiónico

iD es un ácido aspártico acoplado por medio del grupo carboxilo de la cadena lateral,

iE es un ácido glutámico acoplado por medio del grupo ácido de la cadena lateral,

DiGly es $HOOCCH_2NHCH_2COO$-,

Mta(hqss) es S-(2,5-dihidroxifenil-S-metil) sulfonioacetilo

C_a es una cisteína protegida con Acm

Mta es el metiltioéter del ácido mercaptoacético,

Nal es 2-naftilalanina,

Cpa es 4-clorofenilalanina,

en K_d, el subíndice d indica que se usó el isómero D, y

en K(MaGC), los paréntesis indican que los aminoácidos encerrados están fijados a la amina ε de la lisina y el primer aminoácido fijado es C seguido por G y terminando en Ma.

Además, se pueden preparar complejos de estos péptidos con metales que no son radiactivos. Tales complejos incluyen:

<GHWSYK(MaGC) LRPG-NH_2 ReO

<GHYSLK (MaGC) WKPG-NH_2 ReO

<GHYSLK_d (MaGC) LRPG-NH_2 ReO

En cada uno de los compuestos descritos anteriormente el resto quelante se debe sustituir por un quelador de fórmula general I, como se describió anteriormente, para los fines de la presente invención.

(v) *Agentes lineales de selección como objetivo de receptores de α-MSH*

La α-MSH natural tiene la secuencia:

Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH_2.

Se ha demostrado previamente que el péptido cíclico Nle<u>DHF$_d$RWK</u>-NH_2 (en el que Nle es norleucina y F_d indica D-Phe) tiene una afinidad elevada por el receptor de α-MSH y se sabe que es relativamente estable *in vivo*. Véase Al-Obeidi *et al*. J. Amer. Chem. Soc. 111:3413 (1989); Haskell-Luevano *et al*. J. Med. Chem. 39:432 (1996). La porción subrayada indica los residuos de la porción ciclada del péptido, y también los extremos de la estructura cíclica, es decir, el péptido está ciclado mediante un enlace amida de las cadenas laterales de ácido aspártico y lisina.

Los derivados quelantes lineales basados en las estructuras de estos péptidos de unión a receptores de α-MSH conocidos incluyen aquellos con un derivado quelante fijado al extremo N-terminal del péptido, directamente o por medio de un grupo espaciador, tal como ácido γ-aminobutírico (γ-Abu). Los derivados quelantes lineales específicos con esta estructura general incluyen:

MaGCγAbuSYSNleDHF$_d$RWK-NH_2, y

MaGCγAbuSYSNleDHF$_d$R$_n$WK-NH_2

en los que γ-Abu es ácido γ-aminobutírico y R_n es un residuo de arginina nitrado.

En cada uno de los compuestos descritos anteriormente el resto quelante se debe sustituir por un quelador de fórmula general I, como se describió anteriormente, para los fines de la presente invención.

B. *Diseño y síntesis de péptidos cíclicos que incorporan derivados de aminoácidos quelantes*

(i) *En general*

El proceso para preparar un complejo quelador-metal/péptido cíclico es análogo al descrito anteriormente para los péptidos lineales, excepto en que en algún momento durante o después de la síntesis de la cadena peptídica se lleva a cabo la ciclación. La ciclación se puede dar entre dos grupos funcionales cualesquiera del péptido, tales como los extremos del péptido o las cadenas laterales de los aminoácidos. La ciclación se puede llevar a cabo mediante formación de disulfuro o sulfuro, o preferiblemente mediante formación de lactama. La ciclación selectiva de sitio requiere la desprotección selectiva de dos grupos funcionales del péptido. Para la formación de lactama esto requiere el uso de un grupo protector de amino y de carboxilo que se puedan desproteger en presencia de otros grupos protectores de amino y de carboxilo. Esta tarea se hace más difícil cuando la síntesis del péptido también requiere que se lleve a cabo la desprotección selectiva entre estos otros grupos protectores. Por lo tanto, se ha comprobado que es difícil llevar a cabo en la práctica una estrategia de grupos protectores tan sofisticada.

Los métodos de la presente invención permiten que tanto la ciclación como el acoplamiento del resto quelador al péptido se lleven a cabo en cualquier momento durante la síntesis del péptido. El uso de grupos protectores apropiados permite que la síntesis del péptido, la construcción del ligando y la ciclación del péptido se lleven a cabo en cualquier orden que se desee. Esta aproximación es más eficaz que los métodos en fase sólida que ciclan el péptido separado de la resina, o que los métodos que fijan los ligandos en disolución tras la síntesis del péptido cíclico.

Los métodos de la presente invención se pueden usar en fase líquida, pero preferiblemente se llevan a cabo mediante el uso de un sintetizador de péptidos automatizado en fase sólida. El uso de un sintetizador automatizado de multi-pocillos permite preparar de manera simultánea un gran número de péptidos, que difieren en el punto de fijación del resto de quelador o en el sitio de ciclación. Las denominadas “bibliotecas combinatorias”, en las que los péptidos que contienen ligandos se desprotegen mientras todavía están fijadas al soporte sólido, se pueden hacer reaccionar con el metal apropiado para formar complejos y después cribarlas en un ensayo de bioactividad adecuado para seleccionar el compuesto que tiene las características deseadas óptimas de unión a receptor y estabilidad.

La síntesis combinatoria se puede llevar a cabo en síntesis “divididas” o mediante síntesis “paralelas”. En la síntesis dividida, los intermedios del péptido sintético unidos a microesferas se subdividen en diferentes grupos para la adición del siguiente aminoácido en cada etapa sucesiva. Después de cada etapa las microesferas se dividen en grupos diferentes para la siguiente reacción. En la síntesis paralela, se sintetizan compuestos diferentes en recipientes de reacción diferentes, tales como los pocillos de un sintetizador de péptidos. La síntesis dividida proporciona cantidades pequeñas de un gran número de compuestos, mientras la síntesis paralela proporciona cantidades mayores de un número más pequeño de compuestos.

La síntesis combinatoria también requiere que cada compuesto individual se marque de alguna manera para que se pueda identificar en la etapa de cribado. Se conocen en la técnica diversos medios para marcar compuestos para este fin. Por ejemplo, se usan compuestos aromáticos halogenados inertes como marcadores que se pueden identificar mediante cromatografía de gases. Véase Borman, Chem. Eng. News 74:29 (1996).

En una realización preferida de la invención, la ciclación se lleva a cabo mediante formación de lactama. Lo más preferiblemente, la función amino se protege mediante el uso de un grupo Aloc, y la función carboxilo se protege como un grupo éster de alilo. Esto permite la desprotección simultánea de las funciones amino y carboxilo mediante el uso de $Pd(PPh_3)_4$ en presencia de un nucleófilo para el grupo alilo. El nucleófilo usado generalmente es hidruro de tri-n-butil estaño (”Bu_3SnH).

Antes de la presente invención se sabía que las aminas reaccionarían con los iones alilo mediante catálisis con Pd^0. Véase, por ejemplo, Roos *et al*., J. Org. Chem. 60:1733 (1995) y Heck, PALLADIUM REAGENTS IN ORGANIC SYNTHESES, Academic Press, 1995, págs. 122-131. Los presentes inventores descubrieron que esto provocaba un problema para la desprotección simultánea de las funciones amino y carboxilo protegidas con alilo, debido a la reacción secundaria en la que la función amino recién desprotegida se alquilaba con el grupo alilo. Se descubrió, sin embargo, que la adición de piperidina como aceptor de grupos alilo durante la reacción de escisión de Aloc catalizada con Pd inhibió esta reacción secundaria indeseada. Esto permitió la desprotección, por ejemplo, de las cadenas laterales de ácido aspártico y lisina de forma selectiva y simultánea, a la vez que se reducía en gran medida la formación de la N^t-alil lisina indeseada. Los expertos en la técnica reconocerán que otras aminas primarias o secundarias también serán aceptores adecuados de grupos alilo.

Este método es útil y ventajoso porque es compatible con la síntesis de péptidos basada en Fmoc. Permite la preparación de péptidos cíclicos en resinas HMP y PAM en las que se puede usar la protección de cadenas laterales con Boc o Fmoc además de la protección de cadenas laterales con Aloc. Esta técnica permite además la síntesis de péptidos cíclicos que contienen un ligando de unión de metal fijado a la cadena lateral de un aminoácido en cualquier punto de una cadena peptídica. Así, se usan tres grupos protectores de nitrógeno ortogonales: uno para construir la cadena peptídica, tal como Fmoc o Boc; un segundo para fijar un ligando de unión de metal a una cadena lateral de un

bis-aminoácido tal como 4-metiltritilo (mtt) o 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etilo (Dde); y un tercero, tal como Aloc, para llevar a cabo la ciclación de cadena lateral a cadena lateral. Se pueden usar otros grupos protectores, tales como grupos Boc, Cbz, ^{t}Bu y bencilo para la protección de otras funciones amino y carboxilo de cadenas laterales que no se desprotegen hasta que ha finalizado la síntesis del péptido. Las combinaciones de estos grupos protectores permiten el uso de resinas de tipo Rink, Wang, Merrifield, PAM y HMP para la síntesis de péptidos en fase sólida. La escisión de los péptidos de la resina se puede llevar a cabo con ácido trifluoroacético (para las síntesis basadas en Fmoc) o HF o trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (para las síntesis basadas en Boc).

Los péptidos cíclicos de la invención tienen una longitud de 4 a 100 residuos, y tienen hasta 5 grupos quelantes de metales. Los péptidos pueden contener regiones cicladas que tienen una longitud de entre 2 y 60 aminoácidos, y pueden contener más de una porción cíclica.

La ciclación se da preferiblemente entre cadenas laterales amino y carboxilo de aminoácidos para formar puentes de lactama, pero también puede ser entre una amina de cadena lateral y el extremo carboxilo para formar un puente de lactama, entre un ácido de cadena lateral y la amina N-terminal para formar lactama, entre tioles para formar puentes disulfuro, entre hidrazinas y ésteres para formar hidrazidas, entre hidrazinas y aldehídos para formar hidrazonas, entre un tiol y un grupo saliente adecuado para formar un sulfuro, o entre un grupo hidroxilo y otro grupo saliente adecuado para formar un éter. Cuando hay presente más de una región cíclica en el compuesto, los puentes de las regiones cíclicas pueden ser del mismo o de diferentes tipos.

Cuando se debe formar un disulfuro cíclico, el péptido de interés se sintetiza preferiblemente mediante el uso de protección con Acm en los tioles y protección con Aloc en las cadenas laterales de amino. El Aloc se escinde y el ligando quelante se acopla al péptido. El grupo Acm se escinde después y el disulfuro se cicla mediante el uso de trifluoroacetato de talio. De forma alternativa, los tioles se pueden proteger mediante el uso de grupos S-tritilo, y la ciclación se puede llevar a cabo en disolución tras la escisión de la resina.

La preparación de un sulfuro cíclico se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante ciclación de un tiol con una función α-haloamido presente en una cadena lateral de amina. Así, por ejemplo, el péptido se puede sintetizar con protección con Fmoc en el extremo N-terminal y protección con S-tritilo en el tiol. Una cadena lateral de lisina protegida con Aloc se desprotege después y el quelador se acopla a la lisina como se describió anteriormente. El Fmoc se escinde y se hace reaccionar con cloruro de cloroacetilo o un reactivo equivalente. Si se usa una resina estable en ácidos tal como la resina BromoWang fotoescindible, Wang, J. Org. Chem. 41:3258 (1976), el grupo protector de tiol se elimina y el péptido se cicla en la resina.

Se preparan sulfuros cíclicos entre residuos de las cadenas laterales mediante el uso de un grupo protector adecuado en el extremo N-terminal del péptido que permite la desprotección selectiva en dos cadenas laterales amino protegidas de forma diferencial. Por ejemplo, el extremo N-terminal se puede proteger con un grupo acetilo o Boc, y las cadenas laterales se pueden proteger con grupos Fmoc y Aloc. Tras la síntesis del péptido, se desprotege selectivamente una cadena lateral de aminoácido (por ejemplo, Fmoc) y se acopla con el resto de quelato como se describió anteriormente. Otra cadena lateral amino (por ejemplo Aloc o Dde) se desprotege después y se acopla a un electrófilo de sulfuro tal como haloacetilo o maleimida. El grupo protector en el azufre de interés se escinde y se lleva a cabo la ciclación en la resina mediante el uso de un catalizador básico. De forma alternativa, el péptido se puede escindir y la ciclación se puede llevar a cabo en disolución.

(ii) *Agentes cíclicos de selección como objetivo de receptores de α-MSH*

La α-MSH natural tiene la secuencia Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH_2. Se ha demostrado previamente que el péptido cíclico Nle$\underline{DHF_dRWK}$ -NH_2 (en el que Nle es norleucina y F_d indica D-Phe) tiene una afinidad elevada por el receptor de α-MSH y se sabe que es relativamente estable *in vivo*. Véase Al-Obeidi *et al*. J. Amer. Chem. Soc. 111:3413 (1989); Haskell-Luevano *et al*. J. Med. Chem. 39:432 (1996). La porción subrayada indica los residuos de la porción ciclada del péptido, y también los extremos de la estructura cíclica, es decir, el péptido está ciclado mediante un enlace amida de las cadenas laterales de ácido aspártico y lisina. La estructura cíclica se usa como base para construir péptidos marcados según la presente invención.

Los derivados quelantes cíclicos basados en la estructura del ligando de unión a receptor de α-MSH conocido incluyen aquellos con un derivado quelante fijado al extremo N-terminal del péptido, directamente o por medio de un grupo espaciador, tal como ácido γ-aminobutírico (γ-Abu). Los derivados quelantes específicos de esta estructura general incluyen:

MaGCγAbuNle$\underline{DHF_dRWK}$-NH_2

PtscGCNle$\underline{DHF_dRWK}$-NH_2

AcCGCNle$\underline{DHF_dRWK}$-NH_2

DTPA-Nle$\underline{DHF_dRWK}$-NH_2

en las que

Ma es ácido mercaptoacético,

γAbu es ácido γ-aminobutírico,

PtscG es ácido 2-(4-fenil-3-tiosemicarbazidil)acético, y

DTPA es ácido dietilentriaminpentaacético.

En cada uno de los compuestos descritos anteriormente el resto quelante se debe sustituir por un quelador de fórmula general I, como se describió anteriormente, para los fines de la presente invención.

(iii) *Agentes cíclicos de selección como objetivo de receptores de VIP*

El VIP natural tiene la secuencia:

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2

Se cree que el VIP nativo forma una estructura helicoidal en disolución. Véase Musso *et al*. Biochemistry 27:8174 (1988). La estructura helicoidal putativa se puede estabilizar mediante ciclación intramolecular por medio de las cadenas laterales de residuos colocados en proximidad espacial por la estructura helicoidal. Los ejemplos incluyen:

Ac-HSDAVFTENYTKLRKONleAAKKYLNDLKKGGT-NH_2

Ac-HSDAVFTDNYTKLRKQNleAVKKYLNSVLT-NH_2

(en los que Nle es norleucina). Véase O'Donnell *et al*. J. Pharm. Exp. Ther. 270:1282; patente de EE.UU. nº 4.822.890; Bolin, sol. de pat. eur. 0 536 741 A2. La porción subrayada indica los residuos de la porción ciclada del péptido, y también los extremos de la porción ciclada, es decir, el péptido se cicla por medio de la formación de un enlace amida entre las cadenas laterales del ácido aspártico y de la lisina. Estas estructuras cíclicas se usan como base para construir péptidos marcados según la presente invención.

Los derivados quelantes cíclicos basados en estas estructuras incluyen aquellos con un resto de unión de metal fijado, directamente o por medio de un grupo espaciador, al farmacóforo por medio de la amina de la cadena lateral de una lisina u otro residuo de bis-aminoácido. Los derivados quelantes específicos de esta estructura general incluyen

Ac-HSDAVFTENYTRLRK(PtscGC)QNleAAKKYLNDLKKGGT-NH_2 (en el que PtscG = ácido 2-(4-fenil-3-tiosemicarbazidil)acético; y

Ac-HSDAVFTENYTKLRK(DPTA)QNleAAKKYLNDLKKGGT-NH_2 (en el que DTPA = ácido dietilentriaminpentaacético).

En cada uno de los compuestos descritos anteriormente el resto quelante se debe sustituir por un quelador de fórmula general I, como se describió anteriormente, para los fines de la presente invención.

Ejemplos de referencia

Ejemplo de referencia 1

Síntesis de N^{α}-Aloc-N^{ε}-Fmoc-L-lisina

Se suspendió N^{ε}-Fmoc-L-lisina (10,00 g, 27,1 mmoles, 100% mol, Bachem Biosciences, Inc.) en dioxano (100 ml) y Na_2CO_3 (1 M, 33 ml) para formar una suspensión lechosa. Se añadió cloroformato de alilo (3,2 ml, 30,2 mmoles, 111% mol) a dioxano (10 ml) y esta disolución se añadió gota a gota a la suspensión de N^{ε}-Fmoc-L-lisina durante 10 min. Se añadió carbonato sódico (1 M, 20 ml) en dos porciones y se añadió una cantidad adicional de cloroformato de alilo (0,3 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Los disolventes volátiles se eliminaron a presión reducida y el residuo se lavó con éter dietílico (50 ml). El líquido residual se acidificó después con HCl (1 M) y se extrajo con acetato de etilo (2x150 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con NaCl saturado (50 ml), se secaron con Na_2SO_4 y se evaporaron a presión reducida para obtener un producto oleoso bruto (16 g). El producto bruto se disolvió en éter (100 ml) y se formó un sólido blanco que se extrajo mediante filtración. El disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida para proporcionar un aceite amarillo pálido viscoso (8,34 g, 68% de rendimiento) que finalmente formó un sólido vítreo.

Ejemplo de referencia 2

Síntesis de 2-(trifenilmetilmercapto)acetil hidrazida

Se disolvió ácido 2-(trifenilmetilmercapto)acético (20,35 g, 60,9 mmoles, 100% mol) en THF anhidro (150 ml) y se refrigeró en un baño de agua helada. Se añadió carbazato de t-butilo (8,61 g, 65,1 mmoles, 107% mol) a la disolución de reacción seguido de diisopropilcarbodiimida (10,0 ml, 63,9 mmoles, 105% mol). La reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 28 horas. La mezcla de reacción se filtró para eliminar el precipitado blanco que se había formado, y el filtrado se concentró hasta una espuma blanca mediante la eliminación del disolvente a presión reducida. Este material se disolvió en cloroformo (75 ml). Después se añadió ácido acético (75 ml) seguido de la adición de eterato de trifluoruro de boro (10,0 ml, 81 mmoles, 134% mol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas y después se paró vertiendo la mezcla de reacción en agua (200 ml) que contenía acetato sódico (30 g). Esta mezcla se extrajo con cloroformo (2x100 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con disolución saturada de NaCl (150 ml), se secaron con Na_2SO_4 y se filtraron. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener un aceite dorado pálido que se solidificó en reposo. El sólido se suspendió en éter dietílico/hexanos 1:1 (200 ml) y se recogió mediante filtración. El sólido se lavó con una cantidad adicional de éter dietílico/hexanos 1:1 (100 ml) y se secó para proporcionar el producto deseado (15,44 g, 73% de rendimiento) que tenía un valor de MH^+ mediante ESMS calculado de 349, observado de 349.

Ejemplo de referencia 3

Síntesis de N^{β}-[2-(trifenilmetiltio)acetil]azaglicocola

Se disolvió monohidrato de ácido glioxílico (0,59 g, 6,41 mmoles, 110% mol) en metanol (20 ml) y se añadió 2-(trifenilmetilmercapto)acetil hidrazida (2,03 g, 5,82 mmoles, 100% mol). Se añadió dioxano (20 ml) a la mezcla de reacción turbia y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió borohidruro sódico (1,76 g) a la mezcla de reacción y después de 30 minutos se añadió otra cantidad de borohidruro sódico (0,60 g). La reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente, después se paró vertiendo la mezcla de reacción en HCl (1 M, 60 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2x50 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con disolución saturada de NaCl (40 ml), se secaron con Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron a presión reducida en rotavapor para proporcionar un sólido (2,5 g) que tenía un valor de MH^+ mediante ESMS calculado de 407, hallado de 407.

Ejemplo de referencia 4

Síntesis de N^{α}-Boc-N^{β}-[2-(trifenilmetiltio)acetil] azaglicocola

Se disolvió N^{β}-[2-(trifenilmetiltio)acetil]azaglicocola (2,39 g, 5,89 mmoles, 100% mol) en dioxano (50 ml). Se añadió dicarbonato de di-t-butilo $(BOC)_2O$, (2,07 g, 9,48 mmoles, 161% mol) a la disolución de reacción seguido por la adición de Na_2CO_3 (1 M, 15 ml). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos, y después se añadieron cantidades adicionales de Na_2CO_3 (1 M, 10 ml) y $(BOC)_2O$ (1,41 g). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y después se hizo reaccionar con NaOH (6 M, 3 ml) y $(BOC)_2O$ (1,4 g) durante 1 hora. La mezcla de reacción bruta se acidificó después hasta pH 3 con ácido cítrico (1 M) y se extrajo con acetato de etilo (200 ml). La capa orgánica se lavó con disolución saturada de cloruro sódico (60 ml), se secó con Na_2SO_4, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el producto bruto. El producto bruto se disolvió en éter y se diluyó para obtener una mezcla 1:1 con hexanos que provocó que se formase un precipitado blanco. El sólido blanco se recogió mediante filtración para obtener el producto deseado (1,48 g, 50% de rendimiento) que tenía un valor de MH^+ mediante ESMS calculado de 507, hallado de 507.

Ejemplo de referencia 5

Síntesis de ácido 2-(4-fenil-3-tiosemicarbazidil)acético

Se suspendió 4-fenil-3-tiosemicarbazida (6,02 g, 36 mmoles, 100% mol) en metanol (40 ml). Se añadió monohidrato de ácido glioxílico (3,32 g, 36,1 mmoles, 100% mol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió cuidadosamente borohidruro sódico (1,50 g), y la mezcla de reacción burbujeó vigorosamente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se añadió $NaBH_4$ (0,66 g), seguido por la adición de ácido acético glacial (6 ml). Después de 15 minutos se añadió $NaBH_4$ (1,08 g), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Después se añadió una cantidad adicional de $NaBH_4$ (1,66 g) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, antes de pararla con HCl (1 M, 200 ml). La mezcla se extrajo después con acetato de etilo (2x150 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con disolución saturada de NaCl (100 ml), se secaron con Na_2SO_4, se filtraron, y el disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar un sólido amarillo (9,03 g) que tenía un valor de $M\text{-}H^+$ mediante ESMS en modo de ión negativo calculado de 224, hallado de 224.

Ejemplo de referencia 6

Síntesis de ácido N^{β}-Boc-2-(4-fenil-3-tiosemicarbazidil)acético

Se disolvió ácido 2-(4-fenil-3-tiosemicarbazidil)acético (8,93 g, 37,9 mmoles, 100% mol) y $(BOC)_2O$ (9,10 g) en dioxano (100 ml). Se añadió carbonato sódico (1 M, 50 ml) y agua (50 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadió hidróxido sódico (1 M, 40 ml) y una cantidad adicional de $(BOC)_2O$ (6,21 g), y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se paró con ácido cítrico (1 M) y se extrajo con acetato de etilo (2x100 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con NaCl saturado (50 ml), se secaron con Na_2SO_4, y se filtraron. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un sólido gomoso (19 g). El sólido bruto se suspendió en éter y se recogió mediante filtración un sólido blanco. El sólido se lavó con éter (100 ml) para obtener el producto deseado (3,17 g) que tenía un valor de MH^+ mediante ESMS calculado de 326, hallado de 326.

Ejemplo de referencia 7

Síntesis de N^{α}-(trifenilmetilsulfenil)-N^{β}-(Boc)azaglicocola

Se condensó carbazato de t-butilo con monohidrato de ácido glioxílico en metanol. Esta hidrazona bruta se redujo después mediante hidrogenación catalítica con un 10% de Pd/C. Este producto se mezcló después con dioxano y base y se añadió gota a gota una disolución en dioxano de cloruro de trifenilmetanosulfenilo. La N^{α}-(trifenilmetilsulfenil)-N^{β}-(Boc)azaglicocola deseada (25 g) se obtuvo tras el tratamiento.

Ejemplo de referencia 8

Síntesis en fase sólida de péptidos mediante el uso de grupos protectores Aloc y Fmoc

Se llevó a cabo la síntesis peptídica en fase sólida a una escala de 0,050 mmoles mediante el uso de un sintetizador de péptidos modelo 348 de Advanced ChemTech modificado para operar en atmósfera de nitrógeno de la misma manera que el modelo 396. Se emplearon los grupos aliloxicarbonilo (Aloc) y 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) para la protección de nitrógenos, y se usaron diisopropilcarbodiimida (DIC)/hidroxibenzotriazol (HOBT) para activar los grupos carboxilo para el acoplamiento. Se usó una diversidad de resinas tales como Rink, Pal, y TentaGel S RAM para las amidas C-terminales y Wang, 2-clorotritilo o TentaGel S PHB para los ácidos C-terminales.

Para permitir la introducción del resto de quelato de unión de metal y/o para permitir la ciclación por medio de cadenas laterales de aminoácidos desprotegidas selectivamente, se usó un bis-aminoácido protegido de forma diferencial para la síntesis del péptido. Los derivados de bis-aminoácidos protegidos de forma diferencial elegidos fueron α-Aloc-Lys(ε-Fmoc)OH y α-Fmoc-Lys(ε-Aloc)OH. El derivado α-Aloc-Lys(ε-Fmoc)OH permitió que los fragmentos de ligando se introdujeran en la cadena lateral mediante el uso de un procedimiento rutinario con Fmoc.

Los grupos Aloc se escindieron en el aparato en el modo manual lavando el péptido unido a la resina con diclorometano (3x porciones de 2 ml) y después mezclando la resina con una disolución (2 ml) que contenía tetrakis (trifenilfosfina)paladio[0] (10 mg) y ácido acético (0,1 ml). Después se añadió hidruro de tributilestaño (0,3 ml) y la mezcla se agitó en vórtex durante una hora. La célula de reacción se vació después, la resina se lavó con diclorometano (3 x 2 ml) y después se reanudó la síntesis con Fmoc estándar. Los péptidos se escindieron de la resina con una disolución de ácido trifluoroacético (TFA), anisol y etanoditiol durante 1 a 3 horas en la proporción 23:3:1. La mezcla de escisión bruta se vertió después en éter para precipitar el péptido bruto, que se purificó después mediante HPLC de fase inversa mediante el uso de un sistema de cartuchos Prep Pak C-18 de Waters Delta Pak eluidos con un gradiente apropiado de TFA (0,1%) en agua y/o TFA (0,1%) en acetonitrilo (90%) y agua (10%). Se recogieron las fracciones que contenían los péptidos purificados deseados, y los disolventes volátiles se eliminaron a presión reducida para obtener las disoluciones acuosas de los péptidos que después se liofilizaron. Las muestras de los productos liofilizados se mandaron después a analizar mediante electronebulización (ESMS) o bombardeo con átomos rápidos (FABMS) para confirmar que la masa observada de los productos coincidía con la masa calculada del péptido deseado.

La siguiente tabla muestra algunas de las secuencias de los péptidos de referencia sintetizados mediante los métodos descritos anteriormente.

Péptido	HPLC[a]	PM[b]
<GHWSYGLRPG-NH_2	6,1	1183
<GHYSLEWKPG-NH_2	6,2	1227
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2	6,7	3326
MaGCγAbuHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2	7,3	3645
MaGCγAbuVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2	7,5	3235
MaGCγAbuNle<u>DHF$_d$RWK</u>-NH_2[c]	7,0	1302
<GHWSYK(MaGC)LRPG-NH_2	6,3	1488
<GHYSLK(MaGC)WKPG-NH_2	6,3	1460
<GHWSYK(Ma-azaGC)LRPG-NH_2	6,1	1503
<GHYSLK(PtscGC)WKPG-NH_2	6,9	1536
AcNal_dCpa$_d$W$_d$SRK$_d$(MaGC)LRPA$_d$-NH_2	8,2	1668
<GHYSYLK(PtscGDap)WKPG-NH_2	6,6	1519
<GHYSLK(azaGGC)WKPG-NH_2	6,5	1474
Nal_dCpa$_d$W$_d$SRK$_d$(PtscGC)WKPG-NH_2	8,1	1701
<GHWSYK$_d$(MaGC)LRPG-NH_2	6,3	1488
AcNal_dCpa$_d$W$_d$SRK$_d$(AzaGFC)LRPA$_d$-NH_2		
AcNal_dCpa$_d$W$_d$SRK$_d$(MaFC)LRPA$_d$-NH_2		
AcNal_dCpa$_d$W$_d$SRK$_d$(PtscGC)LRPA$_d$-NH_2		
<GHWSYK(iDGDap)LRPG-NH_2		
<GHWSYK(iECG)LRPG-NH_2		

[a] Método de HPLC [tiempo de retención en minutos] El disolvente A es ácido trifluoroacético al 0,1% en agua, el disolvente B es ácido trifluoroacético al 0,1% en acetonitrilo/agua 90:10. El caudal de disolvente es de 3 ml/min durante 10 min.

-- Después 5 ml/min durante 5 min. El gradiente es 0 a 100% de B durante 10 min y después 100% de B durante 5 min

[b] Valores del espectro de masas mediante electronebulización (MH^+)

[c] La secuencia subrayada está ciclada en forma de amida cíclica que conecta los grupos funcionales de las cadenas laterales

Abreviaturas usadas en la tabla

<G: ácido piroglutámico

PtscG: ácido 2-(4-fenil-3-tiosemicarbazidil)acético o $PHNHCSNHNHCH_2CO_2H$

Ma: ácido mercaptoacético

azaG: azaglicocola o $H_2NNHCH_2CO_2H$

Dap: ácido 2,3-diaminopropiónico

γAbu: ácido γ-aminobutírico

Nal: 2-naftilalanina

Cpa: 4-clorofenilalanina

K_d: el subíndice d indica que se usó el isómero D

K(MaGC): los paréntesis indican que los aminoácidos encerrados están fijados a la amina ε de la lisina y el primer aminoácido fijado es C seguido por G y terminando en Ma

iD: ácido isoaspártico

iE: ácido isoglutámico

Otros péptidos de referencia y péptidos que están dentro del alcance de la reivindicación 1 que tienen como resto de unión de radiometal TscGC o MtscGC sintetizados mediante estos métodos incluyen:

Secuencia	MH+	TR de HPLC
AcK(TscGC)F_dCFW$_d$KTCT-OH	1436	7,7
AcK(TscGC)DF_dCFW$_d$KT-OH	1552	7,4
TscGCDF_dCFW$_d$KTCT-OH	1381	7,7
AcK(TscGC)F_dCFW$_d$KTCT-ol	1422	7,6
AcK (MtscGC) F_dCFW$_d$KTCT-ol	1436	7,8
AcK(TscGC)DF_dCFW$_d$KTCT-ol	1537	7,4
AcK (MaGG)F_dCFW$_d$KTCT-ol	1378	7,4
K (TscGC) DF_dCFW$_d$KTCT-NH_2	1508	7,1
K (TscGC) KKF_dCFW$_d$KTCT-ol	1651	7,2
K(TscGC) KDF_dCFW$_d$KTCT-OH	1637	7,3
K(TscGC)DF_dCFW$_d$KTCT-ol	1495	7,2
K(TscGC)DSF_dCFW$_d$KTCT-OH	1596	7,4
K(TscGC)DF_dCFW$_d$KTCT-OH	1508	7,2
K (TscGC) DF_dCFW$_d$KTCD-NH_2	1521	7,1
K (TscGC) KDF_dCFW$_d$KTCT-$NHNH_2$	1651	7,2
AcK(TscGC) F_dCFW$_d$KTCT-$NHNH_2$	1450	7,4
K(AGC)F_dCFW$_d$KTCT-ol	1379	6,8
AcK (TscGC)DF_dCFW$_d$KTCT-ol	1537	7,4
F_dCFW$_d$KTCTK(TscGC)-NH_2	1393	6,8

La porción subrayada de la secuencia es cíclica. TscG es 3-tiosemicarbazonilglioxilo, es decir $H_2NCSNHNCHCO$-

MtscG es 4-metil-3-tiosemicarbazonilglioxilo, es decir $CH_3NHCSNHCHCO$-

Ma es mercaptoacetilo: $HSCH_2CO$-

Los grupos enumerados entre paréntesis están fijados a la cadena lateral del aminoácido a la izquierda del paréntesis.

Ejemplo de referencia 9

Preparación de un análogo cíclico de MSH que contiene un resto quelante

El método para sintetizar péptidos cíclicos se demostró preparando el análogo cíclico de la hormona estimulante de melanocitos α (αMSH) MaGCγ-AbuNleDHF$_d$RWK-NH$_2$, en la que el subrayado indica que la secuencia del péptido está ciclada en forma de una lactama por medio de las cadenas laterales de ácido aspártico y lisina. Los residuos a usar para la ciclación se protegieron en sus cadenas laterales como el grupo Aloc (para la lisina) y como el éster de alilo (para el aspartato). El péptido se construyó mediante el uso de la química de Fmoc como se describió anteriormente, en una resina Rink amida basada en poliestireno.

Primero se llevó a cabo la desprotección de alilo y de Aloc mediante el uso de Pd(PPh$_3$)$_4$, ácido acético y Bu$_3$SnH en ausencia de piperidina como aceptor de grupos alilo. Tras la escisión de los grupos protectores de las cadenas laterales, la resina se lavó y el péptido parcialmente protegido se cicló mediante el uso del método descrito por Felix *et al.*, Int. J. Peptide Protein Res. 32:441 (1988). El péptido se escindió después de la resina y se purificó para aislar la amida cíclica sustituida con N-alilo como el único péptido puro de la mezcla de productos.

La reacción de escisión de Aloc se modificó después mediante la adición de piperidina como aceptor de grupos alilo.

Cuando los grupos Aloc y alilo se escindieron se usó una mezcla que contenía 0,5 ml de ácido acético glacial, 10 ml de diclorometano, 0,0563 g de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), más 1,0 ml de piperidina como aceptor de grupos alilo. Cada pocillo del sintetizador de péptidos contenía 0,05 mmoles de péptido en resina Rink, y se trató con 0,3 ml/pocillo de hidruro de tributilestaño a temperatura ambiente durante 1 h con agitación en vórtex. La resina se lavó con: 2x2 ml/pocillo de diclorometano, 2x1 ml/pocillo de metanol, 2x1 ml/pocillo de diisopropiletil amina, y 3x1 ml/pocillo de NMP tras la escisión de los grupos protectores de las cadenas laterales. Las cadenas laterales del péptido se acoplaron después mediante el método de Felix anteriormente mencionado (15 h, mediante el uso de BOP y DIEA). El péptido se escindió y se purificó como se describió anteriormente para proporcionar un péptido puro con el valor de MH$^+$ deseado mediante ESMS de 1302. El producto secundario N-alilado se observó solamente en cantidades mínimas.

Ejemplo de referencia 10

Radiomarcado con ^{99m}Tc

Se reconstituyó un vial de Glucoscan (DuPont) con 2,18 mCi de NaTcO$_4$ en 1 ml de solución salina para formar el complejo ^{99m}Tc-gluceptato. Se preparó <GHWSYK(MaGC)LRPG amida (IMP3) como se describió anteriormente. Se preparó ^{99m}Tc-IMP3 mezclando 360 μl (874 μCi) de ^{99m}Tc-gluceptato con 640 μl de péptido en solución salina. El precipitado formado inicialmente desapareció tras calentar durante 15 min a 75ºC. Una tira de TLC instantánea (ITLC) desarrollada con mezcla H$_2$O:EtOH:NH$_4$OH (5:2:1) mostró un 6,2% de la actividad en el origen como coloide. La HPLC mostró un 100% de la actividad asociada al péptido con un TR de 6,95 min, mientras el péptido sin marcar eluyó a los 6,4 min en las mismas condiciones de HPLC (columna C-18 de fase inversa, gradiente de 0-100% de B en 10 min a un caudal de 3 ml/min, en el que A es un 0,1% de TFA en H$_2$O y B es un 90% de CH$_3$CN, 0,1% de TFA). La recuperación de la columna de HPLC fue del 85% de la actividad inyectada.

IMP3 se formuló y se liofilizó para el marcado con ^{99m}Tc en las cantidades mostradas a continuación:

IMP3 (µg)	Sn (µg)	αDG/Sn
1. 250	23	14
2. 100	23	14
3. 250	15	14

en la que αDG es α-D-glucoheptonato. Los viales liofilizados se reconstituyeron con ~900 μCi de NaTcO$_4$ en solución salina. Se observó turbidez en todos los viales. Los viales se calentaron durante 15 min a 75ºC, pero la turbidez persistió. El análisis mediante ITLC de los coloides mostró coloides del 14, 21 y 9% en el origen para los viales 1, 2 y 3, respectivamente.

Para evitar la precipitación durante el marcado con ^{99m}Tc, se variaron las proporciones de α-D-glucoheptonato (αDG) y tartrato respecto de Sn (II) en los viales liofilizados. Se formularon y se liofilizaron los siguientes viales (250 μg de IMP3 con 25 μg de Sn(II)) con las proporciones de tartrato y αDG mostradas más adelante. Los viales se reconstituyeron con ~500 μCi de NaTcO$_4$ en 1 ml de solución salina. Las observaciones se indican en la columna de observaciones. Las tiras de ITLC se desarrollaron después de 15 min a temperatura ambiente tras el calentamiento a 75ºC durante 15 min.

	tartrato/Sn	pH	Observaciones	coloide, TR de coloide, 75 °C
1.	50	5,3	ppt	
2.	100	5,3	ppt	
3.	500	5,3	ppt desaparece tras la mezcla	17% 2,4%

	αDG/Sn	pH	Observaciones	coloide, TR de coloide, 75 °C
4.	25	5,3	ppt	
5.	50	5,3	ppt	
6.	100	5,3	turbio	
7.	500	5,3	ligera turbidez	25% 3,5%
8.	1000	5,3	claro	3,3% 3,1%

Se repitió el protocolo anterior para los viales 3, 7 y 8 y se determinó que los coloides eran de un 5,3, 3,8 y 4,6%, respectivamente, después de calentar 15 min a 75ºC. Se observó un único máximo ancho en una columna de HPLC inversa a un TR de 7 min.

La solubilidad de los péptidos que son poco solubles en solución salina sola se incrementa mediante la adición de un agente solubilizante tal como etanol o 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

Los resultados de marcar otros péptidos de referencia con tecnecio-99 se muestran en la siguiente tabla:

(Tabla pasa a página siguiente)

Péptido	Tiempo de retención de HPLC [a]	Tiempo de retención de HPLC [b]
MaGCγAbuHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2	7,62 (99%)	7,65
MaGCγAbuVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2	7,8-9,7[c]	8,19[c] (99%)
<GHWSYK(MaGC)LRPG.amida	6,59 (95%)	6,90[c] (92%)
<GHYSLK(MaGC)WKPG.amida	ND	7,07 (100%)
<GHWSYK(Ma-azaGC)LRPG.amida	6,82 (100%)	7,02[c] (99%)
<GHYSLK(Ptsc-GC)WKPG amida	7,60 (100%)	7,67[d] (100%)
Ac$Nal_d$$Cpa_d$$W_dSRK_d$(MaGC)LR$PA_3$-$NH_2$	8,50 (27%) 9,00 (68%)	
<GHWSYK_d(MaGC)LRPG-NH_2	6,83 (95%)	7,07[c] (95%)
<GHYSYLK(PtscGDap)WKPG-NH_2	7,08 (96%)	6-8 (90%)
<GHYSLK(azaGGC)WKPG-NH_2	6,60 (100%)	6,47[c] (99%)
$Nal_d$$Cpa_d$$W_dSRK_d$(PtscGC)WKPG-$NH_2$	8,43 (97%)	

Las abreviaturas usadas en la tabla son las mismas que en el ejemplo 8 anterior. Un cambio en el tiempo de retención de HPLC del complejo formado mediante marcado a temperatura ambiente y el formado mediante calentamiento indica un cambio en la unión del metal.

[a] reacción a temperatura ambiente durante 15 min (tiempo de retención en minutos)

[b] tras calentar en agua hirviendo 15 min

[c] cambio significativo en la forma del máximo y la retención después del calentamiento

[d] sin cambio en la forma del máximo, y la diferencia del tiempo de retención no es significativa

[e] muchos máximos

En un método de marcado alternativo, se formularon disoluciones diluidas (30 μg/ml) del péptido en equipos de marcado antes de la adición de pertecnetato. La disolución final contuvo el péptido, un 10% de hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPCD), glucoheptonato 200 mM, tampón acetato 21 mM de pH 5,3, 2 mg de ácido ascórbico y 100 μg de cloruro estañoso en 1,5 ml de volumen total. En otras formulaciones se añadieron dos equivalentes de ión estañoso respecto del péptido en un tampón que contenía un 15% de HPCD, glucoheptonato 200 mM y tampón acetato 21 mM de pH 5,6.

Ejemplo de referencia 11

Radiomarcado de IMP-3 ^{188}Re

Se sintetizó IMP3, (<GHWSYK(MaGC)LRPG amida) como anteriormente. IMP3 tiene un tiempo de retención de 6,4 min en una columna C-18 de fase inversa mediante el uso de un gradiente de 0-100% de B en 10 min a un caudal de 3 ml/min en el que A es un 0,1% de TFA en H_2O y B es un 90% de CH_3CN, 0,1% de TFA.

IMP3 se formuló en cantidades de 1 mg y 250 μg con 450 μg de Sn(II) y α-D-glucoheptonato en una proporción de 1:17,5, y se liofilizó. Los viales liofilizados de IMP3 (1 mg y 250 μg) se reconstituyeron con 617 y 578 μCi de $NaReO_4$ en solución salina. Los viales se calentaron durante 15 min a 75ºC. El análisis mediante HPLC en las condiciones descritas anteriormente mostró máximos únicos a un TR de 7,0 min para ambos viales. El líquido de

salida se recogió y se contó en un contador γ. Para el vial de 1 mg, la recuperación de la actividad fue de un 88%, mientras que la recuperación fue de un 77% para el vial de 250 μg. Los análisis del coloide en una tira de ITLC desarrollada en H_2O:EtOH:NH_4OH (5:2:1) mostraron un 1,4 y un 1,2% de la actividad en el origen para los viales de 1 mg y de 250 μg, respectivamente.

El marcado con ^{188}Re a temperatura ambiente no se desarrolló tan bien como a 75ºC. A temperatura ambiente, solamente se incorporó un pequeño porcentaje de la actividad (<5%) al péptido, y el resto de la actividad eluyó en el volumen muerto (1,2 min).

Ejemplo de referencia 12

Ensayos de unión a receptor <u>in vitro</u>

Se usaron las líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, SK-BR-3 y MDA-MB-231 para ensayar los análogos de LHRH marcados con radiometal. Se usaron células HT29 para ensayar los análogos de VIP marcados. Todas las líneas celulares se adquirieron de la American Type Culture Collection, Rockville, MD. Las células se cultivaron en DMEM complementado con un 5% de suero bovino fetal, 5% de suero equino definido, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μg/ml) y L-glutamina (2 mM). Se realizó un pase rutinario de las células tras el desprendimiento con tripsina y un 0,2% de EDTA.

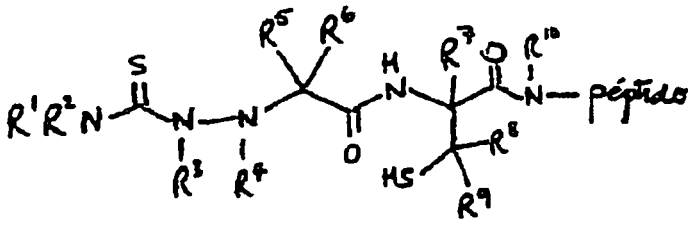
Se determina la especificidad de los péptidos análogos de LHRH sin marcar mediante ensayos de unión competitiva a células. Las células seleccionadas como objetivo se lavan con medio nuevo, y se ajustan a 5 x 10^5 células/ml. Se añaden 100 μl de la suspensión celular (100 μl) por pocillo a una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se deja que las células se fijen y después se tratan con concentraciones diferentes de los péptidos en presencia de ^{125}I-LHRH (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, 2.000 Ci/mmol). Después de una incubación de 2 h a temperatura ambiente con agitación, las células se lavan dos veces y se cuenta la radiactividad asociada a las células, y se compara la concentración de los péptidos que provoca un 50% de inhibición de la unión de la LH-RH marcada.

Para determinar las constantes de unión al receptor, se incuban diluciones en serie de LHRH radiomarcada con 5 x 10^5 células en una placa de 96 pocillos. Todos los ensayos se realizan por triplicado con y sin una concentración elevada de LHRH sin marcar para permitir la determinación del péptido unido de forma específica. Después de una incubación de 2 h a temperatura ambiente, las células se lavan y se cuentan. Se determina la constante de asociación en equilibrio, K_D, y el número total de sitios receptores por célula mediante el análisis de Scatchard.

Para ensayar los análogos de VIP y sus complejos metálicos se usa el protocolo descrito por Virgolini *et al.* (*Cancer Res.* 54:690 (1994)). Brevemente, se mezcla ^{125}I-VIP con concentraciones crecientes de péptido de ensayo en una disolución de tampón de unión, tras lo cual se añade cada disolución a células HT29 en una placa de cultivo de 48 pocillos. Cada concentración se ensaya por triplicado. Las células se incuban a 4ºC durante 2 h, seguido por tres lavados con tampón de unión helado. Las células se lisan después con NaOH 2 M durante 5 min y el líquido del pocillo se extrae con una torunda de algodón. La actividad de la torunda de algodón se cuenta mediante el uso de un contador γ.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende un resto de unión de radiometal, en el que dicho resto de unión comprende la estructura:



en la que R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, y un grupo protector que se puede eliminar en condiciones de síntesis peptídica, con tal de que al menos uno de R^1, R^2 o R^3 sea H,

R^5, R^7, R^8, R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, arilo y arilo sustituido, y R^4 y R^6 juntos forman un enlace directo, y R^8 y R^9 juntos o R^7 y R^9 juntos pueden formar un anillo cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, y

en la que NR^{10} está localizado en el extremo N-terminal de dicho péptido, o está localizado en una cadena lateral de aminoácido de dicho péptido.

2. Un péptido según la reivindicación 1, en el que R^1 es H.

3. Un péptido según la reivindicación 1, en el que R^3 es H.

4. Un péptido según la reivindicación 1, en el que R^5 es H.

5. Un péptido según la reivindicación 1, en el que NR^{10} está localizado en el extremo N-terminal de dicho péptido.

6. Un péptido según la reivindicación 1, en el que NR^{10} está localizado en una cadena lateral de aminoácido de dicho péptido.

7. Un péptido según la reivindicación 2, en el que R^2 es alquilo C_1-C_6 o fenilo sustituido o sin sustituir.

8. Un péptido según la reivindicación 2, en el que R^2 es H.

9. Un péptido según la reivindicación 8, en el que R^3 es H.

10. Un péptido según la reivindicación 9, en el que R^5 es H.

11. Un péptido según la reivindicación 10, en el que R^7, R^8 y R^9 son cada uno H.

12. Un péptido según la reivindicación 11, en el que R^2 es fenilo.

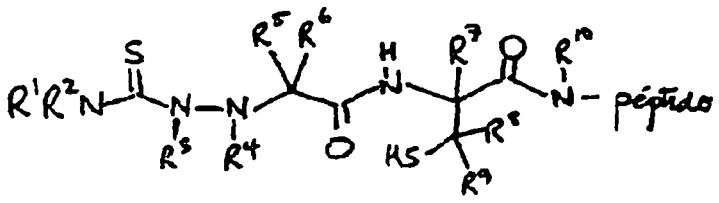
13. Un péptido según la reivindicación 11, en el que R^2 es metilo.

14. Un péptido según la reivindicación 1, en el que R^8 y R^9 son metilo.

15. Un péptido según la reivindicación 1, que comprende además un átomo de metal unido.

16. Un péptido según la reivindicación 15, en el que dicho átomo de metal se selecciona del grupo que consiste en ^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re.

17. Un método para preparar una composición quelante de metal, que comprende poner en contacto una disolución de un péptido que comprende un resto de unión de radiometal con iones estañosos, en el que dicho resto de unión de radiometal comprende la estructura:



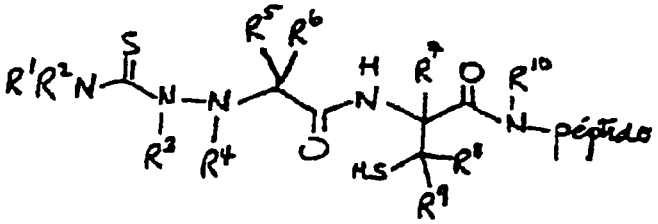
en la que R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, y un grupo protector que se puede eliminar en condiciones de síntesis peptídica, con tal de que al menos uno de R^1, R^2 o R^3 sea H. R^5, R^7, R^8, R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, arilo y arilo sustituido, y R^4 y R^6 juntos forman un enlace directo, y R^8 y R^9 juntos o R^7 y R^9 juntos pueden formar un anillo cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, y

en la que NR^{10} está localizado en el extremo N-terminal de dicho péptido, o está localizado en una cadena lateral de aminoácido de dicho péptido,

y después poner en contacto dicha disolución con un radionúclido y recuperar el péptido radiomarcado.

18. El método de la reivindicación 17, en el que dicho radionúclido se selecciona de ^{188}Re- o ^{186}Re-perrenato y ^{99m}Tc-pertecnetato.

19. El uso de un péptido radiomarcado preparado poniendo en contacto una disolución del péptido con iones estañosos en el que dicho péptido comprende un resto de unión de radiometal que comprende la estructura:



en la que R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, y un grupo protector que se puede eliminar en condiciones de síntesis peptídica, con tal de que al menos uno de R^1, R^2 o R^3 sea H,

R^5, R^7, R^8, R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, arilo y arilo sustituido, y R^4 y R^6 juntos forman un enlace directo, y R^8 y R^9 juntos o R^7 y R^9 juntos pueden formar un anillo cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, y

en la que NR^{10} está localizado en el extremo N-terminal de dicho péptido, o está localizado en una cadena lateral de aminoácido de dicho péptido

y después poner en contacto dicha disolución con un radionúclido y recuperar el péptido radiomarcado en la fabricación de una composición diagnóstica para la formación de imágenes de un tumor, una lesión infecciosa, un infarto de miocardio, un coágulo, una placa ateroesclerótica, que comprende administrar a un paciente humano dicho péptido radiomarcado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y, después de un tiempo suficiente para que se localice dicho péptido radiomarcado y para que se aclare la señal de fondo fuera del objetivo, el sitio o sitios de aumento de dicho péptido radiomarcado se detectan mediante una cámara externa de formación de imágenes.

20. Un péptido según la reivindicación 1, en el que dicho péptido se selecciona del grupo que consiste en:

(Chel)γAbuNleNHF$_d$RWK-NH$_2$

(Chel)γAbuHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH$_2$,

KPRRPYIDNYTRLRK(Chel)QMA VKKYLNSILN-NH$_2$,

(Chel)γAbuYTRLRKQMAVKKYLNSTLN-NH$_2$,

(Chel) γAbuYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH$_2$,

HSDAVFTKNYTRLRK(Chel)QMAVKKYLNSILN-NH$_2$

<GHWSYD(Chel)LRPG-NH$_2$, <GHYSLK(Chel)WKPG-NH$_2$.

AcNal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$(Chel)LRPA$_d$-NH$_2$,

(Chel)γAbuSYSNleDHF$_d$RWK-NH$_2$, (Chel)γAbuNleDHF$_d$RWK-NH$_2$,

(Chel)NleDHF$_d$RWK-NH$_2$,

Ac-HSDAVFTENYTKLRK(Chel)QNleAAKKYLNDLKKGGT-NH$_2$,

(Chel)γAbuHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH$_2$,

(Chel)γAbuVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH$_2$,

(Chel)γAbuNleDHF$_d$RWK-NH$_2^c$, <GHWSYK(Chel)LRPG-NH$_2$,

<GHYSLK(Chel)WKPG-NH$_2$, AcNal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$(Chel)LRPA$_d$-NH$_2$,

<GHYSYLK(Chel)WKPG-NH$_2$, <GHYSLK(Chel)WKPG-NH$_2$,

Nal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$(Chel)WKPG-NH$_2$, <GHWSYK$_d$(Chel)LRPG-NH$_2$,

AcNal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$(Chel)LRPA$_d$-NH$_2$,

AcNal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$(Chel)LRPA$_d$-NH$_2$,

AcNal$_d$Cpa$_d$W$_d$SRK$_d$(Chel)LRPA$_d$-NH$_2$, <GHWSYK(Chel)LRPG-NH$_2$,

AcK(Chel)F$_d$CFW$_d$KTCT-OH, ACK(Chel)DF$_d$CFW$_d$KTCT-OK,

AcK(Chel)F$_d$CFW$_d$KCTCT-ol, AcK(Chel)DF$_d$CFW$_d$KTCT-ol,

(Chel)DF$_d$CFW$_d$KTCT-OH, K(Chel)DF$_d$CFW$_d$KTCT-ol,

K(Chel)KKF$_d$CFW$_d$KTCT-ol, K(Chel)KDF$_d$CFW$_d$KTCT-OH,

K(Chel)DSF$_d$CFW$_d$KTCTmOH, K(Chel) DF$_d$CFW$_d$KTCT-OH,

K(Chel) DF$_d$CFW$_d$KTCD-NH$_2$, K(Chel) DF$_d$CFW$_d$KTCT-NH$_2$,

K (Chel)KDF$_d$CFW$_d$KTCT-NHNH$_2$, ACK(Chel)F$_d$CFW$_d$KTCT-NHNH$_2$,

K (Chel) F$_d$CFW$_d$KTCT-ol, y F$_d$CFW$_d$KTCTK (Chel)-NH$_2$,

en los que (Chel) es el resto de unión de radio-metal de la reivindicación 1.