

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 088**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2002 PCT/NO2002/00250**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2003 WO03006491**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2002 E 02753307 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 1404371**

54 Título: **Compuestos con base peptídica para localizar receptores de integrina**

30 Prioridad:

10.07.2001 GB 0116815
11.10.2001 NO 20014954

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2019

73 Titular/es:

GE HEALTHCARE LIMITED (100.0%)
Amersham Place, Little Chalfont
Buckinghamshire HP7 9NA, GB

72 Inventor/es:

CUTHBERTSON, ALAN;
INDREVOLL, BARD;
SOLBAKKEN, MAGNE;
ARCHER, COLIN, MILL;
ENGELL, TORGRIM y
WADSWORTH, HARRY, JOHN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 088 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos con base peptídica para localizar receptores de integrina

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos con base peptídica y su uso en técnicas de formación de imágenes diagnósticas. Más específicamente la invención se refiere al uso de dichos compuestos con base peptídica como vectores localizadores que se unen a los receptores asociados con la angiogénesis, en particular receptores de integrina, por ejemplo, el receptor de $\alpha v \beta 3$ integrina. Dichos agentes de contraste pueden usarse por consiguiente para el diagnóstico de por ejemplo enfermedades malignas, enfermedades cardíacas, endometriosis, enfermedades relacionadas con la inflamación, artritis reumatoide y sarcoma de Kaposi.

Antecedentes de la invención

Pueden formarse nuevos vasos sanguíneos mediante dos mecanismos diferentes: vasculogénesis o angiogénesis. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante ramificación de vasos existentes. El estímulo primario para este proceso puede ser el suministro inadecuado de nutrientes y oxígeno (hipoxia) a las células en un tejido. Las células pueden responder secretando factores angiogénicos, de los cuales hay muchos; un ejemplo, al que se hace referencia frecuentemente, es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Estos factores inician la secreción de enzimas proteolíticas que rompen las proteínas de la membrana basal, además de inhibidores que limitan la acción de estas enzimas potencialmente dañinas. El otro efecto destacado de los factores angiogénicos es provocar que las células endoteliales migren y se dividan. Las células endoteliales que están unidas a la membrana basal, que forma una lámina continua alrededor de los vasos sanguíneos en el lado contraluminal, no experimentan mitosis. El efecto combinado de la pérdida de unión y las señales de los receptores por factores angiogénicos va a provocar que las células endoteliales se muevan, se multipliquen y se reordenen ellas mismas, y finalmente sintetizen una membrana basal alrededor de los nuevos vasos.

La angiogénesis es importante en el crecimiento y remodelación de tejidos, incluyendo el curado de heridas y procesos inflamatorios. Los tumores deben iniciar la angiogénesis cuando alcanzan el tamaño de milímetro para mantener su velocidad de crecimiento. La angiogénesis está acompañada por cambios característicos en las células endoteliales y su medio. La superficie de estas células se remodela en preparación para la migración, y estructuras crípticas se exponen donde la membrana basal se degrada, además de la variedad de proteínas que están implicadas en la realización y control de la proteólisis. En el caso de tumores, la red resultante de vasos sanguíneos está normalmente desorganizada, con la formación de ángulos bruscos y además derivaciones arteriovenosas. La inhibición de la angiogénesis se considera también que es una estrategia prometedora para la terapia antitumoral. Las transformaciones que acompañan a la angiogénesis son también muy prometedoras para el diagnóstico, siendo un ejemplo obvio la enfermedad maligna, aunque el concepto también muestra una gran promesa en la inflamación y una variedad de enfermedades relacionadas con la inflamación, que incluyen aterosclerosis, siendo los macrófagos de lesiones ateroscleróticas tempranas fuentes potenciales de factores angiogénicos. Estos factores también están implicados en la re-vascularización de partes infartadas del miocardio, que se da si una estenosis se libera en un corto tiempo.

Ejemplos adicionales de condiciones indeseadas que están asociadas con la neovascularización o angiogénesis, el desarrollo o proliferación de nuevos vasos sanguíneos se muestran a continuación. Se hace referencia también a este respecto al documento WO 98/47541.

Las enfermedades e indicaciones asociadas con la angiogénesis son por ejemplo, diferentes formas de cáncer y metástasis, por ejemplo, cáncer de mama, piel, colorrectal, pancreático, de próstata, pulmón u ovario.

Otras enfermedades e indicaciones son inflamación (por ejemplo crónica), aterosclerosis, artritis reumatoide y gingivitis.

Enfermedades e indicaciones adicionales asociadas con la angiogénesis son malformaciones arteriovenosas, astrocitomas coriocarcinomas, glioblastomas, gliomas, hemangiomas (infantil, capilar), hepatomas, endometrio hiperplásico, miocardio isquémico, endometriosis, sarcoma de Kaposi, degeneración macular, melanoma, neuroblastomas, enfermedad de la arteria periférica oclusiva, osteoartritis, soriasis, retinopatía (diabética, proliferativa), escleroderma, seminomas y colitis ulcerosa.

La angiogénesis implica receptores que son únicos para las células endoteliales y tejidos circundantes. Estos marcadores incluyen receptores del factor de crecimiento tal como VEGF y la familia de receptores de la integrina. Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que una variedad de integrinas quizás la más importante la clase α_v , se expresan en la superficie apical de los vasos sanguíneos [Conforti, G., et al. (1992) Blood 80:37-446] y están disponibles para la localización mediante ligandos circulantes [Pasqualini, R., et al. (1997) Nature Biotechnology 15:542-546]. La $\alpha \beta 1$ es también una importante integrina en la promoción de montaje de la matriz de fibronectina y el inicio de la unión celular a la fibronectina. También juega un papel crucial en la migración celular [Bauer, J.S., (1992) J. Cell Biol. 116:477-487] además de invasión tumoral y metástasis [Gehlsen, K.R., (1988) J. Cell Biol. 106:925-930].

La integrina $\alpha v \beta 3$ es uno de los receptores que se conocen por estar asociados con la angiogénesis. Las células

endoteliales estimuladas parecen depender de este receptor para la supervivencia durante un periodo crítico del proceso angiogénico, ya que los antagonistas de la interacción receptor de integrina $\alpha\beta 3$ /ligando inducen la apoptosis e inhiben el crecimiento de los vasos sanguíneos.

5 Las integrinas son moléculas heterodiméricas en que las subunidades α y β penetran la bicapa lipídica de la membrana celular. La subunidad α tiene cuatro dominios de unión al Ca^{2+} en su cadena extracelular, y la subunidad β tiene un número de dominios ricos en cisteína extracelulares.

10 Muchos ligandos (por ejemplo fibronectina) implicados en la adhesión celular contienen la secuencia tripeptídica arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). La secuencia RGD parece actuar como un sitio de reconocimiento primario entre los ligandos que presentan esta secuencia y receptores en la superficie de las células. Se cree generalmente que las interacciones secundarias entre el ligando y el receptor mejoran la especificidad de la interacción. Estas interacciones secundarias tendrían lugar entre restos del ligando y el receptor que están inmediatamente adyacentes a la secuencia RGD o en sitios que están distantes de la secuencia RGD.

15 Los péptidos RGD se conocen por unirse a una variedad de receptores de integrina y tienen el potencial de regular un número de sucesos celulares de aplicación significativa en el entorno clínico. (Ruoslahti, J. Clin. Invest., 87: 1-5 (1991)). Quizás el efecto más ampliamente estudiado de los péptidos RGD y miméticos de los mismos se refiere a su uso como agentes anti-trombóticos donde se dirigen a la integrina de las plaquetas GPIIb/IIIa.

20 La inhibición de la angiogénesis en los tejidos mediante la administración del antagonista o $\alpha\beta 3$ o $\alpha\beta 5$ se ha descrito en por ejemplo los documentos WO 97/06791 y WO 95/25543 usando o anticuerpos o péptidos que contienen RGD. El documento EP 578083 describe una serie de péptidos que contienen RGD mono-cíclicos y el documento WO 90/14103 reivindica RGD-anticuerpos. Haubner et al. en el J. Nucl. Med. (1999); 40:1061-1071 describen una nueva clase de indicadores para localizar tumores basados en péptidos que contienen RGD monocíclico. Los estudios de biodistribución que usan la formación de imágenes auto-radiográficas de todo el cuerpo revelaron sin embargo que los péptidos marcados con ^{125}I tenían velocidades de aclaramiento en la sangre muy rápidas y predominantemente las rutas de excreción hepato-biliares que dan por resultado un alto fondo.

25 Los péptidos RGD cíclicos que contienen múltiples puentes se han descrito también en los documentos WO 98/54347 y WO 95/14714. Los péptidos derivados de ciclos de selección por afinidad in vivo (documento WO 97/10507) se han usado para una variedad de aplicaciones de localización. La secuencia CDCRGDCFC (RGD-4C), se ha usado para dirigir fármacos tales como doxirubicina (documento WO 98/10795), ácidos nucleicos y adenovirus a células (véanse los documentos WO 99/40214, WO 99/39734, WO 98/54347, WO 98/54346, US 5846782). Los péptidos que contienen múltiples residuos de cisteína sin embargo experimentan la desventaja de que pueden darse múltiples isómeros disulfuro. Un péptido con 4 residuos de cisteína tal como RGD-4C tiene la posibilidad de formar 3 diferentes formas plegadas de disulfuro. Los isómeros tendrán afinidad variable por el receptor de integrina ya que el farmacóforo RGD se fuerza en 3 conformaciones diferentes.

35 El documento WO01/77145A (PCT/NO01/00146) describe compuestos que contienen RGD usados como vectores localizadores que se unen a receptores asociados con la angiogénesis, en particular receptores de integrina. Los compuestos comprenden al menos dos puentes, donde un puente forma un enlace disulfuro y el segundo puente comprende un enlace tioéter (sulfuro).

40 Rajopadhye M et al, Bioorganic & Medical Chemistry letters, Oxford GB, vol. 7, núm. 8, 22 de abril de 1997, págs. 955-961, enseña péptidos que contienen RGD, por ejemplo, compuestos 1 y 2, que se unen a GPIIb/IIIa, un complejo $\alpha 2\beta 3$ de integrina encontrado en la plaqueta. Las secuencias peptídicas están basadas en DMP 757 (ciclo(D-Val-N-Me-Arg(R)-Gly(G)-Asp(D)-Mamb). Este documento no proporciona enseñanzas o sugerencias para formar algún puente en los péptidos.

45 Rajopadhye M et al, Bioorganic & Medical Chemistry letters, Oxford GB, vol. 6, núm. 15, 6 de agosto de 1996, págs. 1737-1740, describe péptidos que contienen RGD unidos a GPIIb/IIIa. Las secuencias peptídicas se basan en DMP 757 (ciclo(D-Val-N-Me-Arg(R)-Gly(G)-Asp(D)-Mamb) y su análogo. Este documento no proporciona enseñanzas o sugerencias para formar ningún puente en los péptidos.

50 El documento US 5 888 474 describe péptidos que contienen GD lineales o cíclicos que se unen a GPIIb/IIIa. Este documento solo describe un único puente y no proporciona enseñanzas o sugerencias para formar dos puentes. Las secuencias descritas contienen o un único puente tioéter (página 7, SEQ Núm. 1-7) o un puente disulfuro (página 8, SEQ núm. 8).

Pearson D A et al, Journal of Medicinal Chemistry, American Chemical Society, Washington EE.UU., vol. 39, núm. 7, 1996, págs. 1372-1383, describe péptidos que contienen GD cíclicos unidos a GPIIb/IIIa. D5 solo describe un único puente tioéter por medio de una S-alquilación de un residuo de cisteína con el grupo cloroacetilo N-terminal y no proporciona enseñanzas o sugerencias para formar dos puentes.

55 Harris T D et al, Bioorganic & Medical Chemistry letters, Oxford GB, vol. 6, núm. 15, 6 de agosto de 1996, págs. 1741-1746, describe péptidos que contienen RGD que unen a GPIIb/IIIa. Las secuencias peptídicas se basan en DMP757 (ciclo(D-Val-N-Me-Arg(R)-Gly(G)-Asp(D)-Mamb) y su análogo. Este documento no proporciona enseñanzas o

sugerencias para formar ningún puente en los péptidos.

Liu Shuang et al, Bioconjugate Chemistry, vol. 12, núm. 4, 6 de julio de 2001, págs. 624-629, describe una forma dimérica de péptidos que contienen RGD como un antagonista del receptor de vitronectina. Este documento no proporciona enseñanzas o sugerencias para formar ningún puente en los péptidos.

- 5 Sivolapenko G B et al, European Journal of Nuclear Medicine Germany, vol. 25, núm. 10, 1998, págs. 1383-1389, describe un decapeptido lineal con dos restos RGD (página 1387, columna derecha, párrafo 2) como un antagonista de receptor de vitronectina. Este documento no proporciona enseñanzas o sugerencias para formar ningún puente en los péptidos.

- 10 El documento WO 93/12819A describe composiciones de RGD marcadas con ión metálico basado en péptido y proteína para usar como compuestos farmacéuticos y métodos para marcar péptidos con radiometales, metales paramagnéticos y otros iones metálicos medialmente útiles. Se describe especialmente el marcado de proteínas que contienen monosulfuros o enlaces disulfuro además de anticuerpos frente a antígenos embrionarios específicos.

- 15 Uehara T et al, Nuclear Medicine and Biology, Elsevier Science Publisher, Nueva York, NY, EE.UU., vol. 26, núm. 8 describe análogos de somatostatina marcados con 99mTc adecuados para la formación de imágenes del receptor de tumores positivos de somatostatina. La integridad del enlace disulfuro en un análogo cíclico de somatostatina se estudió a bajas concentraciones de péptido durante las reacciones de formación de complejos con iones estannosos como agente reductor.

Ejemplos adicionales de compuestos con base peptídica que comprenden RGD se encuentran en PCT/NO01/00146 y PCT/NO01/00390, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia.

- 20 La eficiente localización y formación de imágenes de receptores de integrina asociados con la angiogénesis in vivo demanda por lo tanto un vector con base de RGD selectivo, de alta afinidad, que sea químicamente fuerte y estable. Además, la ruta de excreción es un factor importante cuando se diseñan agentes de formación de imágenes para reducir los problemas con el fondo. Estas condiciones rigurosas se cumplen por las estructuras bicíclicas descritas en la presente invención.

25 Descripción de la invención

Vista desde un aspecto la invención proporciona nuevos compuestos con base peptídica. Estos compuestos tienen afinidad por los receptores de integrina, por ejemplo, afinidad por la integrina $\alpha v \beta 3$.

- 30 Los compuestos comprenden al menos dos puentes, en donde un puente forma un enlace disulfuro y el segundo puente comprende un enlace tioéter (sulfuro) y en donde los puentes pliegan el resto péptido en una configuración "en nido".

Los compuestos de la actual invención tienen por consiguiente un máximo de un puente disulfuro por resto de molécula. Los compuestos definidos por la presente invención son sorprendentemente estables in vivo y bajo las condiciones empleadas durante el marcado, por ejemplo, durante el marcado con tecnecio.

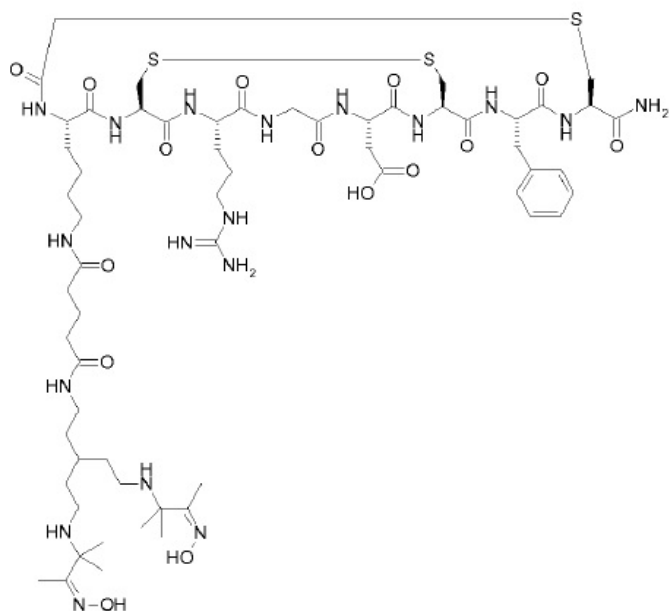
Estos nuevos compuestos pueden ser por propósitos de formación de imágenes.

- 35 El componente peptídico de los conjugados descritos en la presente memoria no tienen los extremos amino o carboxi libres. Esto introduce en estos compuestos un aumento significativo en la resistencia frente a la degradación enzimática y como resultado tienen una estabilidad in vivo aumentada en comparación con muchos péptidos libres conocidos.

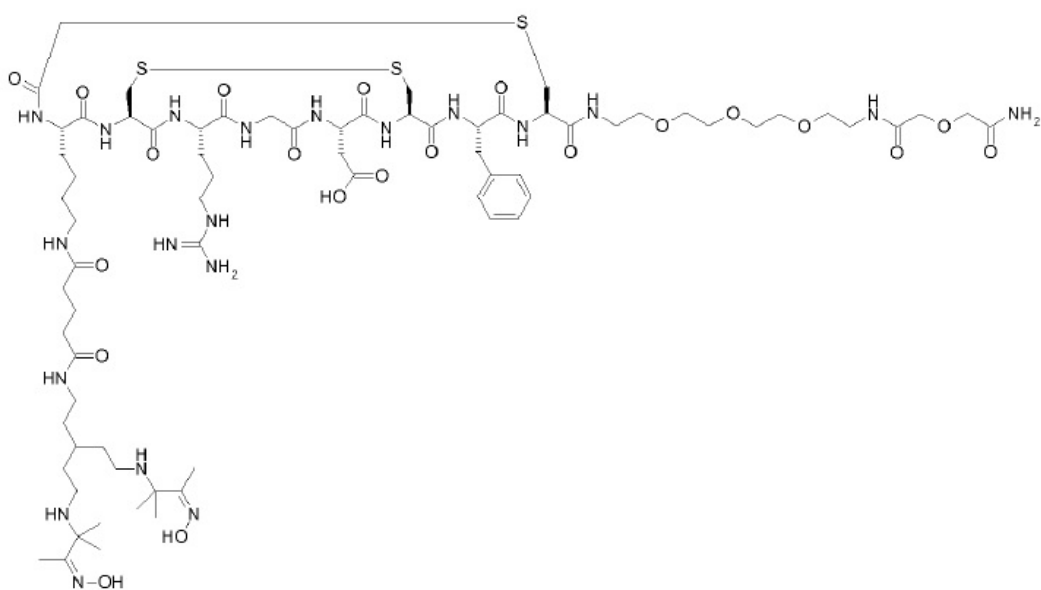
- 40 Como se usa en la presente memoria el término "aminoácido" se refiere en su sentido más amplio a L-aminoácidos proteogénicos, D-aminoácidos, aminoácidos químicamente modificados, miméticos de N-metilo, C α -metilo y aminoácidos de cadena lateral, y aminoácidos no naturales tal como naftilalanina. Se prefiere cualquier aminoácido que se da de forma natural o miméticos de dichos aminoácidos que se dan de forma natural.

La presente invención se ilustra por los compuestos I-IV posteriores:

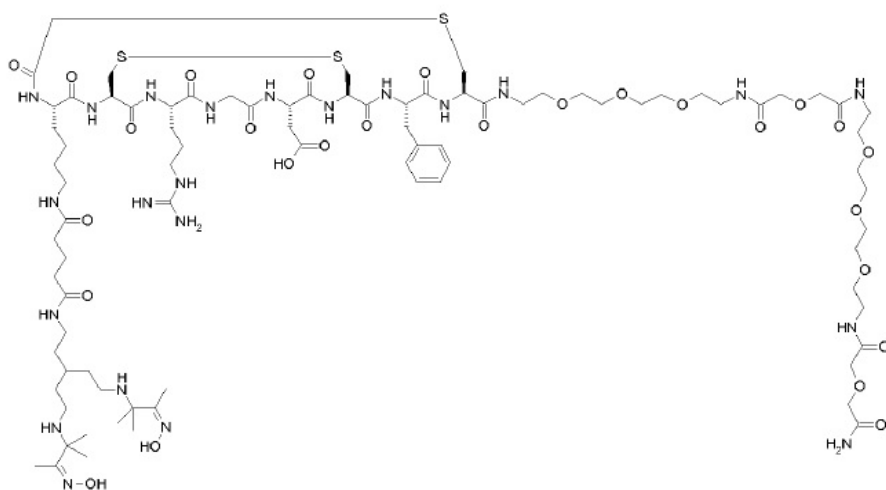
Compuesto I



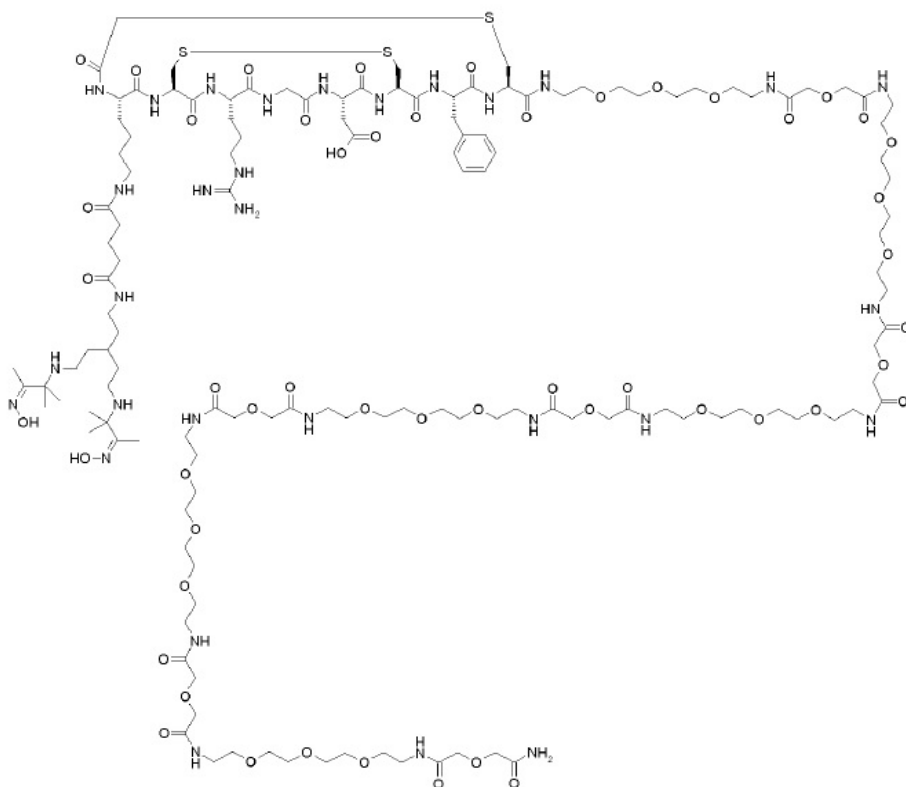
Compuesto II



Compuesto III



Compuesto IV



Los aminoácidos en el péptido están todos en la forma L. Sin embargo, en algunas realizaciones de la descripción uno, dos, tres o más de los aminoácidos en el péptido están preferiblemente en la forma D. La inclusión de dichos aminoácidos en forma D puede tener un efecto significativo en la estabilidad en suero del compuesto.

Según la presente descripción cualquiera de los residuos de aminoácido como se definen en la fórmula I pueden representar preferiblemente un aminoácido que se da de forma natural e independientemente en cualquiera de las conformaciones D o L.

Algunos de los compuestos de la invención son vectores con base de RGD de alta afinidad. Como se usa en la presente memoria el término "vector con base de RGD de alta afinidad" se refiere a compuestos que tienen una K_i de <10 nM y preferiblemente <5 nM, en un ensayo de unión competitiva para $\alpha v \beta 3$ integrina y donde el valor de K_i se determinó por competición con el conocido ligando de alta afinidad equistatina. Los métodos para realizar dichos ensayos de competición se conocen bien en la técnica.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva (por ejemplo una cantidad efectiva para mejorar el contraste de imagen en la formación de imágenes in vivo) de un compuesto o una sal del mismo, junto con uno o más adyuvantes, excipiente o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Los restos marcadores en los agentes de contraste de la invención pueden ser cualquier resto capaz de detección o bien directamente o indirectamente en un procedimiento de formación de imágenes diagnósticas in vivo. Preferiblemente el agente de contraste comprende un marcador. Se prefieren restos que emiten o puede provocarse que emitan radiación detectable (por ejemplo por desintegración radioactiva).

Para la formación de imágenes MR el marcador será o bien un isótopo de espín nuclear que no es cero (tal como ^{19}F) o un material que tiene espines electrónicos desapareados y por tanto propiedades paramagnéticas, superparamagnéticas, ferrimagnéticas o ferromagnéticas; para la formación de imágenes con luz el marcador será un dispersante de luz (por ejemplo una partícula coloreada o no coloreada), un absorbente de luz o un emisor de luz; para la formación de imágenes magnetométrica el marcador tendrá propiedades magnéticas detectables; para la formación de imágenes por impedancia eléctrica el marcador afectará a la impedancia eléctrica; y para la gammagrafía, SPECT, PET y similares, el marcador será un radionucleido.

Expresado generalmente, el marcador puede ser (1) un ión que contiene metal quelatable o metal poliatómico (es decir TcO , etc.), donde el metal es un metal de alto número atómico (por ejemplo, número atómico mayor que 37), una especie paramagnética (por ejemplo un metal de transición o lantánido), o un isótopo radioactivo, (2) una especie no metálica unida de forma covalente que es un sitio electrónico desapareado (por ejemplo un oxígeno o carbono en un radical libre persistente), un no metal de alto número atómico, o un radioisótopo, (3) un grupo poliatómico o cristal que contiene átomos de alto número atómico, que presentan un comportamiento magnético cooperativo (por ejemplo superparamagnetismo, ferrimagnetismo o ferromagnetismo) o que contiene radionucleidos.

Ejemplos de grupos marcadores preferidos particulares (Z_1) se describen en más detalle a continuación.

Los marcadores metálicos quelatados se eligen preferiblemente del grupo posterior; ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{47}Sc , ^{67}Ga , ^{51}Cr , $^{177\text{m}}\text{Sn}$, ^{67}Cu , ^{167}Tm , ^{97}Ru , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{199}Au , ^{203}Pb y ^{141}Ce .

Los iones metálicos están deseablemente quelados por grupos quelantes en el resto conector. Ejemplos adicionales de grupos quelantes adecuados se describen en los documentos US-A-4647447, WO89/00557, US-A-5367080, US-A-5364613.

Métodos para metalar cualquier agente quelante presentes están en el nivel de competencia de la técnica. Los metales pueden incorporarse en un resto quelante por cualquiera de los tres métodos generales: incorporación directa, síntesis de plantilla y/o transmetalación. Se prefiere la incorporación directa.

Por consiguiente es deseable que el ión metálico se compleje fácilmente con el agente quelante, por ejemplo, meramente exponiendo o mezclando una disolución acuosa del resto que contiene el agente quelante con una sal metálica en una disolución acuosa que tiene preferiblemente un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11. La sal puede ser cualquier sal, pero preferiblemente la sal es una sal soluble en agua del metal tal como una sal de halógeno, y más preferiblemente dichas sales se seleccionan de manera que no interfieran con la unión del ión metálico con el agente quelante.

El resto que contiene agente quelante está preferiblemente en disolución acuosa a un pH de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, más preferiblemente entre pH aproximadamente 6 a aproximadamente 8. El resto que contiene agente quelante puede mezclarse con sales de tampón tal como citrato, carbonato, acetato, fosfato y borato para producir el pH óptimo. Preferiblemente, las sales de tampón se seleccionan de manera que no interfieran con la unión posterior del ión metálico con el agente quelante.

Los siguientes isótopos o pares de isótopos pueden usarse tanto para la formación de imágenes como para la terapia sin tener que cambiar la metodología de radiomarcado o quelante: $^{47}\text{Sc}_{21}$; $^{141}\text{Ce}_{58}$; $^{188}\text{Re}_{75}$; $^{177}\text{Lu}_{71}$; $^{199}\text{Au}_{79}$; $^{47}\text{Sc}_{21}$;

$^{131}\text{I}_{53}$; $^{67}\text{Cu}_{29}$; $^{131}\text{I}_{53}$ y $^{123}\text{I}_{53}$; $^{188}\text{Re}_{75}$ y $^{99\text{m}}\text{Tc}_{43}$; $^{90}\text{Y}_{39}$ y $^{87}\text{Y}_{39}$; $^{47}\text{Sc}_{21}$ y $^{44}\text{Sc}_{21}$; $^{90}\text{Y}_{39}$ y $^{123}\text{I}_{53}$; $^{146}\text{Sm}_{62}$ y $^{153}\text{Sm}_{62}$; y $^{90}\text{Y}_{39}$ y $^{111}\text{In}_{49}$.

Los marcadores atómicos no metálicos preferidos incluyen radioisótopos tal como ^{123}I , ^{131}I y ^{18}F además de átomos de espín nuclear que no es cero tal como ^{19}F , y átomos pesados tal como I.

5 Los agentes diagnósticos pueden administrarse a pacientes para la formación de imágenes en cantidades suficiente para dar el contraste deseado con la técnica de formación de imágenes particular. Donde el marcador es un metal, generalmente dosis de 0,001 a 5,0 mmoles de ión metálico de formación de imágenes quelado por kilogramo de peso corporal de paciente son efectivas para alcanzar mejoras de contraste adecuadas. Donde el marcador es un radionucleido, las dosis de 0,01 a 100 mCi, preferiblemente 0,1 a 50 mCi serán normalmente suficientes por 70 kg de peso corporal.

La dosis de los compuestos de la invención para uso terapéutico dependerá de la condición a tratar, pero en general será del orden de 1 pmol/kg a 1 mmol/kg de peso corporal.

15 Los compuestos según la invención pueden formularse por lo tanto para la administración usando vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables de una manera completa en la competencia de la técnica. Por ejemplo, los compuestos, opcionalmente con la adición de excipientes farmacéuticamente aceptables, pueden suspenderse o disolverse en un medio acuoso, esterilizándose después la disolución o suspensión resultante.

Visto desde un aspecto adicional la invención proporciona el uso de un compuesto I-IV para la fabricación de un medio de contraste para usar en un método de diagnosis que implica la administración de dicho medio de contraste a un cuerpo humano o animal y la generación de una imagen de al menos parte de dicho cuerpo.

20 Visto desde un aspecto aún adicional la invención proporciona un método de generación de imágenes mejorado de un cuerpo humano o animal administrado previamente con una composición de agente de contraste que comprende un compuesto I-IV, cuyo método comprende generar una imagen de al menos parte de dicho cuerpo.

25 Visto desde un aspecto adicional la invención proporciona una composición para usar en un método de monitorización del efecto del tratamiento de un cuerpo humano o animal con un fármaco para combatir una condición asociada con cáncer, preferiblemente angiogénesis, por ejemplo un agente citotóxico, implicando dicho método administrar a dicho cuerpo un agente de Compuesto I-IV y detectar la absorción de dicho agente por receptores celulares, preferiblemente receptores de célula endotelial y en particular receptores $\alpha\beta_3$, efectuándose dicha administración y detección opcionalmente aunque preferiblemente de forma repetida, por ejemplo, antes, durante y después del tratamiento con dicho fármaco.

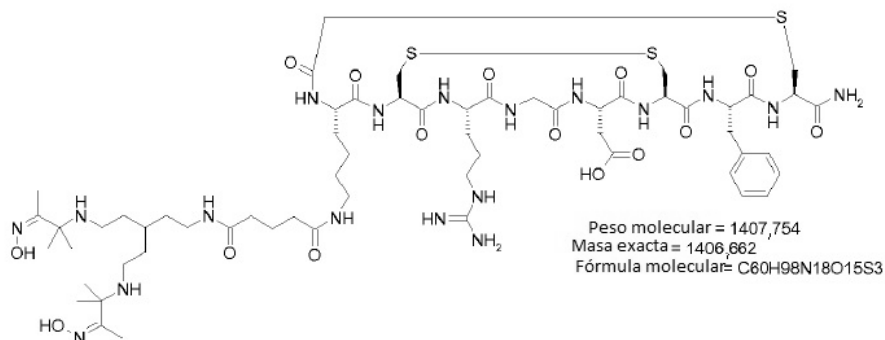
30 Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse usando todos los métodos conocidos de síntesis química aunque particularmente útil es la metodología en fase sólida de Merrifield que emplea un sintetizador peptídico automatizado (J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1964)). Los péptidos y quelatos peptídicos pueden purificarse usando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y caracterizarse por espectrometría de masas y HPLC analítico antes de probarse en el cribado in vitro.

35 La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1:

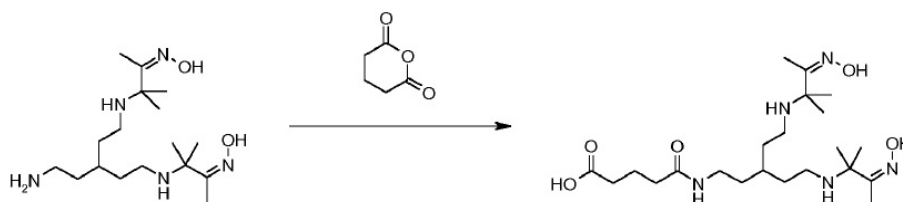
Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaril)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-NH₂



40 1a) Síntesis de quelato cPn216

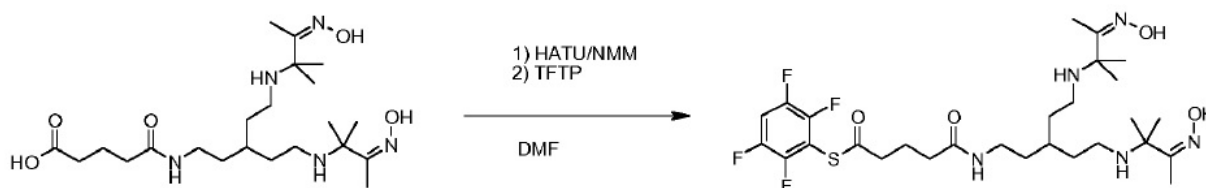
Para detalles de la síntesis del quelato de tecnecio cPn216 se remite al lector a la patente presentada GB0116815.2.

1b) Síntesis de intermedio de ácido cPn216-glutámico

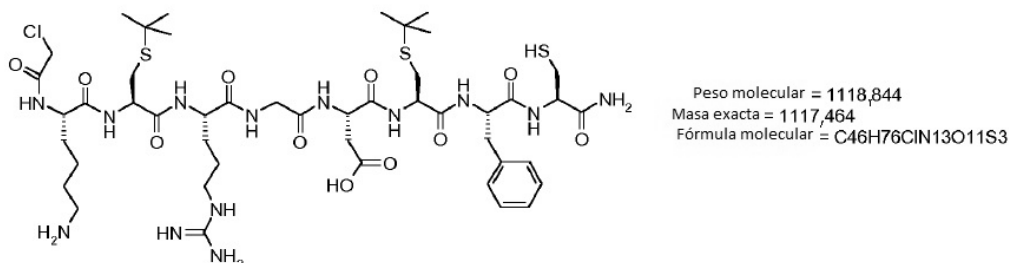


Se disolvió cPn216 (100 mg, 0,29 mmoles) en DMF (10 mL) y se añadió anhídrido glutámico (33 mg, 0,29 mmoles) en porciones con agitación. La reacción se agitó durante 23 horas para proporcionar la conversión completa al producto deseado. El ácido puro se obtuvo después de RP-HPLC en buen rendimiento.

1c) Síntesis de tetrafluorotiofenil-éster de ácido cPn216-glutámico



A ácido cPn216-glutámico (300 mg, 0,66 mmoles) en DMF (2 mL) se añadió HATU (249 mg, 0,66 mmoles) y NMM (132 μ L, 1,32 mmoles). La mezcla se agitó durante 5 minutos después se añadió tetrafluorotiofenol (0,66 mmoles, 119 mg). La disolución se agitó durante 10 minutos después la mezcla de reacción se diluyó con acetonitrilo al 20%/agua (8 mL) y el producto se purificó por RP-HPLC dando 110 mg del producto deseado después de secar por congelación.

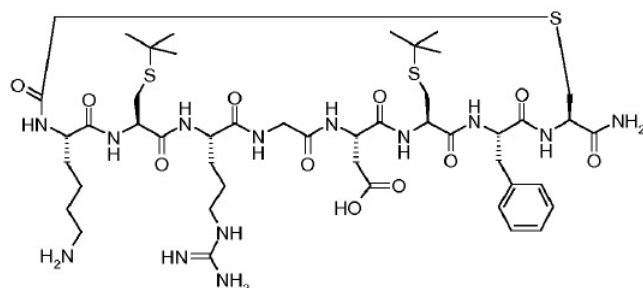
1d) Síntesis de ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-NH₂

El péptido se sintetizó en un sintetizador peptídico automático ABI 433A partiendo de resina Rink Amide AM en una escala de 0,25 mmoles usando cartuchos de 1 mmol de aminoácidos. Los aminoácidos se pre-activaron usando HBTU antes del acoplamiento. Los grupos amino N-terminales se cloroacetilaron usando una disolución de anhídrido cloroacético en DMF durante 30 min.

La eliminación simultánea de péptido y grupos protectores de cadena lateral (excepto tBu) de la resina se realizó en TFA que contiene TIS (5%), H₂O (5%) y fenol (2,5%) durante dos horas.

Después del tratamiento se obtuvieron 295 mg de péptido en bruto (HPLC analítico: gradiente, 5-50% de B durante 10 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención del producto, 6,42 min). La caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, M+H a 1118,5, encontrado, a 1118,6).

1e) Síntesis de tioéter ciclo [CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-NH₂

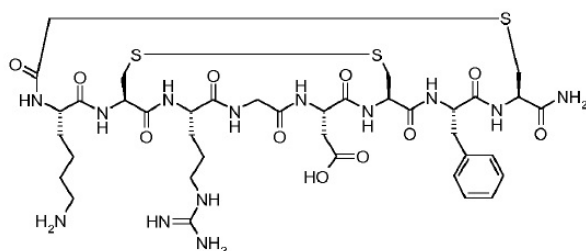


Peso molecular = 1082,383
Masa exacta = 1081,487
Fórmula molecular = C₄₆H₇₅N₁₃O₁₁S₃

Se disolvieron 295 mg de ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-NH₂ en agua/acetonitrilo. La mezcla se ajustó a pH 8 con disolución de amoníaco y se agitó durante 16 horas.

- 5 Después del tratamiento se obtuvieron 217 mg de péptido en bruto (HPLC analítico: gradiente, 5-50% de B durante 10 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención del producto, 6,18 min). La caracterización del producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, M+H a 1882,5, encontrado, a 1882,6).

1f) Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-NH₂

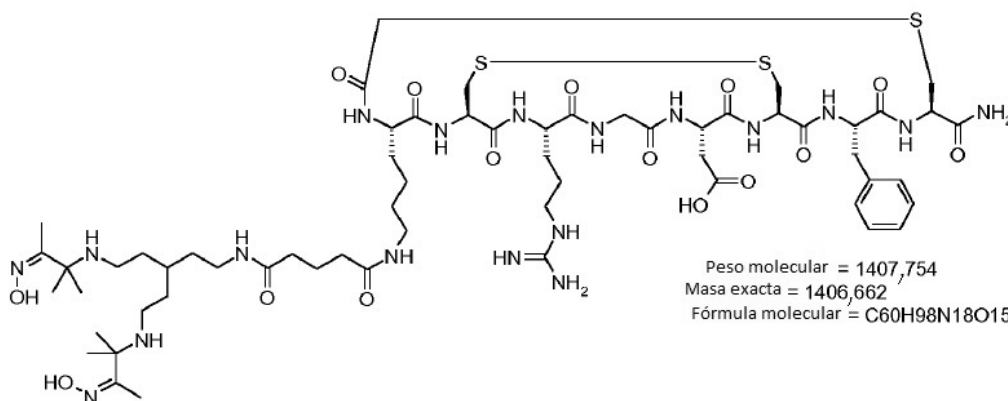


Peso molecular = 968,150
Masa exacta = 967,346
Fórmula molecular = C₃₈H₅₇N₁₃O₁₁S₃

- 10 217 mg de tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-NH₂ se trató con una disolución de anisol (500 μ L), DMSO (2 mL) y TFA (100 mL) durante 60 min después de lo cual el TFA se eliminó al vacío y el péptido precipitó por la adición de dietiléter.

- 15 La purificación por HPLC preparativo (columna Phenomenex Luna 10 μ C18 (2) 250 x 50 mm) del material en bruto (202 mg) se realizó usando 0-30% de B, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, durante 60 min a un caudal de 50 mL/min. Después de la liofilización se obtuvieron 112 mg de material puro (HPLC analítico: gradiente, 5-50% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min, detección, UV 214 nm; tiempo de retención del producto, 5,50 min). Se llevó a cabo la caracterización de producto adicional usando espectroscopia de masas: esperado, M+H a 968, encontrado a 971).

- 20 1g) Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaril)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-NH₂



Peso molecular = 1407,754
Masa exacta = 1406,662
Fórmula molecular = C₆₀H₉₈N₁₈O₁₅S₃

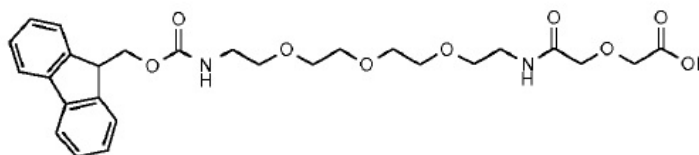
9,7 mg de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-NH₂, 9,1 mg de éster activo de quelato cPn216 y 6 μ L de N-metilmorfolina se disolvió en DMF (0,5 mL). La mezcla se agitó durante 3 horas.

La purificación por HPLC preparativo (columna Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21,20 mm) de la mezcla de reacción se realizó usando 0-30% de B, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, durante 40 min a un caudal de 10 mL/min. Después de la liofilización se obtuvieron 5,7 mg de material puro (HPLC analítico: gradiente, 0-30% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 7,32 min). La caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, M+H a 1407,7, encontrado, a 1407,6).

Ejemplo 2:

Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaril)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n = 1.

2a) Síntesis de ácido 17-(Fmoc-amino)-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico



Este bloque de construcción se acopla a la fase sólida usando química Fmoc. La forma acoplada de este bloque de construcción se denominará en resumen como (PEG)_n donde n es un número entero positivo.

1,11-Diazo-3,6,9-trioxaundecano

Una disolución de tetraetilenglicol seco (19,4 g, 0,100 moles) y cloruro de metanosulfonilo (25,2 g, 0,220 moles) en THF seco (100 ml) se mantuvo en argón y se enfrió a 0°C en un baño de hielo/agua. Al matraz se añadió una disolución de trietilamina (22,6 g, 0,220 moles) en THF seco (25 ml) en gotas durante 45 min. Después de 1 h el baño de enfriamiento se quitó y la agitación se continuó durante 4 h. Se añadió agua (60 ml). A la mezcla se añadió carbonato de hidrógeno y sodio (6 g, a pH 8) y azida sódica (14,3 g, 0,220 mmoles), en ese orden. THF se quitó por destilación y la disolución acuosa se puso a reflujo durante 24 h (dos capas formadas). La mezcla se enfrió y se añadió éter (100 ml). La fase acuosa se saturó con cloruro sódico. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con éter (4 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 50 ml) y se secaron (MgSO₄). La filtración y la concentración dieron 22,1 g (91%) de aceite amarillo. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

11-Azido-3,6,9-trioxaundecanamina

A una suspensión agitada mecánicamente, de forma vigorosa, de 1,11-diazido-3,6,9-trioxaundecano (20,8 g, 0,085 moles) en ácido clorhídrico al 5% (200 ml) se añadió una disolución de trifenilfosfina (19,9 g, 0,073 moles) en éter (150 ml) durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h adicionales. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 40 ml). La fase acuosa se enfrió en un baño de hielo/agua y el pH se ajustó a alrededor de 12 por la adición de KOH. El producto se extrajo en diclorometano (5 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄). La filtración y evaporación dieron 14,0 g (88%) de aceite amarillo. El análisis por espectroscopia de masas MALDI-TOF (matriz: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) dio un pico M+H a 219 como se esperaba. La caracterización adicional usando espectroscopia ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz) RMN verificó la estructura.

Ácido 17-azido-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico

A una disolución de 11-azido-3,6,9-trioxaundecanamina (10,9 g, 50,0 mmoles) en diclorometano (100 ml) se añadió anhídrido diglicólico (6,38 g, 55,0 mmoles). La mezcla de reacción se agitó toda la noche. El análisis de HPLC (columna Vydac 218TP54; disolventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 4-16% de B durante 20 min; flujo 1,0 ml/min; detección UV a 214 y 284 nm), mostró la conversión completa de material de partida a un producto con tiempo de retención 18,3 min. La disolución se concentró para dar rendimiento cuantitativo de un jarabe amarillo. El producto se analizó por LC-MS (ionización ES) dando [MH]⁺ a 335 como se esperaba. La espectroscopia de ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz) RMN estuvo de acuerdo con la estructura.

El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico

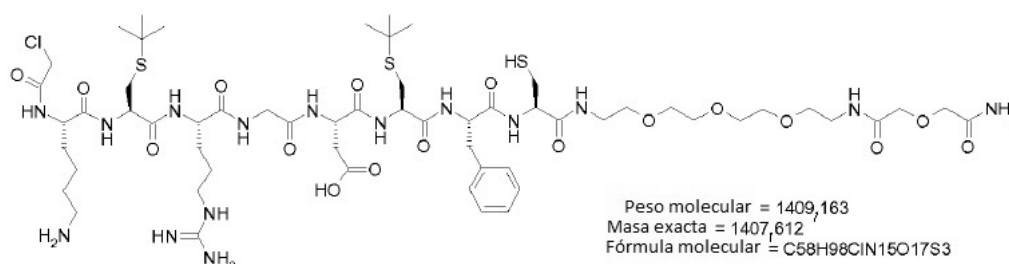
Una disolución de ácido 17-azido-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico (8,36 g, 25,0 mmoles) en agua (100 ml) se redujo usando H₂ (g) – Pd/C (10%). La reacción se realizó hasta que el análisis de LC-MS mostró la completa conversión del material de partida (columna Vydac 218TP54; disolventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 4-16% de B durante 20 min; flujo 1,0 ml/min; detección UV a 214 y 284 nm, ionización ES dando M+H a 335 para material de partida y 309 para el producto). La disolución se filtró y se usó directamente en la siguiente

etapa.

Ácido 17-(Fmoc-amino)-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico

A la disolución acuosa de ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de antes (correspondiente a 25,0 mmoles de aminoácido) se añadió bicarbonato sódico (5,04 g, 60,0 mmoles) en dioxano (40 ml). Una disolución de Fmoc-cloruro (7,11 g, 0,275 moles) en dioxano (40 ml) se añadió en gotas. La mezcla de reacción se agitó toda la noche. Se evaporó el dioxano (rotavapor) y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa se aciduló por adición de ácido clorhídrico y el material precipitado se extrajo en cloroformo. La fase orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró para dar 11,3 g (85%) de un jarabe amarillo. La estructura se confirmó por análisis de LC-MS (columna Vydac 218TP54; disolventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente 40-60% de B durante 20 min; flujo 1,0 ml/min; detección UV a 214 y 254 nm; ionización ES que da M+H a 531 como se esperaba para el pico de producto a 5,8 minutos). El análisis mostró un contenido muy bajo de productos secundarios y el material se usó sin purificación adicional.

2b) Síntesis de $\text{ClCH}_2\text{CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)}_n\text{-NH}_2$ donde $n = 1$

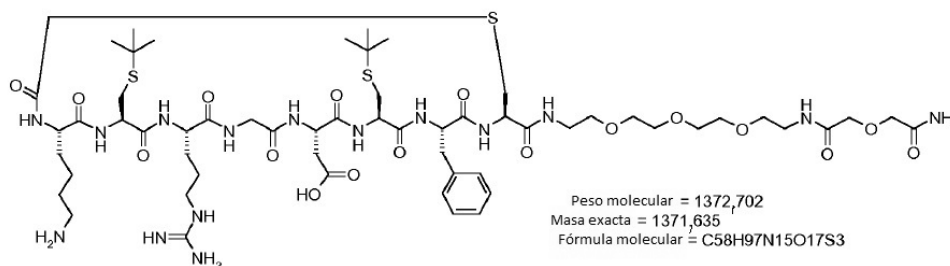


La unidad PEG se acopló manualmente a la resina Rink Amide AM, empezando en una escala de 0,25 mmoles, mediado por activación HATU. El péptido restante se montó en un sintetizador peptídico automático ABI 433A usando cartuchos de 1 mmol de aminoácidos. Los aminoácidos se pre-activaron usando HBTU antes del acoplamiento. Los grupos amino N-terminales se cloroacetilaron usando una disolución de anhídrido cloroacético en DMF durante 30 min.

La eliminación simultánea de péptido y grupos protectores de cadena lateral (excepto tBu) de la resina se realizó en TFA que contenía TIS (5%), H_2O (5%) y fenol (2,5%) durante dos horas.

Después del tratamiento se obtuvieron 322 mg de péptido en bruto (HPLC analítico: gradiente, 5-50% de B durante 10 min donde A = H_2O /TFA al 0,1% y B = CH_3CN /TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención del producto, 6,37 min). La caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, M+H a 1409, encontrado, a 1415).

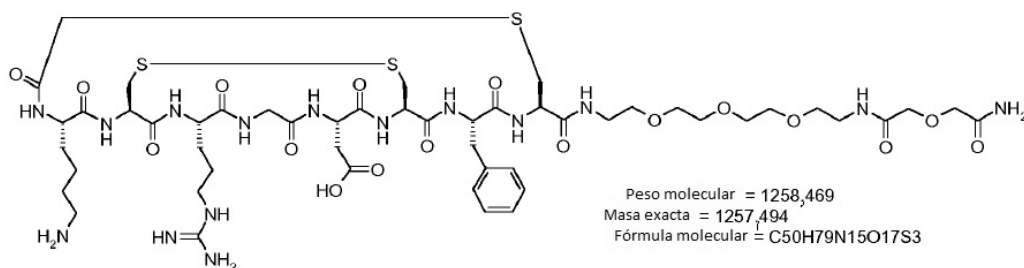
2c) Síntesis de tioéter ciclo[$\text{CH}_2\text{CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys}-(\text{PEG})_n\text{-NH}_2$] donde $n = 1$



Se disolvieron 322 mg de $\text{ClCH}_2\text{CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)}_n\text{-NH}_2$ en agua/acetonitrilo. La mezcla se ajustó a pH 8 con disolución de amoníaco y se agitó durante 16 horas.

Después del tratamiento se obtuvo péptido en bruto (HPLC analítico: gradiente, 5-50% de B durante 10 min donde A = H_2O /TFA al 0,1% y B = CH_3CN /TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 6,22 min). La caracterización del producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, M+H a 1373, encontrado, a 1378).

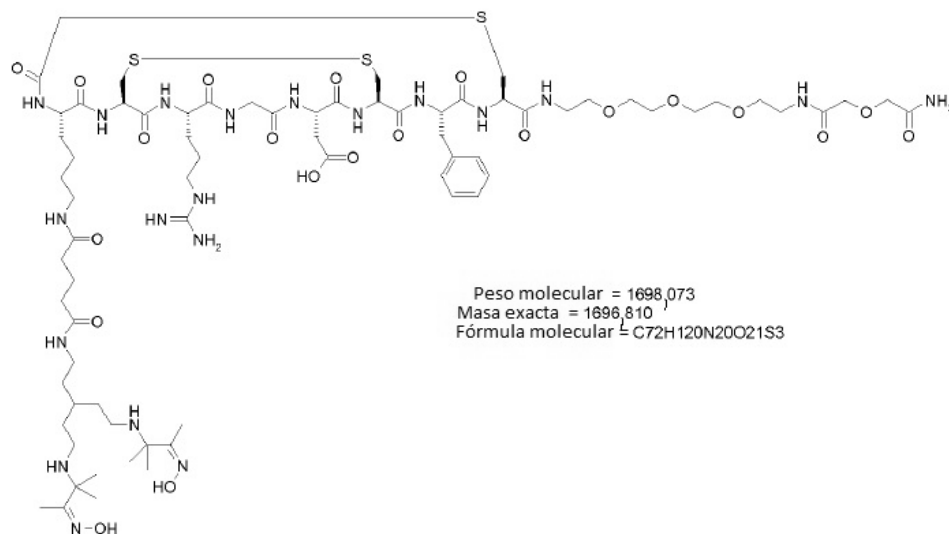
2d) Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[$\text{CH}_2\text{CO-Lys-Cys}^2\text{-Arg-Gly-Asp-Cys}^6\text{-Phe-Cys}-(\text{PEG})_n\text{-NH}_2$] donde $n = 1$



Se trató tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ con una disolución de anisól (200 µL), DMSO (2 mL) y TFA (100 mL) durante 60 min después de lo cual se eliminó el TFA al vacío y el péptido precipitó mediante la adición de dietiléter.

- 5 La purificación por HPLC preparativo (columna Phenomenex Luna 5 µ C18 (2) 250 x 21,20 mm) de 70 mg de material en bruto se realizó usando 0-30% de B, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, durante 40 min a un caudal de 10 mL/min. Después de la liofilización se obtuvieron 46 mg de material puro (HPLC analítico: gradiente, 0-30% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 6,80 min). La
- 10 caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, M+H a 1258,5, encontrado, a 1258,8).

2e) Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaril)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n = 1



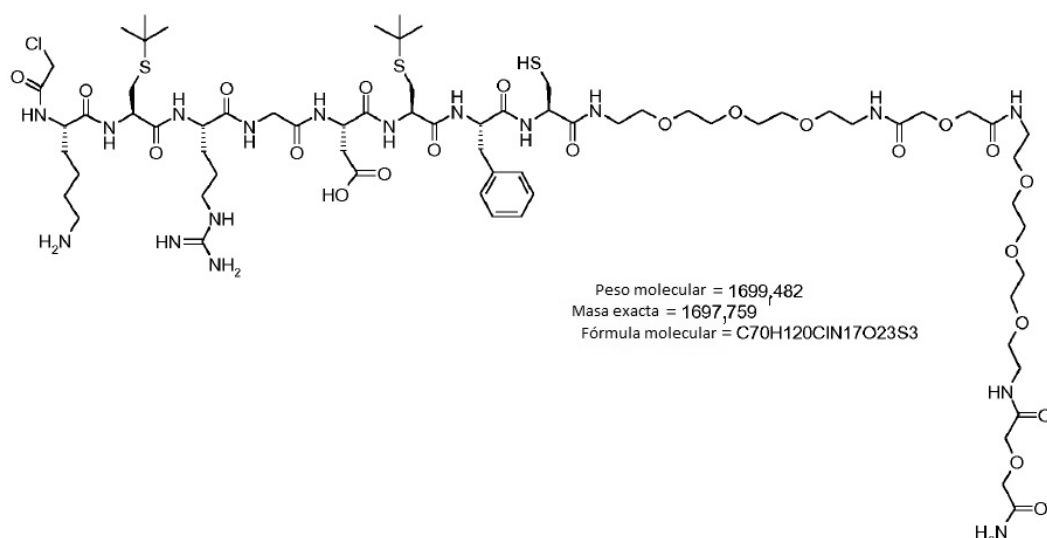
- 15 13 mg de [Cys²⁻⁶] ciclo[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂, 9,6 mg de éster activo de quelato cPn216 y 8 µL de N-metilmorfolina se disolvieron en DMF (0,5 mL). La mezcla se agitó durante 2 horas y 30 minutos.

- La purificación por HPLC preparativo (columna Phenomenex Luna 5 µ C18 (2) 250 x 21,20 mm) de la mezcla de reacción se realizó usando 0-30% de B, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, durante 40 min a un caudal de 10 mL/min. Después de la liofilización se obtuvieron 14,2 mg de material puro (HPLC analítico: gradiente, 0-30% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, columna, Phenomenex Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 7,87 min). La
- 20 caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, M+H a 1697,8, encontrado, a 1697,9).

Ejemplo 3:

- 25 Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaril)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n = 2.

3a) Síntesis de ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂ donde n = 2

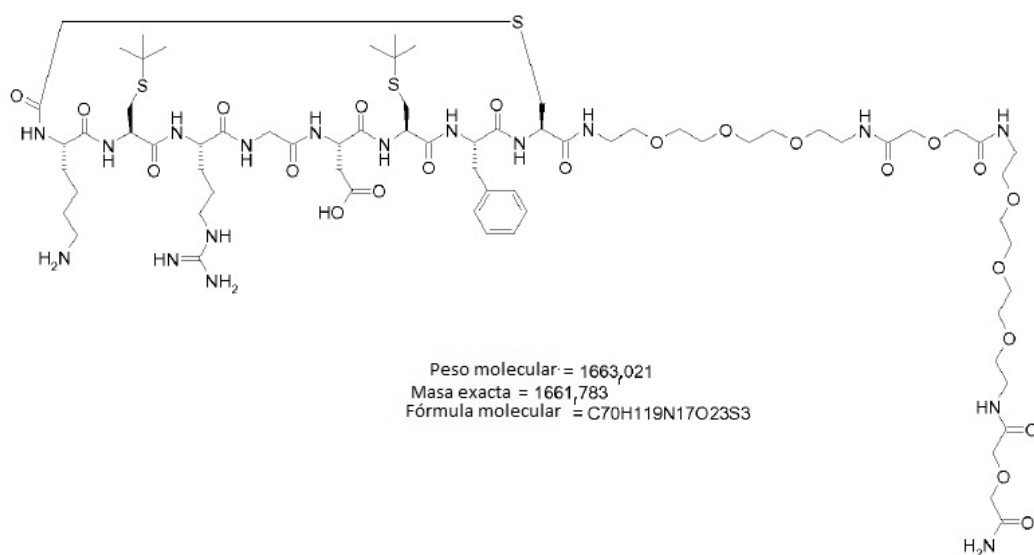


Montaje de péptido como para el ejemplo 2b), ambas unidades PEG acopladas manualmente.

Después del tratamiento se obtuvo péptido en bruto (HPLC analítico: gradiente, 5-50% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 6,40 min).

5

3b) Síntesis de tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n = 2

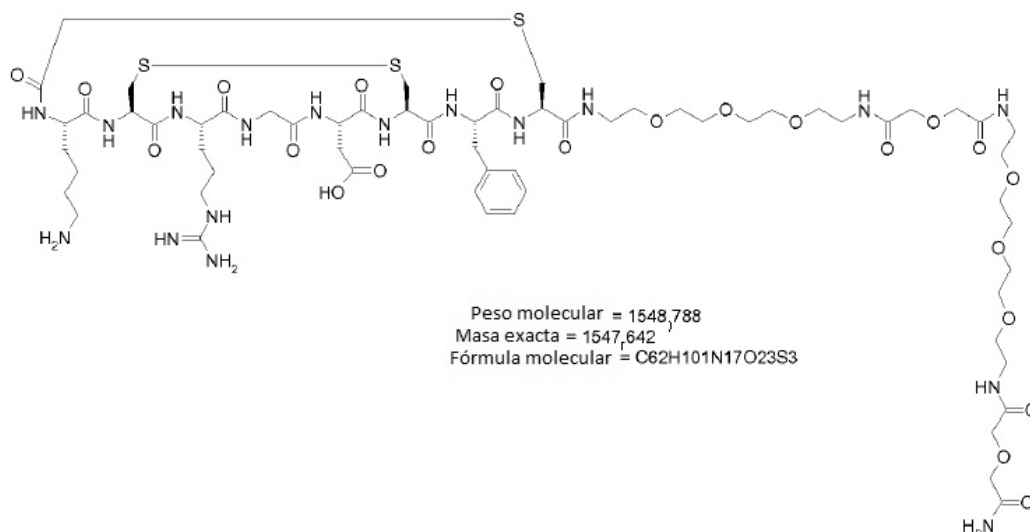


ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂ donde n = 2 se disolvió en agua/acetonitrilo. La mezcla se ajustó a pH 8 con disolución de amoníaco y se agitó durante 16 horas.

10

Después del tratamiento se obtuvieron 380 mg de péptido en bruto (HPLC analítico: gradiente, 5-50% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención del producto, 6,28 min). La caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, M+H a 1663, encontrado, a 1670).

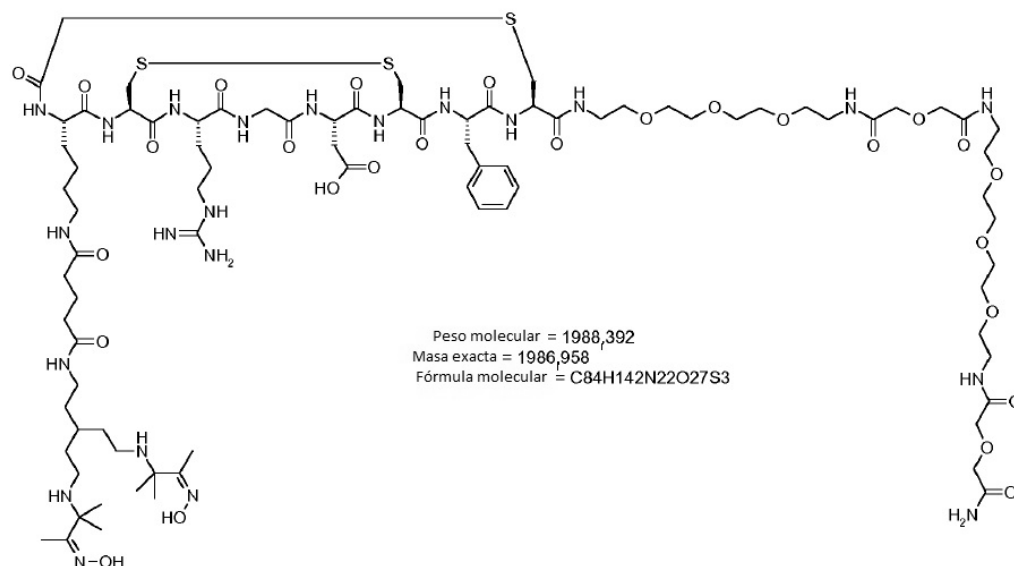
3c) Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n = 2.



380 mg de tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n=2 se trató con una disolución de anisol (500 µL), DMSO (2 mL) y TFA (100 mL) durante 60 min después de lo cual el TFA se eliminó al vacío y el péptido precipitó por la adición de dietiléter.

- 5 La purificación por HPLC preparativo (columna Phenomenex Luna 10 µ C18 (2) 250 x 50 mm) del material en bruto (345 mg) se realizó usando 0-30% de B, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, durante 60 min a un caudal de 50 mL/min. Después de la liofilización se obtuvieron 146 mg de material puro (HPLC analítica: gradiente, 0-30% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención del producto, 7,42 min). La
- 10 caracterización del producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, M+H a 1548,6, encontrado, a 1548,8).

3d) Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaril)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n = 2.



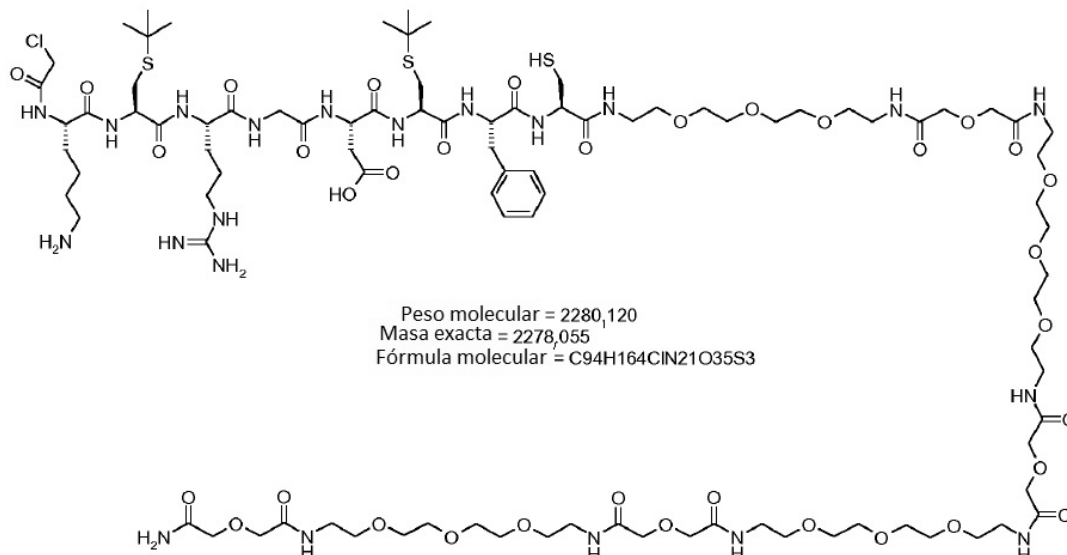
- 15 146 mg de [Cys²⁻⁶] ciclo[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)₂-NH₂, 110 mg de éster activo de quelato cPn216 y 76 µL de N-metilmorfolina se disolvió en DMF (6 mL). La mezcla se agitó durante 9 horas.

- La purificación por HPLC preparativo (columna Phenomenex Luna 10 µ C18 (2) 250 x 50 mm) de la mezcla de reacción se realizó usando 0-30% de B, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, durante 60 min a un caudal de 50 mL/min. Después de la liofilización se obtuvieron 164 mg de material puro (HPLC analítico: gradiente, 0-30% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 8,13 min). La caracterización del
- 20 producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, M+H a 1988,0, encontrado, a 1988,0).

Ejemplo 4:

Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaril)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n= 4.

4a) Síntesis de ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂ donde n= 4

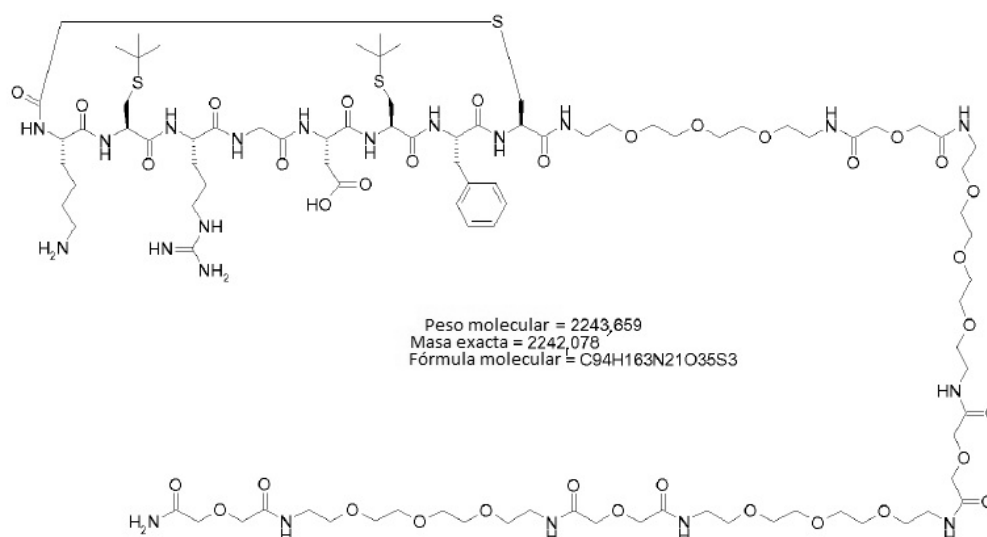


5

Montaje peptídico como para el ejemplo 2b), las cuatro unidades PEG acopladas manualmente.

Después del tratamiento se obtuvo el péptido en bruto (HPLC analítico: gradiente, 5-50% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención del producto, 6,50 min).

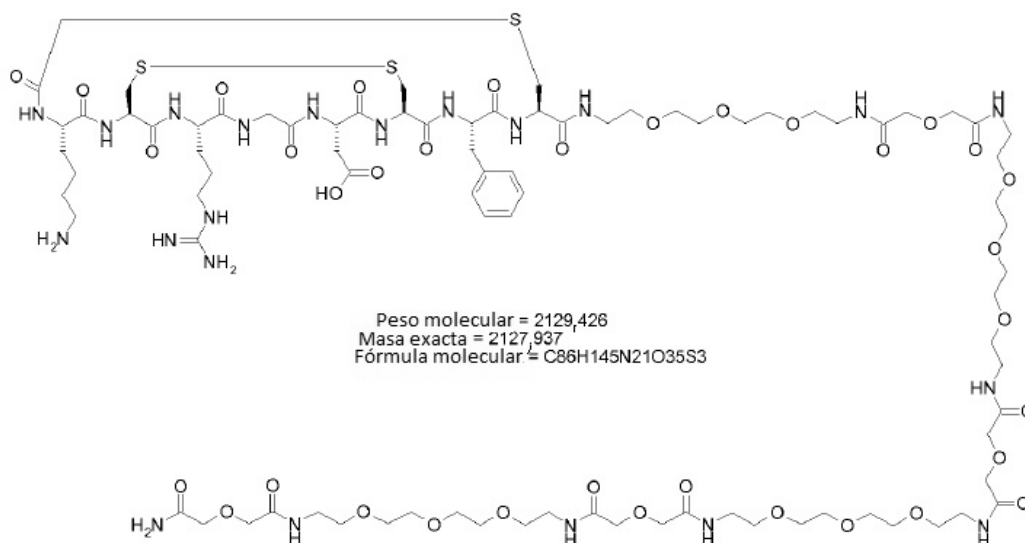
10 4b) Síntesis de tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n=4



Se disolvió ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)₄-NH₂ en agua/acetonitrilo. La mezcla se ajustó a pH 8 con disolución de amoníaco y se agitó durante 16 horas

15 Después del tratamiento se obtuvo péptido en bruto (HPLC analítico: gradiente, 5-50% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 6,37 min). La caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado [(M+2H)/2] a 1122,0, encontrado, a 1122,5).

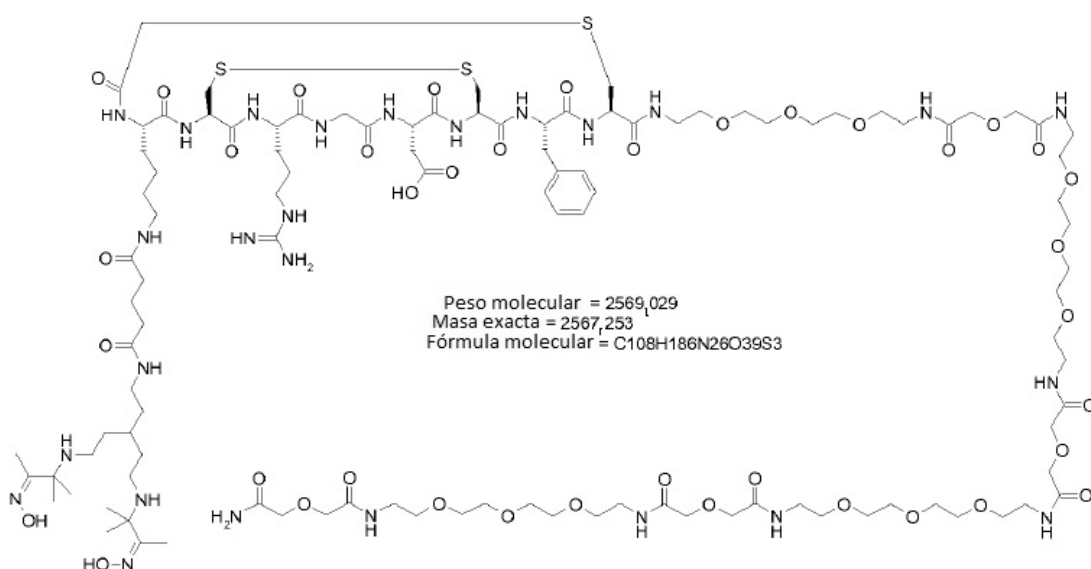
4c) Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n=4



Se trató tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)₄-NH₂ con una disolución de anisól (100 µL), DMSO (1 mL) y TFA (50 mL) durante 60 min después de lo cual el TFA se eliminó al vacío y el péptido precipitó por la adición de dietiléter.

La purificación por HPLC preparativo (columna Phenomenex Luna 5 µ C18 (2) 250 x 21,20 mm) del material en bruto (345 mg) se realizó usando 5-50% de B, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, durante 40 min a un caudal de 10 mL/min. Después de la liofilización se obtuvieron 12 mg de material puro (HPLC analítico: gradiente, 5-50% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención del producto, 4,87 min).

4d) Síntesis de disulfuro [Cys²⁻⁶]tioéter ciclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaril)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ donde n=4



12 mg de disulfuro [Cys²⁻⁶] tioéter ciclo[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)₄-NH₂, 5,2 mg de éster activo de quelato cPn216 y 2 µL de N-metilmorfolina se disolvieron en DMF (0,5 mL). La mezcla se agitó durante 7 horas.

La purificación por HPLC preparativo (columna Phenomenex Luna 5 µ C18 (2) 250 x 21,20 mm) de la mezcla de reacción se realizó usando 5-50% de B, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, durante 40 min a un caudal de 10 mL/min. Después de la liofilización 8 mg de material puro se obtuvieron (HPLC analítico: gradiente, 5-

50% de B durante 10 min donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 mL/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 5,17 min). La caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas: esperado, [(M+2H)/2] a 1284,6, encontrado a 1284,9).

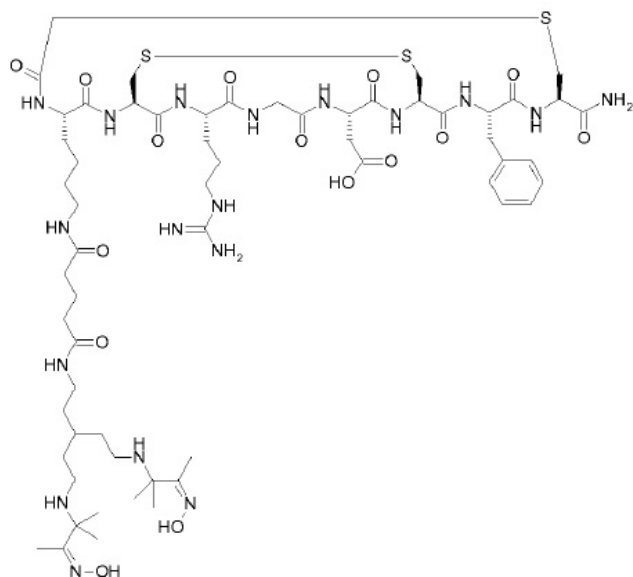
Lista de secuencias

<110> Amersham Health AS
 5 <120> Compuesto con base peptídica
 <130> NO 20014954
 <150> NO20014954
 10 <151> 11-10-2001
 <160> 1
 <170> PatentIn versión 3.1
 15 <210> 1
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Péptido sintético
 <220>
 30 <221> DISULFURO
 <222> (2)...(5)
 <223> puente disulfuro entre el residuo de aminoácido 2 y 5
 35 <220>
 <221> TIOETER
 40 <222> (1)...(8)
 <223> Puente tioéter entre el residuo de aminoácido 1 y 8
 <400> 1
 45
 Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
 1 5

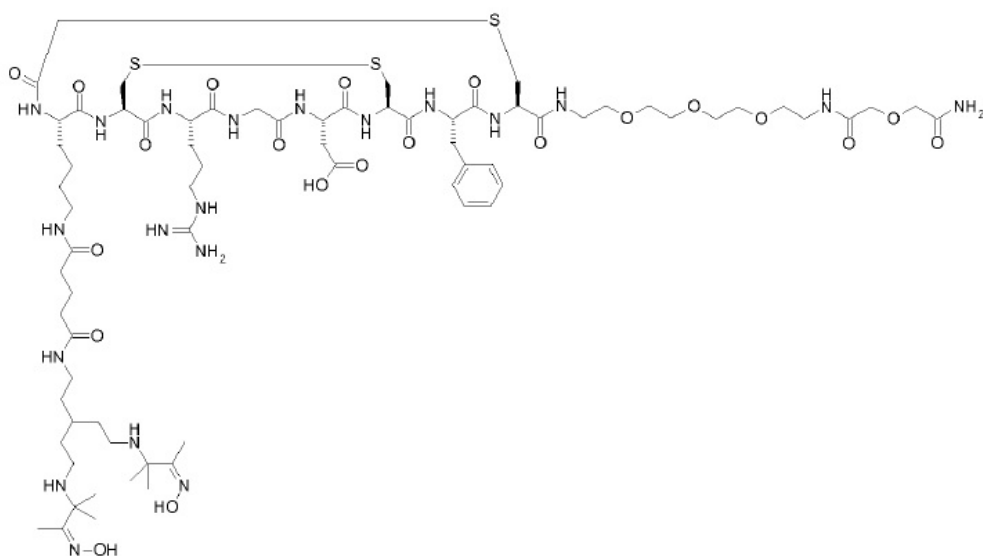
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto como se define por las siguientes fórmulas:

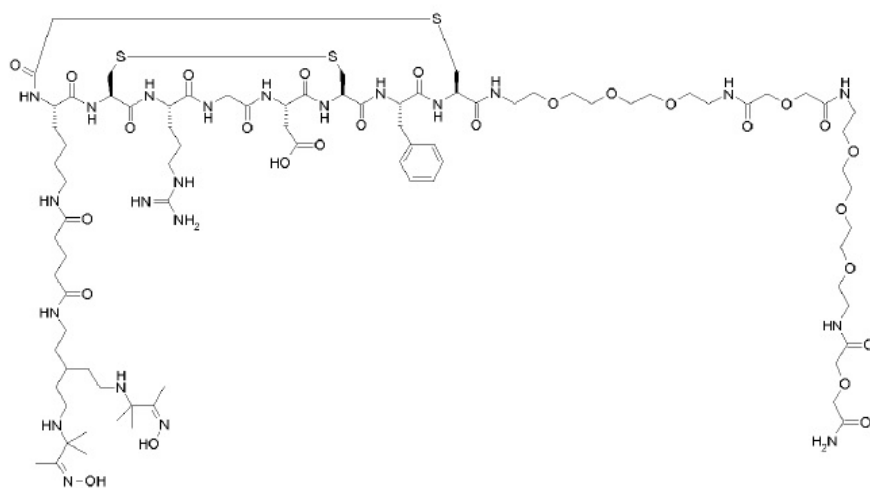
Compuesto I



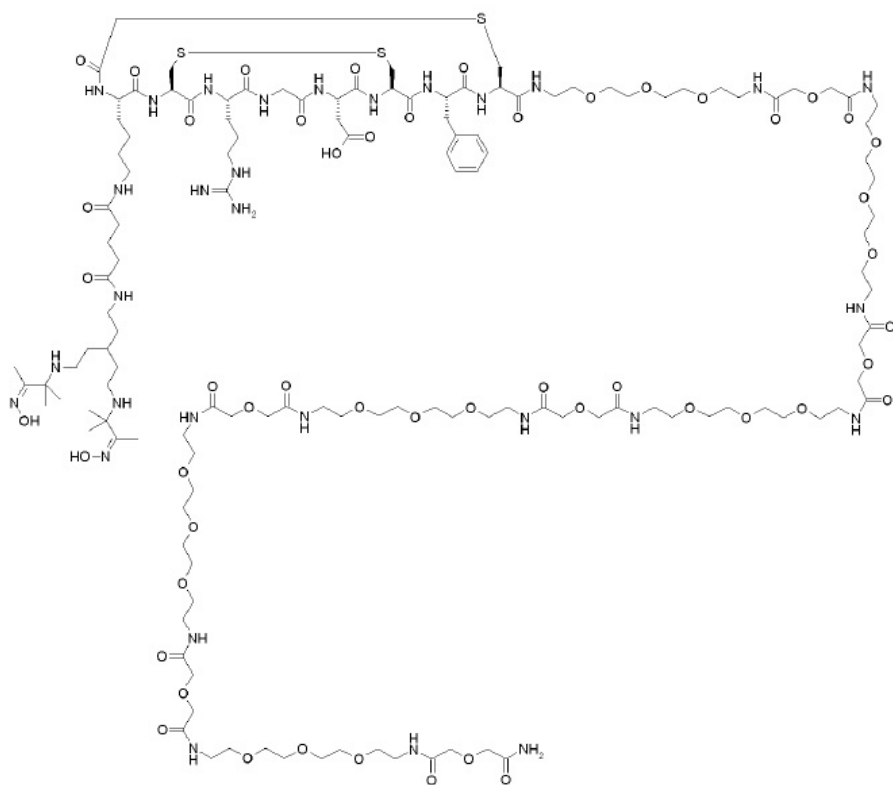
Compuesto II



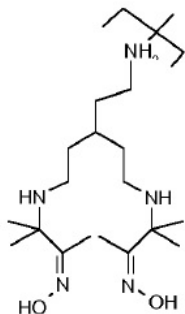
Compuesto III



Compuesto IV



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos en donde un agente quelante se representa por:



como se muestra en cada uno de los compuestos I a IV.

2. Un compuesto según la reivindicación 1 en donde el agente quelante está quelado con un metal marcador elegido de: un metal radionucleido; un ión metálico paramagnético; un ión metálico fluorescente; un ión metálico pesado o un ión asociado.
3. Un compuesto según la reivindicación 2 en donde el metal marcador comprende ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{47}Sc , ^{67}Ga , ^{51}Cr , $^{177\text{m}}\text{Sn}$, ^{67}Cu , ^{167}Tm , ^{97}Ru , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{199}Au , ^{203}Pb , ^{141}Ce .
4. Un compuesto según la reivindicación 3, donde el metal marcador es $^{99\text{m}}\text{Tc}$.
5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, o una sal de la misma, junto con uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
6. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la preparación de un medio de contraste, en donde dicho medio de contraste comprende el metal marcador quelado según la reivindicación 3.
7. Un método de generación de imágenes de un cuerpo humano o animal administrado previamente con un agente de contraste, implicando dicho método la generación de una imagen de al menos una parte de dicho cuerpo al que dicho agente de contraste se ha distribuido, caracterizado por que dicho agente de contraste comprende el compuesto como se define según la reivindicación 1 o 2 quelado con un metal marcador como se define según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
8. Un método de generación de imágenes mejorado de un cuerpo humano o animal administrado previamente con una composición de agente de contraste según la reivindicación 6, cuyo método comprende generar una imagen de al menos parte de dicho cuerpo.
9. Una composición según la reivindicación 6 para usar en un método de monitorización del efecto del tratamiento de un cuerpo humano o animal con un fármaco para combatir una condición asociada con cáncer, habiendo sido administrado previamente dicho cuerpo con la composición según la reivindicación 6, que implica dicho uso la detección de absorción de dicha composición por los receptores celulares.