



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 309 361**

(51) Int. Cl.:
A61K 51/08 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03772392 .1**

(96) Fecha de presentación : **24.10.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1553986**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2005**

(54) Título: **Conjugados de complejos de Tc y restos de direccionamiento y su uso en diagnóstico por RMN.**

(30) Prioridad: **25.10.2002 GB 0224799**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

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

(72) Inventor/es: **Brauers, Georg;**
Farrar, Gillian;
Barnett, David Jonathan;
Wadsworth, Harry John y
Lewis, Joanne Sarah

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 309 361 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

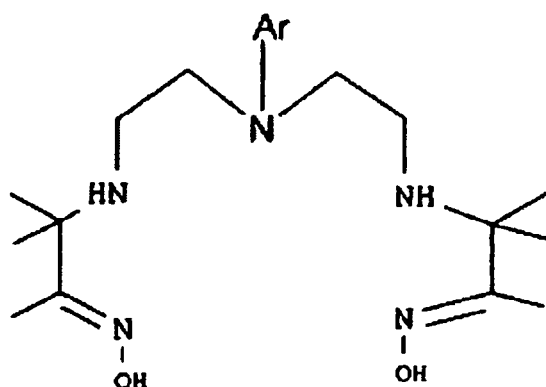
Conjugados de complejos de Tc y restos de direccionamiento y su uso en diagnóstico por RMN.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de composiciones de complejo de radiometal ^{99m}Tc , junto con kits para su uso en el procedimiento.

10 **Antecedentes de la invención**

El documento US 5395608 da a conocer una gama de ligandos de aza-diaminadioxima potencialmente pentadentados para la preparación de complejos radiometálicos de una amplia gama de radioisótopos, incluyendo ^{99m}Tc , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{57}Co , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{97}Ru , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{67}Ga y ^{68}Ga . Se dan a conocer ligandos de aza-diaminadioxima bifuncionales con grupos separadores de arilo colgantes, y el ejemplo 3 del documento US 5395608 describe el compuesto de fórmula A:

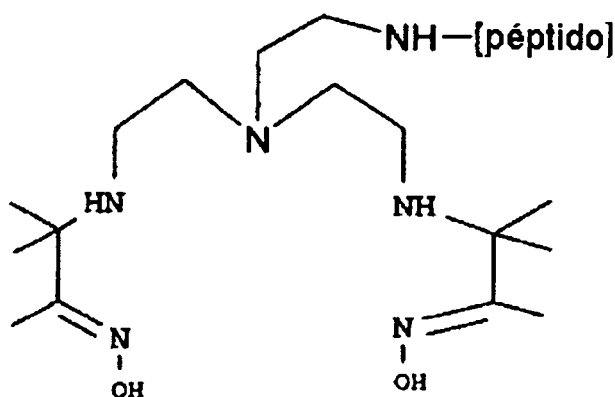


Fórmula A

en la que Ar = 4-aminobencilo. El documento US 5395608 describe el radiomarcado de tales quelantes en términos amplios, pero no proporciona ningún ejemplo específico sobre el marcado con el radiometal ^{99m}Tc .

40 Pillai *et al* [J. Nucl. Med. Biol., 38, 527-31(1994)] describen el marcado con ^{99m}Tc de un análogo de aza-diaminadioxima de fórmula A, en la que Ar es bencilo. El marcado con ^{99m}Tc se lleva a cabo a temperatura ambiente, y los perfiles de HPLC muestran solamente una única especie de ^{99m}Tc . No se describen conjugados de la aza-diaminadioxima con moléculas de direccionamiento.

45 El documento WO99/60018 da a conocer conjugados de quelato de ligandos de aza-diaminadioxima con péptidos para la formación de imágenes de trombos. Los péptidos son sustratos para la enzima transglutaminasa (es decir, factor XIIIa). Se dice que un conjugado de quelante de este tipo preferido es una aza-diaminadioxima de fórmula:



en la que el péptido es un fragmento de α_2 -antiplasmina o caseína.

El documento WO 02/070018 da a conocer complejos de tecnecio de quelantes de aza-diaminadioxima, en los que el quelante está conjugado con un péptido, y el uso de tales complejos en aplicaciones de formación de imágenes. Los ejemplos 7 y 9 muestran que se forma un complejo de ^{99m}Tc transitorio durante el radiomarcado, que se convierte en un complejo de ^{99m}Tc estable en pocas horas. El ejemplo 9 informa del radiomarcado del conjugado quelante-péptido a temperaturas hasta 75°C.

El documento WO01/77145 da a conocer composiciones que comprenden complejos de tecnecio de quelantes de aza-diaminadioxima conjugados con péptidos, y su uso en aplicaciones de formación de imágenes. Los complejos pueden obtenerse calentando la mezcla de reacción a temperaturas hasta 75°C.

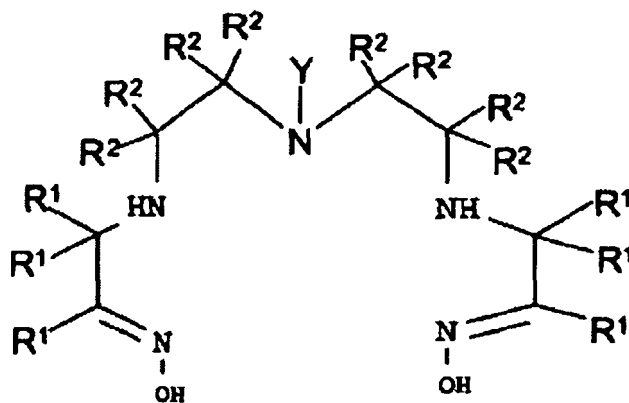
La presente invención

Se sabe que la química de formación de complejos del metal tecnecio de tales conjugados de quelantes de la molécula de direccionamiento aza-diaminadioxima puede dar lugar a una multiplicidad de especies de tecnecio. La presente invención proporciona un procedimiento mejorado de preparación de tales composiciones de complejo metálico de tecnecio de conjugado de aza-diaminadioxima en las que se suprimen las especies de tecnecio menos deseables.

Por tanto, los conjugados de quelante de aza-diaminadioxima forman varias especies de tecnecio con la quelación con ^xTc (en el que $x = 94\text{m}, 99$ o 99m). Estas especies de complejo del metal ^xTc múltiples pueden separarse y detectarse mediante cromatografía. Algunas de las especies de tecnecio múltiples son productos cinéticos, es decir, especies transitorias que se convierten a lo largo de un periodo de tiempo (opcionalmente con calentamiento) para proporcionar un producto estable. La tasa de conversión desde los complejos cinéticamente favorecidos (transitorios) hasta la especie final depende del pH: se requieren 2-3 horas a pH 9,5, mientras que 60 minutos son normalmente suficientes a pH 10,5. La reacción puede acelerarse mediante calentamiento. Se ha descubierto que algunas de estas especies de complejo de ^xTc múltiples son lipófilas, y pueden afectar de manera adversa a la biodistribución del producto radiofarmacéutico. La presente invención proporciona un procedimiento preparativo mediante el cual el nivel de estas especies cinéticas y lipófilas se minimiza y controla, mejorando así las características globales de formación de imágenes. La presente invención proporciona también metodología para optimizar la conversión en el producto estable deseado, de modo que puede prepararse una composición de producto de complejo de ^xTc controlada y puede controlarse la calidad de una manera más rápida y reproducible.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de una composición de complejo de tecnecio que comprende un complejo metálico del radioisótopo ^xTc con un ligando de fórmula (I):



(I)

en la que:

cada R¹ y R² es independientemente un grupo R;

x es 94m, 99 o 99m;

Y es -(A)_n-Z

en el que:

Z es un resto de direccionamiento biológico de peso molecular inferior a 5.000;

ES 2 309 361 T3

5 $-(A)_n$ es un grupo conector en el que cada A es independientemente $-\text{CO}-$, $-\text{CR}_2-$, $-\text{CR}=\text{CR}-$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{CR}_2\text{CO}_2-$, $-\text{CO}_2\text{CR}_2-$, $-\text{NRNRCO}-$, $-\text{CONR}-$, $-\text{NR}(\text{C}=\text{O})\text{NR}-$, $-\text{NR}(\text{C}=\text{S})\text{NR}-$, $-\text{SO}_2\text{NR}-$, $-\text{NRSO}_2-$, $-\text{CR}_2\text{OCR}_2-$, $-\text{CR}_2\text{SCR}_2-$, $-\text{CR}_2\text{NRCR}_2-$, un grupo cicloheteroalquileo C_{4-8} , un grupo cicloalquileo C_{4-8} , un grupo arileno C_{5-12} , o un grupo heteroarileno C_{3-12} o un resto de polialquilenglicol, poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico); n es un número entero de valor 0 a 10;

10 cada grupo R es independientemente H o alquilo C_{1-10} , alquilarilo C_{3-10} , alcoxialquilo C_{2-10} , hidroxialquilo C_{1-10} , fluoroalquilo C_{1-10} , o 2 o más grupos R, junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo carbocíclico, heterocíclico, saturado o insaturado;

15 en el que

- 15 (i) menos del 10% del ^xTc presente en la composición de complejo de tecnecio comprende complejos de ^xTc transitorios del ligando de fórmula I; y
- (ii) menos del 5% del ^xTc presente en la composición de complejo de tecnecio comprende complejos de ^xTc lipófilos del ligando de fórmula I;

20 en el que dicho procedimiento comprende la reacción del ligando de fórmula (I) con el radioisótopo ^xTc en un disolvente adecuado, con calentamiento a un intervalo de temperatura de 50°C a 80°C durante 10 minutos a 20 minutos en presencia de:

- 25 (a) un agente reductor;
- (b) un ácido orgánico débil que tiene un pKa en el intervalo de 3 a 7, o una sal del mismo con un catión biocompatible;
- 30 (c) un radioprotector.

Los radioisótopos ^xTc adecuados de la presente invención son por tanto el emisor de positrones $^{94\text{m}}\text{Tc}$, el emisor beta ^{99}Tc o el emisor γ $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Preferiblemente, x es 99m, es decir, el radioisótopo es preferiblemente $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

35 El término “ligando” significa el conjugado del quelante de aza-diaminadioxima con la molécula (Z) de direccionamiento biológico. El ligando está diseñado para formar complejos metálicos de aza-diaminadioxima del radioisótopo ^xTc conjugado con la molécula de direccionamiento biológico.

40 La expresión “resto de direccionamiento biológico” significa: péptidos o análogos de péptido de 3-100 meros que pueden ser péptidos lineales o péptidos cíclicos o combinaciones de los mismos; o inhibidores o sustratos enzimáticos; compuestos sintéticos de unión al receptor; oligonucleótidos, o fragmentos de oligo-ADN u oligo-ARN. El resto de direccionamiento biológico puede ser de origen natural o sintético, pero preferiblemente es sintético. Los restos de direccionamiento biológico de la presente invención tienen un peso molecular inferior a 5.000 Daltons, preferiblemente en el intervalo de 200 a 3000 Daltons, lo más preferiblemente en el intervalo de 300 a 2000 Daltons, prefiriéndose especialmente de 400 a 1500.

La expresión “péptido cíclico” significa una secuencia de 5 a 15 aminoácidos en la que los dos aminoácidos terminales están unidos entre sí mediante un enlace covalente que puede ser un enlace disulfuro o peptídico o un enlace no peptídico sintético tal como un enlace tioéter, fosfodiéster, disiloxano o uretano.

55 El término “aminoácido” significa un L- o D-aminoácido, análogo de aminoácido o compuesto mimético de aminoácido que puede producirse en la naturaleza o ser de origen puramente sintético, y puede ser ópticamente puro, es decir, un único enantiómero y por tanto quiral, o una mezcla de enantiómeros. Preferiblemente los aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros. La expresión “compuesto mimético de aminoácido” significa análogos sintéticos de aminoácidos que se producen en la naturaleza que son isómeros, es decir se han diseñado para imitar la estructura estérica y electrónica del compuesto natural. Tales isómeros se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, depsipéptidos, péptidos retro-inversos, tioamidas, cicloalcanos o tetrazoles 1,5-disustituídos [véase M. Goodman, Biopolymers, 24, 137, (1985)].

60 Los inhibidores o sustratos enzimáticos adecuados incluyen glucosa y análogos de glucosa tales como fluorode-soxiglucosa, ácidos grasos o inhibidores de elastasa. Los inhibidores o sustratos enzimáticos adecuados pueden ser péptidos de direccionamiento biológico (tal como se describe más adelante).

65 Los compuestos sintéticos de unión al receptor adecuados incluyen estradiol, estrógeno, progestógeno, progestona y otras hormonas esteroideas; ligandos para el receptor D-1 o D-2 de dopamina, o transportador de dopamina tal como tropanos; y ligandos para el receptor de serotonina.

Los péptidos de direccionamiento biológico adecuados de la presente invención son péptidos de 3-20 meros (es decir, péptidos que comprenden de 3 a 20 aminoácidos), preferiblemente tales fragmentos de 4 a 15 meros, lo más preferiblemente de 5 a 14 meros. Los péptidos pueden ser cíclicos o lineales o combinaciones de los mismos. Los péptidos pueden ser de origen natural o sintético, pero preferiblemente son sintéticos. Tales péptidos incluyen:

- somatostatina, octreotida y análogos,
- fragmentos de laminina, por ejemplo YIGSR, PDSGR, IKVAV, LRE y KCQAGTFALRGDPQG,
- péptidos N-formilados para dirigirse a sitios de acumulación de leucocitos,
- fragmentos de factor plaquetario 4 (PF4),
- péptidos que contienen RGD,
- fragmentos peptídicos de α_2 -antiplasmina, fibronectina o beta-caseína, fibrinógeno o trombospondina, que son sustratos para la enzima transglutaminasa (factor XIIIa). Las secuencias de aminoácidos de α_2 -antiplasmina, fibronectina, beta-caseína, fibrinógeno y trombospondina pueden encontrarse en las siguientes referencias: precursor de α_2 -antiplasmina [M.Tone *et al.*, J.Biochem, 102, 1033, (1987)]; beta-caseína [L.Hansson *et al.*, Gene, 139, 193, (1994)]; fibronectina [A.Gutman *et al.*, FEBS Lett., 207, 145, (1996)]; precursor de trombospondina-1 [V.Dixit *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83, 5449, (1986)]; R. F. Doolittle, Ann. Rev. Biochem., 53, 195, (1984).

Cuando el resto de direccionamiento biológico es un péptido, uno o ambos extremos terminales del péptido pueden estar protegidos opcionalmente con un grupo de inhibición de metabolismo adecuado. La expresión "grupo de inhibición de metabolismo" significa un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido o aminoácido en el extremo amino o carboxilo terminal. Los expertos en la técnica conocen bien tales grupos y se seleccionan de manera adecuada, para el extremo amino terminal del péptido, de: acetilo, Boc (siendo Boc terc-butiloxycarbonilo), Fmoc (siendo Fmoc fluorenilmetoxycarbonilo), benciloxycarbonilo, trifluoroacetilo, aliloxycarbonilo, Dde [es decir, 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etilo] o Npys (es decir, 3-nitro-2-piridinasulfenilo). La inhibición del metabolismo del extremo amino terminal del péptido puede conseguirse también mediante la unión del extremo amino terminal al quelante de aza-diaminadioxima. Los grupos de inhibición del metabolismo adecuados para el extremo carboxilo terminal del péptido incluyen: carboxamida, éster terc-butílico, éster bencílico, éster ciclohexílico, amino-alcohol o la unión al quelante de aza-diaminadioxima. Preferiblemente, se selecciona al menos un grupo de inhibición de metabolismo para que sea el quelante de aza-diaminadioxima.

El extremo carboxilo terminal de los péptidos es particularmente susceptible a ruptura *in vivo* por enzimas carboxipeptidasas. Por consiguiente, el quelante de aza-diaminadioxima se une preferiblemente al extremo carboxilo terminal. Cuando el péptido comprende un péptido cíclico, el grupo de inhibición de metabolismo puede ser el enlace covalente que cierra el anillo peptídico cíclico.

Los péptidos de direccionamiento biológico preferidos de la presente invención son fragmentos peptídicos de 3 a 20 meros de α_2 -antiplasmina o caseína, lo más preferiblemente tales fragmentos de 4 a 15 meros, especialmente de 5 a 14 meros. Los péptidos de α_2 -antiplasmina o caseína preferidos de la presente invención comprenden al menos un grupo de inhibición de metabolismo, y una secuencia de aminoácidos tomada del extremo N terminal de:

(i) α_2 -antiplasmina,

es decir NH₂-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys-OH o variantes de ésta en la que uno o más aminoácidos se han intercambiado, añadido o eliminado tal como:

NH₂-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly-OH,

NH₂-Asn-Gln-Glu-Ala-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly-OH,

NH₂-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Gly-OH; o bien

(ii) caseína

es decir, Ac-Leu-Gly-Pro-Gly-Gln-Ser-Lys-Val-Ile-Gly.

Los péptidos de α_2 -antiplasmina especialmente preferidos de la presente invención son fragmentos peptídicos que comprenden la secuencia de 4 aminoácidos Asn-Gln-Glu-Gln (NQE_Q). Los péptidos de α_2 -antiplasmina de este tipo más especialmente preferidos tienen la secuencia:

Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Xaa-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly,

en la que Xaa es Tyr o I-Tyr (es decir, yodo-tirosina).

Tales péptidos de α_2 -antiplasmina preferidos tienen preferiblemente grupos de inhibición de metabolismo en ambos extremos terminales peptídicos, siendo la aza-diaminadioxima uno de los grupos de inhibición de metabolismo. En ese caso, el quelante de aza-diaminadioxima está unido preferiblemente al extremo carboxilo terminal, y el extremo N terminal está protegido por un grupo de inhibición de metabolismo, preferiblemente N-acetilo, de modo que el péptido de α_2 -antiplasmina es preferiblemente:

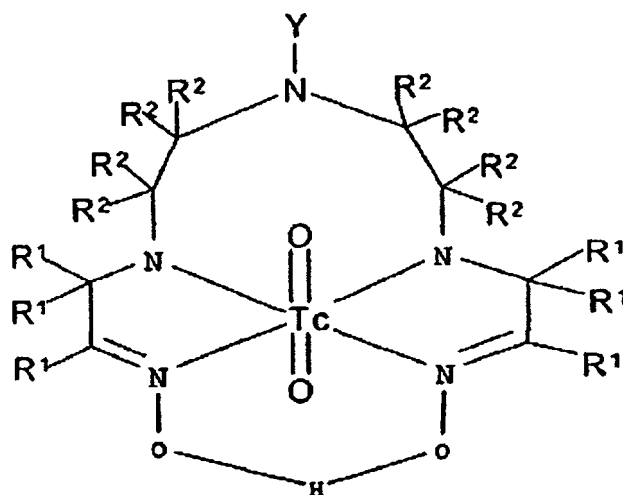
Ac-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Xaa-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly,

en el que Xaa es Tyr o I-Tyr (es decir, yodo-tirosina).

El término “fluoroalquilo” significa un grupo alquilo con al menos un sustituyente flúor, es decir el término abarca grupos desde monofluoroalquilo (por ejemplo, -CH₂F) hasta perfluoroalquilo (por ejemplo, CF₃).

Además de las especies de tecnecio deseadas, los ligandos de aza-diaminadioxima forman otros complejos de tecnecio que se clasifican como complejos de ^{99m}Tc transitorios del ligando de fórmula I. Estos “complejos de ^{99m}Tc transitorios” son los productos de reacción de formación de complejos de tecnecio cinéticamente favorecidos con el ligando de fórmula I. Son de naturaleza transitoria, convirtiéndose lentamente en el producto de reacción de formación de complejos químico final termodinámicamente estable en condiciones ambiente. No se conocen las estructuras químicas de los complejos de ^{99m}Tc transitorios, pero se cree que implican la coordinación del átomo de de nitrógeno cabeza de puente del resto -NY- del ligando de fórmula (I) con el tecnecio. Tal coordinación implicaría probablemente que el ligando de aza-diaminadioxima actuara como un ligando pentadentado (es decir, teniendo un conjunto donador de dioximatriamina), o bien como un quelante tetradentado con un grupo oxima no coordinado en un complejo de Tc(V) con un núcleo monoxo (es decir, un núcleo de Tc=O³⁺). Tal coordinación por el átomo de nitrógeno cabeza de puente se vería cinéticamente favorecida por el menor tamaño del anillo de quelato de 5 anillos cuando el átomo de nitrógeno de -NY- se coordina, en comparación con el tamaño de anillo de quelato de 8 anillos del producto termodinámico en el que el átomo de nitrógeno de -NY- no está coordinado.

Para aplicaciones radiofarmacéuticas en particular, la presencia de especies de tecnecio múltiples cuya composición exacta cambia con el tiempo es claramente indeseable, puesto que es difícil de conseguir una reproducibilidad de lo que se administra, y cada especie puede tener diferentes características de biodistribución. La presente invención proporciona por tanto procedimientos para controlar los niveles de los complejos de tecnecio transitorios, de modo que se obtiene el producto termodinámico deseado en el mayor grado de pureza. Se cree que el producto termodinámico deseado de los complejos de tecnecio del ligando de aza-diaminadioxima tiene la estructura:



en la que R¹, R² y Y son tal como se definió anteriormente.

Es decir, un dioxo-complejo de Tc(V), teniendo el ligando de aza-diaminadioxima un conjunto donador metálico de diaminadioxima, en el que el nitrógeno del grupo -NY- no está coordinado. Se cree que la estructura de anillo pseudo-macrocíclico confiere estabilidad termodinámica en comparación con los complejos de ^{99m}Tc transitorios. Cuando la naturaleza de Y es tal que el átomo de N de -NY- es una amina terciaria, entonces una proporción significativa de esta amina terciaria se protona en disolución acuosa a pH inferior a 9,0 debido a la basicidad de las aminas terciarias (que tienen valores de pK_a normalmente en el intervalo de 8 a 10).

Los presentes inventores han descubierto que, además de las especies de tecnecio deseadas, y los complejos de ^{99m}Tc transitorios, los ligandos de aza-diaminadioxima pueden formar otros complejos de tecnecio que se clasifican como complejos de tecnecio lipófilos, y que tales complejos lipófilos pueden afectar de manera adversa a la biodistribución de la composición de ^{99m}Tc . La expresión "complejo de tecnecio lipófilo" significa un complejo de coordinación metálico de aza-diaminadioxima de tecnecio con el ligando de fórmula I que tiene un coeficiente de reparto octanol-agua significativamente mayor que el complejo de tecnecio termodinámico deseado de la aza-diaminadioxima. Tales "complejos de tecnecio lipófilos" se unen fuertemente a la fase estacionaria en HPLC de fase inversa en C18 cuando se usa hasta el 50% de disolvente orgánico en la fase móvil. Por tanto, la presencia de un "complejo de tecnecio lipófilo" de este tipo en la composición necesita del uso de una fase móvil de disolvente acuoso/orgánico con un contenido orgánico de al menos el 70%, preferiblemente de al menos el 90% para hacer que se eluyan a partir de la columna en un análisis de HPLC de fase inversa.

Se cree que es particularmente posible observar tales "complejos de tecnecio lipófilos" cuando se preparan ligandos liofilizados de fórmula I en envases o viales farmacéuticos que comprenden un cierre de caucho elastomérico sintético, y la molécula (Z) de direccionamiento biológico comprende un grupo nucleófilo reactivo tal como un compuesto que contiene amina, especialmente uno que tiene una amina primaria o secundaria (por ejemplo, un residuo de lisina de un péptido); un tiol (por ejemplo, un residuo de cisteína de un péptido), o un fenol (por ejemplo, un residuo de tirosina de un péptido). En tales circunstancias, pueden eliminarse los productos lixiviables no polares volátiles del caucho sintético del cierre sintético a vacío, y condensarse sobre el tapón de liofilización frío. La reacción química del compuesto lixiviado con el grupo nucleófilo de la molécula de direccionamiento conduce entonces a la formación de derivados más lipófilos de Z. Tales reacciones químicas se ven favorecidas a pH alcalino, en el que el grupo nucleófilo es relativamente reactivo (es decir, libre a diferencia de las aminas protonadas, o estando presente un mayor grado de especies de tiolato o fenolato). Cuando se lleva a cabo el radiomarcado con ^{99m}Tc , el resultado es que se observan impurezas de "complejo de tecnecio lipófilo". Se conoce la lixiviación de una gama de productos lixiviables no polares, volátiles a partir de cierres de caucho sintéticos durante la liofilización [véase Jahnke *et al.*, Int. J. Pharmaceut., 77, 47-55 (1991) y J. Parent. Sci. Technol., 44(5), 282-288 (1990)], pero no se ha informado previamente del efecto de estos productos lixiviables sobre los agentes radiofarmacéuticos. También se sabe que tales productos lixiviables del cierre pueden surgir durante el calentamiento, por ejemplo durante el tratamiento en autoclave para la esterilización [véase por ejemplo Danielson J. Parent. Sci. Technol. 46(2), 43-47 (1992)], de modo que se cree que la reacción de la molécula (Z) de direccionamiento biológico con tales productos lixiviables puede producirse también en otras circunstancias, aunque la liofilización es el peor de los casos.

Tales "complejos de tecnecio lipófilos" son por tanto particularmente problemáticos cuando la composición de complejo de tecnecio se prepara en un vial o envase que tiene un cierre sintético, especialmente cuando se usa liofilización, tal como los kits de la tercera realización más adelante. La presente invención proporciona procedimientos para suprimir o controlar "complejos de tecnecio lipófilos" mediante la elección adecuada de materiales de cierre y formulaciones de kit.

La presente invención muestra que los complejos de ^{99m}Tc lipófilos del ligando de fórmula I muestran una retención sanguínea y captación hepática indeseables *in vivo*. Es importante minimizar la captación hepática, puesto que el hígado es un importante órgano de fondo para la formación de imágenes radiofarmacéuticas, especialmente para la formación de imágenes de pulmón o corazón. Cuando la molécula (Z) de direccionamiento está diseñada para seleccionar trombos en el pulmón tales como émbolos pulmonares (EP), el potencial para la formación de imágenes se verá afectado también por la radioactividad en los órganos y tejidos que rodean el coágulo sanguíneo (es decir pulmón, corazón, sangre e hígado).

Los diversos complejos de aza-diaminadioxima de tecnecio pueden separarse y detectarse mediante procedimientos cromatográficos adecuados, tales como HPLC, especialmente HPLC de fase inversa, es decir RP-HPLC. La presencia de estas especies lipófilas no se había reconocido por investigadores anteriores. Por tanto, por ejemplo, el análisis de ITLC y HPLC inicial de un conjugado de aza-diaminadioxima con un péptido de antiplasmina sugirió una pureza nominal de más del 90%, es decir una pureza satisfactoria. Los estudios de biodistribución posteriores mostraron altos niveles de retención en el hígado que eran contradictorios con las cantidades medidas de impurezas radioquímicas. Las impurezas incluían RHT (tecnecio hidrolizado reducido), que se sabe que muestra captación hepática. El RHT es una especie inmóvil que se detecta mediante ITLC. Otro análisis cromatográfico más discriminatorio mostró las especies múltiples de la presente invención.

Usando RP-HPLC, los complejos de ^{99m}Tc transitorios muestran tiempos de retención inferiores a los del producto termodinámico, mientras que los complejos lipófilos muestran tiempos de retención significativamente más largos que los del producto termodinámico. Usando la cuantificación del tamaño de pico, el experto en la técnica puede controlar fácilmente de ese modo si una reacción de formación de complejos de ^{99m}Tc dada ha avanzado hasta completarse, y los niveles de complejos de ^{99m}Tc lipófilos presentes. Puede establecerse fácilmente una muestra auténtica del producto

de complejo de ^{99m}Tc termodinámico deseado para un sistema dado mediante un tiempo de reacción de formación de complejo prolongado a temperatura ambiente (18-25°C), o bien tras calentamiento a temperaturas más elevadas tal como enseña la presente invención. Entonces pueden usarse tales muestras auténticas para identificar los picos observados para el sistema de cromatografía particular usado.

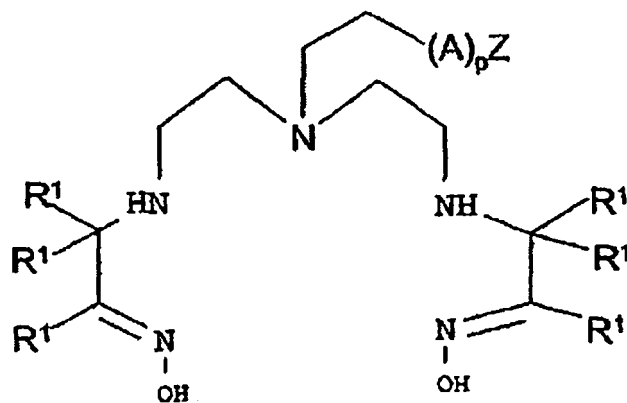
El término "logP" tiene su significado convencional, es decir el logaritmo (en base 10) del coeficiente de reparto octanol-agua (P). Tales coeficientes de reparto de octanol-agua están publicados para una amplia gama de compuestos orgánicos, y pueden medirse mediante una variedad de técnicas, tales como medición directa [para complejos de ^{99m}Tc véase A. R. Ketring *et al*, Int. J. Nucl. Med. Biol., 11, 113-119 (1984)], o cromatografía [A. Hoepping *et al*, Bioorg. Med. Chem., 6, 1663-1672 (1998)]. Un procedimiento de medición preferido es calibrar un sistema de cromatografía (por ejemplo, HPLC) con patrones conocidos de modo que el tiempo de retención pueda correlacionarse con el logP. Esto tiene la ventaja de que pueden medirse mezclas de especies simultáneamente.

Los complejos de tecnecio preferidos de la presente invención son simétricos, es decir, los dos sustituyentes $-\text{CR}^2_2\text{R}^2_2\text{NHCR}^1_2\text{C}(=\text{NOH})\text{R}^1$ en el resto $-\text{NY}-$ del ligando de fórmula (I) se seleccionan para que sean iguales. Esto tiene la ventaja de que el complejo de tecnecio no contiene un centro quiral, puesto que tales centros pueden dar como resultado complejos de tecnecio diastereoméricos y posiblemente requieren la purificación de isómeros particulares.

En los complejos de aza-diaminadioxima de tecnecio de la presente invención, se prefiere que al menos un grupo R^2 sea H, más preferiblemente todos los grupos R^2 son H. Cada R^1 se selecciona preferiblemente de: alquilo C_{1-3} , alcoxilalquilo C_{2-4} , hidroxialquilo C_{1-3} , o fluoroalquilo C_{1-3} , y lo más preferiblemente es alquilo C_{1-3} o fluoroalquilo C_{1-3} . Lo más especialmente preferido es que todos los grupos R^1 sean CH_3 .

Cuando los complejos de tecnecio de la presente invención comprenden grupos R en los que dos o más grupos R, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico, heterocíclico, saturado o insaturado, tales anillos preferidos tienen de 3 a 6 miembros, especialmente 5 ó 6 miembros. Los anillos más preferidos de este tipo son anillos carbocíclicos saturados. Los anillos carbocíclicos preferidos son aquéllos en los que 2 grupos R^1 unidos al mismo o bien a átomos de carbono adyacentes se combinan para formar anillos saturados de 3 a 6 miembros, especialmente 5 ó 6 miembros.

Las composiciones de complejo de aza-diaminadioxima de tecnecio especialmente preferidas de la presente invención son aquéllas con los ligandos de fórmula (II):



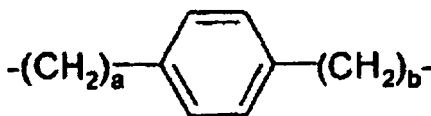
II

en la que cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo C_{1-3} o fluoroalquilo C_{1-3} , p es un número entero de valor 0 a 3, y Z es tal como se define para la fórmula I. Por tanto, en la fórmula II Y es $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{A})_p\text{Z}$. Los ligandos preferidos de fórmula (II) son simétricos tal como se describió anteriormente.

Se prevé que el papel del grupo conector $-(\text{A})_n-$ sea separar el complejo de tecnecio relativamente voluminoso que resulta tras la coordinación metálica, del sitio activo del resto (Z) de direccionamiento biológico, de modo que, por ejemplo, no se perjudica la unión al receptor. Esto puede conseguirse mediante una combinación de flexibilidad (por ejemplo, cadenas de alquilo sencillas), de modo que el grupo voluminoso tiene la libertad de situarse lejos del sitio activo y/o rigidez tal como un separador de cicloalquilo o anillo que orienta al complejo metálico lejos del sitio activo. La naturaleza del grupo conector puede usarse también para modificar la biodistribución del complejo de tecnecio resultante del conjugado. Por tanto, por ejemplo la introducción de grupos éter en el conector ayudará a minimizar la unión de proteínas plasmáticas, o el uso de grupos conectores poliméricos tales como polialquilenglicol, especialmente PEG (polietilenglicol) puede ayudar a prolongar la vida del agente en la sangre *in vivo*.

Los grupos conectores preferidos $-(A)_n-$ tienen una cadena de estructura principal (es decir, los átomos unidos que constituyen el resto $-(A)_n-$) que contiene de 2 a 10 átomos, lo más preferiblemente de 2 a 5 átomos, prefiriéndose especialmente 2 ó 3 átomos. Una cadena de estructura principal de grupo conector mínima de 2 átomos confiere la ventaja de que el quelante de aza-diaminadioxima está bastante separado del resto de direccionamiento biológico de modo que se minimiza cualquier interacción. Otra ventaja es que el tamaño de anillo de quelato potencial del grupo Z es tan grande (al menos 8 para una cadena de grupo conector de 2 átomos), que es poco probable que estos grupos compitan de manera eficaz con la coordinación de la aza-diaminadioxima al ^{99m}Tc . De este modo, ambas, las características de direccionamiento biológico del resto de direccionamiento biológico, y la capacidad de formación de complejos metálicos del quelante de aza-diaminadioxima se mantienen en conjugados de este tipo. Se prefiere fuertemente que el resto Z de direccionamiento biológico se una al quelante de aza-diaminadioxima de modo que la unión no experimenta un metabolismo fácil en la sangre. Esto se debe a que tal metabolismo daría como resultado la separación por ruptura de complejo metálico de ^{99m}Tc antes de que el resto de direccionamiento biológico marcado alcanzara el sitio diana *in vivo* deseado. Por tanto, el resto de direccionamiento biológico está preferiblemente unido covalentemente al los complejos metálicos de ^{99m}Tc de la presente invención a través de grupos conectores $-(A)_n-$ que no se metabolizan fácilmente. Tales enlaces adecuados son enlaces carbono-carbono, enlaces amida, uniones urea o tiourea, o enlaces éter.

Los grupos conectores no peptídicos tales como grupos alquilenos o grupos arílenos tienen la ventaja de que no hay interacciones de puentes de hidrógeno significativas con el resto de direccionamiento biológico de modo que el conector no envuelve el resto de direccionamiento biológico. Los grupos separadores de alquilenos preferidos son $-(\text{CH}_2)_q-$ en el que q es un número entero de valor 2 a 5. Preferiblemente q es 2 ó 3. Los separadores de arílenos preferidos son de fórmula:



en la que: a y b son cada uno independientemente 0, 1 ó 2.

Un grupo Y preferido es por tanto $-\text{CH}_2\text{CH}_2-(A)_p-\text{Z}-$, en el que p es un número entero de valor 0 a 3. Cuando Z es un péptido, Y es preferiblemente $-\text{CH}_2\text{CH}_2-(A)_p-\text{Z}$ en el que $-(A)_p-$ es $-\text{CO}-$ o $-\text{NR}-$. Cuando $-(A)_p-$ es $-\text{NH}-$, este grupo tiene la ventaja adicional de que proviene del producto intermedio simétrico $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_3$, que está comercialmente disponible. Los precursores de triamina que tienen diferentes longitudes de cadena requieren el uso de estrategias sintéticas para distinguir químicamente las diversas aminas (por ejemplo, a través de grupos protectores).

Los quelantes de aza-diaminadioxima preferidos de fórmula II están conjugados preferiblemente con los péptidos de α_2 -antiplasmina (y realizaciones preferidas de los mismos) descritos anteriormente.

En el procedimiento de la presente invención, el material de partida de tecnecio habitual es el pertecnetato, es decir TcO_4^- que es tecnecio en el estado de oxidación Tc(VII). El propio pertecnetato no forma fácilmente complejos metálicos, por tanto, la preparación de complejos de tecnecio requiere normalmente la adición de un agente reductor adecuado tal como ión estannoso para facilitar la formación de complejos mediante la reducción del estado de oxidación del tecnecio hasta los estados de oxidación inferiores, normalmente de Tc(I) a Tc(V). El disolvente puede ser orgánico o acuoso, o mezclas de los mismos. Cuando el disolvente comprende un disolvente orgánico, el disolvente orgánico es preferiblemente un disolvente biocompatible, tal como etanol o DMSO. Preferiblemente el disolvente es acuoso, y lo más preferiblemente es solución salina isotónica. Las condiciones de calentamiento adecuadas son un intervalo de temperatura de 50°C a 80°C durante 10 minutos a 20 minutos, preferiblemente de 60°C a 70°C durante 10 minutos a 15 minutos, lo más preferiblemente de 60°C a 65°C durante 10 minutos a 12 minutos, siendo lo ideal 60°C durante 10 minutos. El pH del medio de reacción está de manera adecuada en el intervalo de pH 8,5 a 9,5, preferiblemente de pH 8,8 a 9,0, lo más preferiblemente pH 8,8. El proceso de calentamiento puede emplear cualquier metodología adecuada tal como baños calientes de fluido, tal como agua o un aceite de alto punto de ebullición (por ejemplo silicona), bloques de calentamiento, placas calefactoras o radiación de microondas, siempre que pueda conseguirse el control de la temperatura deseado. Tras completarse el calentamiento, se deja enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, o bien puede enfriarse de manera activa (por ejemplo en una corriente de un fluido de enfriamiento tal como un gas o agua) o a través de un bloque de calentamiento con enfriamiento inductivo integral.

Los presentes inventores han establecido que los complejos de ^{99m}Tc lipófilos indeseables pueden suprimirse mediante la presencia en la mezcla de reacción de al menos una sal de un ácido orgánico débil con un catión biocompatible. La expresión “ácido orgánico débil” significa un ácido orgánico con un pKa en el intervalo de 3 a 7. La expresión “catión biocompatible” significa un contraión cargado positivamente que forma una sal con un grupo ionizado, cargado negativamente, en el que dicho contraión cargado positivamente es también no tóxico y por tanto adecuado para la administración al organismo de mamíferos, especialmente al cuerpo humano. Los ejemplos de cationes biocompatibles adecuados incluyen: los metales alcalinos sodio o potasio; los metales alcalinotérreos calcio y magnesio; y el ión amonio. Los cationes biocompatibles preferidos son sodio y potasio, lo más preferiblemente sodio.

Tales ácidos orgánicos débiles adecuados son ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido glucoheptónico, ácido benzoico, fenoles o ácidos fosfónicos. Por tanto, las sales adecuadas son acetatos, citratos, tartratos, gluconatos, glucoheptonatos, benzoatos, fenolatos o fosfonatos, preferiblemente acetatos. La sal de acetato es preferiblemente acetato de sodio o de potasio, lo más preferiblemente acetato de sodio. Una ventaja adicional de usar estas sales es que el anión ácido se compleja débilmente con el tecnecio (tal como tartrato, gluconato o citrato), y se desplaza por el ligando de aza-diaminadioxima en un proceso de transquelación o intercambio de ligandos. Tales condiciones son útiles para ayudar a suprimir reacciones secundarias indeseables tales como la hidrólisis del ión tecnecio. Una concentración adecuada para su uso para la sal del ácido orgánico débil está en el intervalo de 1 $\mu\text{mol/ml}$ a 100 $\mu\text{mol/ml}$, preferiblemente en el intervalo de 5 $\mu\text{mol/ml}$ a 50 $\mu\text{mol/ml}$.

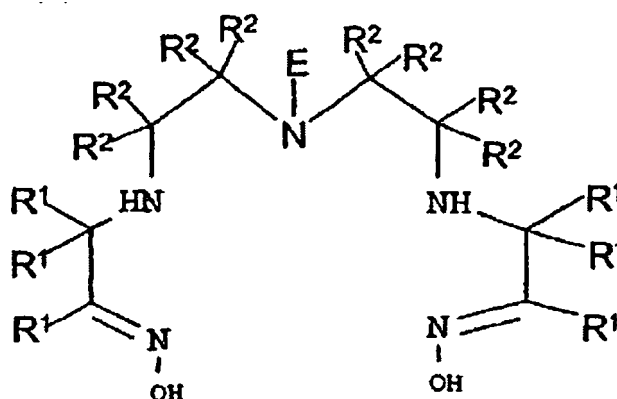
Los solicitantes han descubierto además que la adición de un radioprotector a la mezcla de reacción no sólo estabiliza el producto de complejo de $^{99\text{Tc}}$ una vez formado, sino que de manera inesperada acelera la conversión de los complejos de $^{99\text{Tc}}$ transitorios para dar el producto de complejo de tecnecio termodinámico deseado. Esto tiene la ventaja de que pueden aplicarse tiempos de calentamiento más cortos y/o temperaturas de calentamiento más bajas. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando el resto de direccionamiento biológico es termosensible al menos en cierto grado. El término "radioprotector" significa un compuesto que inhibe las reacciones de degradación, tales como procesos redox, atrapando radicales libres altamente reactivos, tales como radicales libres que contienen oxígeno que surgen de la radiólisis del agua.

Los radioprotectores de la presente invención se seleccionan de manera adecuada de: una fuente de aire u oxígeno estéril; ácido ascórbico; ácido para-aminobenzoico (es decir, ácido 4-aminobenzoico o PABA); ácido gentísico (es decir, ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y sales de tales ácidos con un catión biocompatible, tal como se definió anteriormente. Los radioprotectores preferidos son ácido ascórbico y ácido para-aminobenzoico, o sales de los mismos con un catión biocompatible. Los radioprotectores especialmente preferidos son ácido para-aminobenzoico y sales del mismo con un catión biocompatible, de manera ideal para-aminobenzoato de sodio. Los radioprotectores de la presente invención están comercialmente disponibles hasta una especificación de calidad farmacéutica.

Los presentes inventores han establecido también que los niveles de complejos de $^{99\text{Tc}}$ lipófilos indeseables se ven influidos por la elección del cierre del vial de calidad farmacéutica empleado. Tales cierres comprenden normalmente cauchos de bromobutilo, clorobutilo o butilo o mezclas de los mismos, y se cree que los materiales lixiviados volátiles (por ejemplo subproductos de resina fenólica o antioxidante fenólico impedidos) del caucho sintético pueden reaccionar con el conjugado de quelato de aza-diaminadioxima proporcionando niveles variables de complejos de $^{99\text{Tc}}$ lipófilos. Se cree que la mayoría de los tipos de cierre presentan este problema, pero en grados variables, por tanto, la elección del cierre es también un factor en la ayuda para suprimir los niveles de complejos de $^{99\text{Tc}}$ lipófilos.

La preparación de la composición de complejo de tecnecio de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente usando un kit no radioactivo, tal como se describe en la tercera realización de la invención (más adelante).

Los conjugados de quelante de aza-diaminadioxima usados en la preparación de las composiciones de complejo de tecnecio de la presente invención pueden prepararse mediante la reacción de un quelato bifuncional de fórmula III con el resto (Z) de direccionamiento biológico:



Fórmula III

en la que:

cada R^1 y R^2 es independientemente un grupo R;

E es $-(A)_n-J$

en el que:

J es un grupo funcional adecuado para la conjugación con Z;

5 -(A)_n- es un grupo conector en el que cada A es independientemente -CO-, -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NR-, -NRCO-, -CONR-, NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SC R₂-, -CR₂NRCR₂-, un grupo cicloheteroalquileo C₄₋₈, un grupo cicloalquileo C₄₋₈, un grupo arileno C₅₋₁₂, o un grupo heteroarileno C₃₋₁₂ o un resto de polialquilenglicol, poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico); n es un número entero de valor 0 a 10;

10 cada grupo R es independientemente H o alquilo C₁₋₁₀, alquilarilo C₃₋₁₀, alcoxialquilo C₂₋₁₀, hidroxialquilo C₁₋₁₀, fluoroalquilo C₁₋₁₀, o 2 o más grupos R, junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo carbocíclico, heterocíclico, saturado o insaturado.

15 La expresión “grupo funcional adecuado para la conjugación” significa un grupo funcional que reaccionará con un grupo funcional correspondiente de Z (normalmente un grupo amina, carboxilo o tiol) para conectar químicamente el quelante de aza-diaminadioxima a Z. Tales grupos funcionales preferidos adecuados para la conjugación son: -NR⁵R⁶, -CO₂M, -NCS, -NCO, -SM¹, -OM¹, maleimida o acrilamida, en los que:

20 R⁵ y R⁶ son independientemente un grupo R o P^G;

M es H, un catión biocompatible, P^G o un éster activo;

25 M¹ es H o P^G; y P^G es un grupo protector.

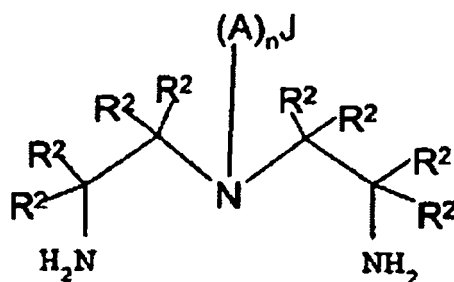
La expresión “catión biocompatible” es tal como se definió anteriormente.

30 La expresión “grupo protector” significa un grupo que inhibe o suprime reacciones químicas indeseables, pero que está diseñado para ser lo suficientemente reactivo para que pueda separarse del grupo funcional en cuestión en condiciones suaves que no modifican químicamente el resto de la molécula. Tras la desprotección, el grupo en cuestión puede usarse para conjugar el quelato bifuncional de fórmula III con el resto (Z) de direccionamiento biológico. Los expertos en la técnica conocen bien grupos protectores y se seleccionan de manera adecuada, cuando J es -NR⁵R⁶, de: Boc (siendo Boc terc-butiloxycarbonilo), Fmoc (siendo Fmoc fluorenilmetoxycarbonilo), trifluoroacetilo, aliloxi-carbonilo, Dde [es decir 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo] o Npys (es decir 3-nitro-2-piridinasulfenilo); y cuando J es -CO₂P^G, de: éster metílico, éster terc-butilico, éster bencílico. Cuando J es -OP^G, los grupos protectores adecuados son: acetilo, benzóilo, tritilo o tetrabutildimetilsililo. Cuando J es -SP^G, los grupos protectores adecuados son: tritilo y 4-metoxibencilo. El uso de otros grupos protectores se describe en “Protective Groups in Organic Synthesis”, Theodor W. Greene y Peter G. M. Wuts, (John Wiley & Sons, 1991).

45 La expresión “éster activo” significa un derivado de éster del ácido carboxílico que está diseñado para ser un grupo saliente mejor, y por tanto permitir una reacción más fácil con nucleófilos presentes en el resto de direccionamiento biológico tales como aminas. Los ejemplos de ésteres activos adecuados son: N-hidroxisuccinimida (NHS), pentafluorofenol, pentafluorotiofenol, para-nitrofenol, hidroxibenzotriazol y PyBOP (es decir, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio).

50 Los quelatos bifuncionales de fórmula III pueden conjugarse con el resto (Z) de direccionamiento biológico tal como se describe por S.Liu *et al* [Chem. Rev., 99, 2235-2268 (1999)]. Por tanto, por ejemplo los quelantes de aza-diaminadioxima funcionalizados con amina de fórmula III (es decir, J = -NR⁵R⁶) pueden conjugarse con el/los grupo(s) carboxilo del resto (Z) de direccionamiento biológico, a través de enlaces amida. Este acoplamiento puede llevarse a cabo directamente (por ejemplo usando síntesis peptídica en fase sólida), o a través de productos intermedios apropiados tal como se conoce en la técnica, tales como ésteres activados del grupo carboxilo del resto de direccionamiento biológico. Como alternativa, el grupo amina colgante del quelante bifuncional puede convertirse en primer lugar en un grupo isotiocianato (-NCS) o isocianato (-NCO), que permiten la conjugación con restos de direccionamiento biológico que contienen amina, a través de la formación de uniones tiourea y urea respectivamente. Como alternativa, el grupo amina colgante del quelante de aza-diaminadioxima bifuncional puede hacerse reaccionar con una función ácido de un diácido para introducir un grupo carboxilo terminal a través de un grupo conector. Puede usarse un quelante bifuncional que porta una función carboxilo (es decir, J = -CO₂M) de una manera similar para acoplarse directamente a restos de direccionamiento biológico que contienen amina a través de un enlace amida. El quelato bifuncional puede portar también un grupo diseñado para reaccionar con grupos tiol en el resto de direccionamiento biológico para formar uniones tioéter estables. Los ejemplos de tales grupos son maleimidas (que pueden prepararse mediante reacción de anhídrido maleico con la correspondiente amina, seguido de calentamiento con anhídrido acético), y acrilamidas (que pueden prepararse mediante la reacción de cloruro de acrililo con la amina).

Los quelantes de aza-diaminadioxima bifuncionales de la presente invención pueden prepararse de manera adecuada mediante la alquilación de un compuesto de fórmula IV:



Fórmula IV

en la que A, J, R² y n son tal como se definieron para la fórmula III anterior, con:

- (i) el derivado cloronitroso apropiado Cl-C(R¹)₂-C(=NO)R¹;
- (ii) una alfa-clorooxima de fórmula Cl-C(R¹)₂-C(=NOH)R¹;
- (iii) una alfa-bromocetona de fórmula Br-C(R¹)₂-C(=O)R¹ seguido de la conversión del producto de diaminadiketona para dar la diaminadioxima con hidroxilamina.

La ruta (i) se describe por S. Jurisson *et al* [Inorg. Chem., 26, 3576-82 (1987)]. Los compuestos cloronitrosos pueden obtenerse mediante tratamiento del alqueno apropiado con cloruro de nitrosilo (NOCl). Otros detalles sintéticos de los compuestos cloronitrosos se proporcionan por: Ramalingam, K. *et al* Synth. Commun. (1995) 25(5) 743-52; Glaser *et al* J. Org. Chem. (1996), 61(3), 1047-48; Clapp, Leallyn B.; *et al* J. Org. Chem. (1971), 36(8) 1169-70; Saito, Giulichi *et al* Shizen Kagaku (1995), 47, 41-9 y Schulz, Manfred Z. Chem (1981), 21(11), 404-5. La ruta (iii) se describe por Nowotnik *et al* [Tetrahedron, 50(29), páginas 8617-8632 (1994)]. Las alfa-cloro-oximas pueden obtenerse mediante oximación de la correspondiente alfa-clorocetona o aldehído, que están comercialmente disponibles. Las alfa-bromocetonas están comercialmente disponibles.

Las composiciones de complejo de tecnecio de aza-diaminadioxima pueden proporcionarse como productos radiofarmacéuticos en una forma estéril adecuada para la administración a seres humanos. Tales productos radiofarmacéuticos se suministran de manera adecuada en un envase que está dotado de un precinto que es adecuado para punciones individuales o múltiples con una aguja hipodérmica (por ejemplo un cierre de precinto de septo mediante encapsulado) mientras que se mantiene la integridad estéril. Tales envases pueden contener dosis para el paciente individuales o múltiples. Los envases de dosis múltiples preferidos comprenden un único vial de carga (por ejemplo de 10 cm³ a 100 cm³ de volumen) que contienen dosis para el paciente múltiples, mediante lo cual pueden extraerse por tanto dosis para el paciente individuales en jeringuillas de calidad clínica a diversos intervalos de tiempo durante la vida viable de preparación para adecuarse a la situación clínica.

Los productos radiofarmacéuticos pueden suministrarse también en jeringuillas cargadas previamente. Tales jeringuillas cargadas previamente están diseñadas para contener un dosis para seres humanos individual, que está en una forma en la que la dosis puede administrarse al paciente directamente a partir de la jeringuilla. Tales jeringuillas cargadas previamente se preparan de manera adecuada mediante fabricación aséptica, de modo que el producto está en forma estéril. La jeringuilla que está cargada previamente es por tanto preferiblemente una jeringuilla desechable u otra que sea adecuada para su uso clínico, y por tanto que mantiene la integridad estéril del producto radiofarmacéutico. La jeringuilla cargada previamente que contiene el producto radiofarmacéutico puede estar dotada de manera ventajosa de una protección de jeringuilla para proteger al operario de una dosis radioactiva. Tales protecciones adecuadas de jeringuilla de productos radiofarmacéuticos se conocen en la técnica y comprenden preferiblemente plomo o tungsteno. Tales jeringuillas cargadas previamente se envían preferiblemente al cliente ya equipadas con una protección de jeringuilla, y empaquetadas dentro de un envase que proporciona una protección adicional frente a la radiación, de modo que se minimiza la dosis de radiación externa en el exterior del envase durante el transporte desde el fabricante hasta el cliente.

Un contenido en radioactividad de ^{99m}Tc adecuado para un producto radiofarmacéutico de formación de imágenes de diagnóstico con ^{99m}Tc está en el intervalo de 180 MBq a 1500 MBq (de 3,5 mCi a 42 mCi), dependiendo del sitio del que van a formarse imágenes *in vivo*, la captación y la proporción de diana a fondo. Para la formación de imágenes de corazón con un producto radiofarmacéutico de ^{99m}Tc, pueden usarse aproximadamente 1110 MBq (30 mCi) para una prueba de esfuerzo, y aproximadamente 350 MBq (10 mCi) para una prueba en reposo. Para la formación de imágenes de trombos con un producto radiofarmacéutico de ^{99m}Tc sería adecuado aproximadamente 750 MBq (21 mCi).

Preferiblemente, se usan kits no radioactivos en el procedimiento de preparación de la presente invención. Tales kits están diseñados para proporcionar productos radiofarmacéuticos estériles adecuados para la administración humana, por ejemplo a través de inyección directa en el torrente sanguíneo. Para el ^{99m}Tc , el kit está preferiblemente liofilizado y está diseñado para reconstituirse con pertecnetato de ^{99m}Tc (TcO_4^-) estéril a partir de un generador de radioisótopos de ^{99m}Tc para proporcionar una disolución adecuada para la administración humana sin manipulación adicional. Los kits adecuados comprenden un envase (por ejemplo un vial sellado con septo) que contiene el ligando de aza-diaminadioxima no complejo de fórmula (I) o (II), junto con un agente reductor farmacéuticamente aceptable tal como ditionita de sodio, bisulfito de sodio, ácido ascórbico, ácido sulfínico de la formamidina, ión estannoso, Fe (II) o Cu(I); junto con al menos una sal de un ácido orgánico débil con un catión biocompatible y un radioprotector, tal como se definió anteriormente. La sal del ácido orgánico débil actúa para suprimir la formación de complejos de ^{99m}Tc lipófilos indeseables (tal como se describió anteriormente).

Los kits no radioactivos pueden comprender opcionalmente además un segundo ácido orgánico débil o sal del mismo con un catión biocompatible, que actúa como un transquelante. El transquelante es un compuesto que reacciona rápidamente para formar un complejo débil con tecnecio, luego se desplaza por la aza-diaminadioxima. Esto minimiza el riesgo de formación de tecnecio hidrolizado reducido (RHT) debido a la rápida reducción del pertecnetato que compete con la formación de complejos de tecnecio. Tales transquelantes adecuados son los ácidos orgánicos débiles y las sales de los mismos descritos anteriormente, preferiblemente tartratos, gluconatos, glucoheptonatos, benzoatos o fosfonatos, preferiblemente fosfonatos, lo más especialmente difosfonatos. Un transquelante preferido de este tipo es MDP, es decir el ácido metilendifosfónico, o una sal del mismo con un catión biocompatible.

Como una alternativa al uso del ligando en forma libre, el kit puede contener opcionalmente un complejo de metal del ligando de azadiaminadioxima que, tras la adición del tecnecio, experimenta transmetalación (es decir, intercambio de ligandos) proporcionando el producto deseado. Tales complejos adecuados para la transmetalación son complejos de cobre o cinc.

El agente reductor farmacéuticamente aceptable usado en el kit es preferiblemente una sal estannosa tal como cloruro estannoso, fluoruro estannoso o tartrato estannoso, y puede estar en forma anhidra o hidratada. La sal estannosa es preferiblemente cloruro estannoso o fluoruro estannoso.

Los kits no radioactivos pueden comprender opcionalmente además componentes adicionales tales como un conservante antimicrobiano, un agente de ajuste del pH, o carga. La expresión “conservante antimicrobiano” significa un agente que inhibe el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos tales como bacterias, levaduras u hongos. El conservante antimicrobiano puede presentar también algunas propiedades bactericidas, dependiendo de la dosis. El papel principal del/de los conservante(s) antimicrobiano(s) de la presente invención es inhibir el crecimiento de cualquier microorganismo de este tipo en la composición de producto radiofarmacéutico de ^{99m}Tc posterior a la reconstitución, es decir en el propio producto de diagnóstico radioactivo. El conservante antimicrobiano puede usarse, sin embargo, también opcionalmente para inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos en uno o más componentes del kit no radioactivo de la presente invención antes de la reconstitución. El/los conservante(s) antimicrobiano(s) adecuado(s) incluye(n): los parabenos, es decir metil, etil, propil o butilparabeno o mezclas de los mismos; alcohol bencílico; fenol; cresol; cetrimida y tiomersal. El/los conservante(s) antimicrobiano(s) preferidos son los parabenos.

La expresión “agente de ajuste del pH” significa un compuesto o mezcla de compuestos utilizados para garantizar que el pH del kit reconstituido está dentro de límites aceptables (aproximadamente pH 4,0 a 10,5) para la administración a seres humanos o mamíferos. Tales agentes de ajuste del pH adecuados incluyen tampones farmacéuticamente aceptables, tales como tricina, fosfato o TRIS [es decir, tris(hidroximetil)aminometano], y bases farmacéuticamente aceptables tales como carbonato de sodio, bicarbonato de sodio o mezclas de los mismos. Para las aza-diaminadioximas de la presente invención, se prefiere que el agente de ajuste del pH comprenda bicarbonato de sodio.

Cuando el resto de direccionamiento biológico es un fragmento peptídico de α_2 -antiplasmina, una formulación de kit preferida comprende: el ligando de fórmula (I), reductor estannoso, una sal acetato de un catión biocompatible, un transquelante de ácido difosfónico más un agente de ajuste del pH. Un kit preferido de este tipo comprende: el ligando de fórmula (II); cloruro estannoso; acetato de sodio; MDP o una sal biocompatible del mismo; un radioprotector, especialmente PABA o una sal biocompatible del mismo, lo más especialmente las sal de sodio de PABA; y bicarbonato de sodio como el agente de ajuste del pH. Un kit de este tipo lo más preferido comprende además el ligando de fórmula II, en la que cada R^1 es CH_3 , $(A)_p$ es NH y Z es $\text{Ac-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Xaa-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly-}$, en el que Xaa es Tyr o I-Tyr, y Ac es N-acetilo.

La invención se ilustra mediante los ejemplos no limitantes detallados más adelante.

El ejemplo 1 describe la síntesis del compuesto 1, que es un quelante de aza-diaminadioxima de la invención.

El ejemplo 2 describe la síntesis de la forma protegida de una molécula de direccionamiento peptídico, que es un fragmento peptídico de α_2 -antiplasmina para seleccionar como diana trombos.

ES 2 309 361 T3

El ejemplo 3 describe la síntesis del compuesto 3, que es un conjugado del quelante de aza-diaminadioxima del ejemplo 1 con el péptido de direccionamiento del ejemplo 2. El ejemplo 3 describe también las síntesis de los compuestos 4 a 7.

5 El ejemplo 4 es un ejemplo comparativo que muestra el radiomarcado con ^{99m}Tc del compuesto 3 tal como se enseña en la técnica anterior.

10 El ejemplo 5 describe los sistemas de HPLC usados en la presente invención. El sistema J es el único que proporciona una RCP aparentemente aceptable, pero los complejos de ^xTc lipófilos están retenidos en la columna (es decir, tienen una afinidad demasiado grande por la fase estacionaria cuando se usa hasta el 40% de acetonitrilo en la fase móvil). El sistema H tiene un gradiente de elución que incluye más disolvente orgánico en la fase móvil (hasta el 90% acetonitrilo), y por tanto eluye satisfactoriamente los complejos de tecnecio lipófilos de la columna, de modo que se analizan. El cálculo excesivo del 4% de la pureza usando el sistema J se debe a los complejos de ^{99m}Tc lipófilos no detectados (véase la figura 3). El ejemplo 10 y la figura 1 muestran que tales niveles de complejos de ^{99m}Tc lipófilos tienen un efecto significativo sobre la captación hepática *in vivo*.

20 El ejemplo 6 describe la preparación de kits liofilizados para su uso en la presente invención. Se prefiere la formulación 82/6, puesto que hay una menor tendencia a que la torta liofilizada colapse durante la liofilización. La formulación 82/6 también es más fuerte frente al elutato de generador de ^{99m}Tc envejecido (es decir, hasta 6 horas tras la elución del generador), proporcionando una RCP inicial satisfactoria y una buena estabilidad posterior a la reconstitución de la preparación.

25 El ejemplo 7 describe la reconstitución de los kits liofilizados para dar composiciones de complejo de ^{99m}Tc de la presente invención.

30 El ejemplo 8 muestra que los péptidos que contienen lisina (K), es decir que tienen grupos amina (compuestos 3 y 4) muestran niveles significativos de complejos de tecnecio lipófilos. Cuando éstos están sustituidos con aminoácidos que no contienen amina, tal como para el compuesto 5, el nivel de complejos lipófilos se reduce considerablemente. Esto se muestra también por el derivado de benzamida (compuesto 6).

35 El ejemplo 9 muestra el efecto del uso de un radioprotector sobre las composiciones de complejo de ^{99m}Tc .

El ejemplo 10 demuestra el efecto del cierre del vial sobre la composición de complejo de ^{99m}Tc .

40 El ejemplo 11 muestra el efecto del contenido en complejo de ^xTc lipófilo sobre la biodistribución de una composición de complejo de ^{99m}Tc . La variación en las impurezas lipófilas produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) en la retención sanguínea de radioactividad a 1 hora p.i. (del 1,88% al 3,26%) con una tendencia concomitante hacia una disminución en la diuresis (del 63,07% al 51,04%) aunque no estadísticamente significativa. La radioactividad presente en el hígado también aumentó significativamente ($p < 0,05$) desde el 2,24% al 10,24%. Por tanto, niveles crecientes de impurezas lipólicas conducen a una retención significativamente aumentada de ^{99m}Tc -compuesto 3 en la sangre y una captación significativamente mayor en el hígado. Esto produjo a su vez una tendencia hacia una excreción urinaria disminuida.

45 El ejemplo 12 muestra el efecto de una sal de ácido orgánico débil sobre el contenido en complejo de tecnecio lipófilo y la biodistribución resultante. Se muestra que la adición acetato de sodio trihidratado a la formulación de ^{99m}Tc -compuesto 3 aumenta el aclaramiento sanguíneo y disminuye la captación hepática, tal como se esperaría debido al contenido suprimido en complejos de ^{99m}Tc lipófilos presentes. Por tanto se mejor significativamente el potencial de formación de imágenes de diagnóstico de la composición. La captación del agente en el corazón y pulmón es insignificante y por tanto el agente es potencialmente útil para la formación de imágenes EP de pulmón debido a la baja captación de fondo satisfactoria.

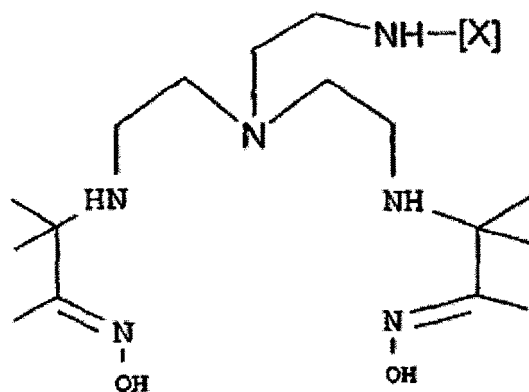
50 El ejemplo 13 muestra que una composición de complejo de ^xTc mejorada muestra aún una captación de coágulo útil, es decir, se conserva la actividad de direccionamiento biológico. Tal como se demuestra a partir del ejemplo 11 y la figura 1, la principal característica biológica que resulta de la presencia de los complejos de ^{99m}Tc lipófilos es un aumento en el % d.i. en el hígado.

55 La figura 1 muestra el efecto del contenido en complejo de ^{99m}Tc lipófilo en la composición sobre la captación hepática.

60 La figura 2 muestra un perfil de HPLC representativo de una composición de complejo de ^{99m}Tc de aza-diaminadioxima que muestra las diversas especies descritas en la presente invención - la figura 2A es una visualización de picos a escala completa normal y la figura 2B es a escala ampliada.

65 La figura 3 compara los perfiles de HPLC para la misma preparación de complejo de ^{99m}Tc de aza-diaminadioxima usando dos sistemas diferentes, el sistema J y el sistema H. Los complejos de ^xTc lipófilos se detectan usando el sistema H (a un nivel de aproximadamente el 5% del material radiomarcado presente), pero no se detectan usando el sistema J.

Tabla 1



Compuesto

X

1.

H

3.

-GKLLT(I-Y)PSVQEQN-Ac

4.

-CO(CH₂)₂CO₂-VHHQKLVFF-NH₂

5.

-GALLTYPVAQAN-Ac

6.

-COPh

7.

-CO(CH₂)₂CO₂H

En los que: Ac es acetilo

Ejemplo 1

Síntesis de 3,3,11,11-tetrametil-7-(2-aminoetil)-4,7,10-triazatridecano-2,12-dionadioxima (Compuesto 1 o Pn216)

A una disolución de *tris*(2-aminoetil)amina (1 ml, 6,68 mmoles) en acetonitrilo (10 ml) se le añadió bicarbonato de sodio (1,12 g, 13,36 mmoles, 2 eq). Se añadió una disolución de 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano [R.K.Murmann, J.Am.Chem.Soc, 79, 521-526 (1957); 1,359 g, 10,02 mmoles, 1,5 eq] en acetonitrilo seco (5 ml). Se dejó agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 días, y luego se filtró. Se lavó el residuo bien con acetonitrilo, y se evaporó el filtrado. Entonces se purificó el producto bruto mediante RP-HPLC (columna: Hamilton PRP-1; gradiente: del 0% al 100% de B en 20 min.; en la que el eluyente A es NH₃ acuoso al 2% y el eluyente B es acetonitrilo, a una velocidad de flujo de 3 ml/min.) proporcionando el compuesto 1 (164 mg, 7%).

δ H (CD₃OD, 300 MHz): 2,77 (2H, t, *J* 6Hz, CH₂NH₂), 2,50-2,58 (10H, m, H₂NCH₂CH₂N(CH₂CH₂N₂)₂), 1,85 (6H, s, 2 x CH₃C=N), 1,23 (12H, s, 2 x (CH₃)₂CNH).

Ejemplo 2

Síntesis del péptido Ac-NQEQVSPY(3I)TLLKG (Compuesto 2)

Se unió el péptido protegido Ac-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Val-Ser(tBu)-Pro-Tyr(3I)-Thr(tBu)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-OH sobre una resina de 2-clorotritilo anclando Fmoc-Gly- a la resina, y luego ciclos de desprotección/acoplamiento sucesivos con los aminoácidos protegidos apropiados y los agentes de acoplamiento DCC y HOBT. La síntesis peptídica en fase sólida se describe tal como se describe en P. Lloyd-Williams, F. Albericio y E. Girald; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press, 1997. Se acetiló la asparagina terminal, se separó de la resina usando TFA al 0,5% y se usó el compuesto 2 sin purificación adicional como la sal trifluoroacetato.

Ejemplo 3

Síntesis de los compuestos 3 a 7

Se separó el péptido Ac-NQEQVSPY(3I)TLLKG protegido (compuesto 2) de la resina de fase sólida tal como se describe en el ejemplo 2, y luego se acopló con el compuesto 1 en disolución usando PyBOP (hexafluorofosfato de

ES 2 309 361 T3

benzotriazol-1-il-oxitris-pirrolidino-fosfonio) y HOBt (1-hidroxibenzotriazol) como los agentes de acoplamiento. Se obtuvo el compuesto 3 mediante la desprotección en reactivo K [el reactivo K es TFA al 82,5%, fenol al 5%, agua procesada al 5%, tioanisol al 5%, etanoditiol (EDT) al 2,5%]. En primer lugar se purificó el conjugado bruto mediante RP-HPLC usando TFA seguido de una segunda purificación e intercambio salino con ácido acético, liofilización, filtración con un filtro de 0,22 μ y una liofilización final proporcionando el compuesto 3. Peso molecular mediante EM 1970 $\pm$ 1 Daltons.

Los péptidos usados en los compuestos 4 y 5 se prepararon de una manera similar. El compuesto 7 se preparó mediante derivatización del compuesto 1 (Pn216) con anhídrido glutárico en DMF. El compuesto 6 se preparó mediante reacción del compuesto 1 (Pn216) con anhídrido benzoico en acetonitrilo, en presencia de trietilamina.

Ejemplo 4

15 Radiomarcado con Tc-99m del compuesto 3 [Ejemplo comparativo]

Se transfirió una alícuota de 0,1 ml del compuesto 3 disuelto en H₂O (1 mg/ml) a un vial de vidrio de 10 ml cargado con nitrógeno junto con solución salina desoxigenada (0,9% p/v, 1 ml) y 0,035 ml de NaOH acuoso (0,1 M). A esta disolución se le añadió eluato generador de tecnecio (1 ml, aprox. 0,4 GBq) y luego disolución acuosa de cloruro estannoso (0,1 ml, aproximadamente 10 μ g). El pH del marcado fue 9,0-10,0. Se incubaron los viales a la temperatura ambiente del laboratorio (15-25°C) durante 30 minutos para efectuar el marcado. Se diluyó la preparación resultante hasta la concentración radioactiva deseada o bien se realizó una purificación mediante HPLC (sistema B) para eliminar el material de partida no marcado y las impurezas radioactivas antes de las pruebas. Tras la purificación se eliminó el disolvente orgánico a vacío y se redisolvió la muestra en aproximadamente 5 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 proporcionando una concentración de trabajo de 6-9 MBq/ml. Se evaluó la pureza radioquímica antes de su uso mediante el sistema de cromatografía de capa fina (CCF) descrito a continuación:

- 30 i) ITLC SG 2 cm x 20 cm eluido con solución salina al 0,9% p/v
- ii) Whatman N° 1 2 cm x 20 cm eluido con acetonitrilo:H₂O 50:50 v/v

Los sustratos marcados permanecen en, o cerca de, el origen en el sistema de CCF (i) y se desplazan cerca del frente de disolvente en el sistema (ii).

Ejemplo 5

40 Sistemas de HPLC

Velocidad de flujo: 1 ml/min. en todos los sistemas, y TFA = ácido trifluoroacético.

45 Sistema A

Columna	Waters C18 250x4,5 mm. Tamaño de partícula 4 micrómetros
Gradiente:	Perfil de elución 10-60% de B en 25 min.
50 Eluyente A:	TFA acuoso al 0,1%
Eluyente B:	TFA al 0,1% en acetonitrilo.

55 Sistema B

Columna	Waters Novapak C18 150x3,9 mm. Tamaño de partícula 4 micrómetros
60 Gradiente:	Perfil de elución 0-100% de B en 22 min.
Eluyente A:	TFA acuoso al 0,1%
Eluyente B:	TFA al 0,1% en acetonitrilo.

ES 2 309 361 T3

Sistema H

Columna Phenomenex C18 (2) Luna 25x0,46 cm, 5 μ m

5 Gradiente: Perfil de elución 16-40% de B desde 0 min. hasta 20 min., 40-90% de B desde 20-22 min., 90% de B 22-30 min., luego 90-16% de B desde 30-31 min. La columna se reequilibra entonces en el 16% de B durante 14 minutos.

10 Eluyente A: TFA al 0,05% en agua

Eluyente B: TFA al 0,04% en acetonitrilo.

Sistema J

15 Columna Phenomenex C18 (2) Luna 25x4,6 cm, 5 μ m

Gradiente: Perfil de elución 16-40% de B desde 0 min. hasta 20 min. La columna se reequilibra en el 16% de B durante 8 minutos.

20 Eluyente A: TFA al 0,05% en agua

Eluyente B: TFA al 0,05% en acetonitrilo.

25 El análisis mediante el sistema J de HPLC (ejemplo 5) de un kit liofilizado reconstituido (lote 58, ejemplo 6) mostró una RCP del 94% usando el sistema J (técnica anterior), pero una RCP del 90% usando el sistema H (presente invención) (véase la figura 3).

Ejemplo 6

Preparación de kits liofilizados

35 Se colocó aproximadamente el 90% del volumen total de agua para inyección (WFI) en el vaso de preparación y se desoxigenó mediante purgado de nitrógeno. Se añadieron ácido metilenodifosfónico, cloruro estannoso dihidratado, compuesto 3 (como la sal acetato), acetato de sodio trihidratado y ácido p-aminobenzoico, sal de sodio permitiéndose a su vez que cada uno se disolviera mientras se continuaba el purgado de nitrógeno. Se substituyó el purgado de nitrógeno de la disolución por un flujo de nitrógeno sobre el espacio de cabeza de la disolución. Entonces se añadieron hidrogenocarbonato de sodio y carbonato de sodio anhidro, o hidrogenocarbonato de sodio solo, y se dejaron disolver.

40 Entonces se ajustó la disolución en masa hasta el 100% del volumen final (~5 litros) con WFI desoxigenada. Entonces se filtró el grueso de la disolución a través de un filtro de 0,2 μ m estéril hacia el vaso de carga. Se purgó el espacio de cabeza del vaso de carga con argón o nitrógeno filtrado estéril (0,2 μ m) durante la duración de la operación de carga. Se dispensaron alícuotas de 1,0 ml de manera aséptica en los viales. Se semitaparon los viales con los cierres A, B o C

45 y se transfirieron a los estantes del liofilizador enfriado previamente. Entonces se liofilizaron los viales, se rellenaron con gas nitrógeno filtrado estéril (0,2 μ m), se taparon y se sellaron.

TABLA 2

Formulaciones de kit

Lote	Comp. 3 (μ g)	SnCl ₂ (μ g)	MDP (μ g)	NaHCO ₃ (μ g)	Na ₂ CO ₃ (μ g)	NaOAc. 3H ₂ O (μ g)	Na-pABA (μ g)	Cierre
33*	50	10	0**	2520	350	0	0	A
58	50	30	90	2520	350	0	0	A
63	50	30	90	5040	700	0	0	A
65	50	30	90	2520	350	4150	0	A
70	100	30	90	1260	175	6600	0	A

Lote	Comp. 3 (μg)	SnCl_2 (μg)	MDP (μg)	NaHCO_3 (μg)	Na_2CO_3 (μg)	NaOAc. $3\text{H}_2\text{O}$ (μg)	Na-pABA (μg)	Cierre
86	100	30	90	1260	175	6600	200	B
87	100	30	90	1260	175	6600	0	B
88	100	30***	90	1260	175	6600	0	A
94	100	30***	90	1260	175	6600	50	B
98	100	30***	90	1320	98	6600	50	A
82/4	100	30***	90	1320	98	6600	50	A
82/6	100	30***	90	3300	0	530	200	C

En la que cierre A = PH701/45 AS rojo-marrón; cierre B = 4023/50 1083 gris; C = 4432/50 1178 gris.

* el lote 33 contenía 2 mg de NaCl como carga,

** el lote 33 contenía 25 μg de tratado de Na dihidratado como transquelante,

*** los lotes 86, 87, 88, 94, 98 y la formulación 82/4 usaron 36 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ equivalentes a 30 μg de SnCl_2 anhidro

Ejemplo 7

Preparación de complejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a partir de kits liofilizados

Se reconstituyeron los kits liofilizados del ejemplo 6 con pertecnetato de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (2-8 ml de eluato generador de tecnecio; 0,5-2,5 GBq). Se calentó la disolución en un baño de agua a 60°C durante 10 minutos y entonces se dejó reposar a temperatura ambiente. Se determinó la pureza radioquímica mediante el procedimiento de HPLC descrito en el sistema H del ejemplo 5 (véase la figura 2) y se determinó la RHT mediante el procedimiento de ITLC descrito a continuación:

ITLC SG 2 cm x 20 cm eluido con una disolución de metanol:acetato de amonio 50:50 (v/v) (1 M). Las especies radiomarcadas a base de ligando se desplazaron hacia el frente del disolvente. RHT se mantiene en el origen.

Se analizaron las disoluciones mediante el sistema H de HPLC y los resultados se facilitan en la tabla 3 a continuación, en la que el % de RCP es la pureza radioquímica del complejo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ termodinámico.

TABLA 3

Análisis de HPLC de complejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Lote	% de RCP	% $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -lipófilos
33*	80	7
58	88 - 92	3 - 5
63	70 - 85†	6 - 11
65	78 - 91†	1,0 - 1,5
70	80 - 95†	1,0 - 1,5
88	90 - 94	1,0 - 2,0
† se cree que la RCP variable se debe a variaciones en el calentamiento.		

Ejemplo 8

Efecto de la molécula de direccionamiento sobre el contenido en complejo lipófilo de ^{99m}Tc

- 5 Se prepararon preparaciones de kit liofilizado según el ejemplo 6, para diversas moléculas (Z) de direccionamiento, usando la formulación del lote 63 (ejemplo 6). Los resultados se muestran en la tabla 4 para pruebas de tres viales del lote tras la reconstitución y el análisis como para el ejemplo 7:

TABLA 4

Efecto de Z sobre el contenido en complejo lipófilo de ^{99m}Tc

Lote	Compuesto	% de RCP	% ^{99m}Tc -lipófilos
183	3	89,0	5,8
		80,7	9,3
		79,5	10,2
178	4	86,4	4,6
		89,6	2,2
		84,7	3,4
180	5	84,3	0
		85,2	0,7
		84,8	0,5
182	6	94,5	0,2
		93,7	0,1
		93,7	0,2

Ejemplo 9

Efecto del radioprotector sobre preparaciones de complejo de ^{99m}Tc

Se estudió el efecto del radioprotector para-aminobenzoato de sodio (Na-PABA) sobre la pureza de las preparaciones de complejo de ^{99m}Tc en ambas preparaciones, en disolución y como kit liofilizado. Se prepararon todas las preparaciones en viales 10R con cierres 1083 4023/50 gris, hasta una concentración radioactiva final (RAC) de 0,5 GBq/ml. Se analizaron las preparaciones a diversos tiempos posteriores a la reconstitución (PR) usando el sistema H de HPLC, y los resultados proporcionados en la tabla 5 como porcentajes de la composición radioactiva.

ES 2 309 361 T3

TABLA 5

Análisis de marcado para preparaciones que contienen PABA

Lote	Na pABA (µg/vial)	Tiempo PR (min.)	Especies de complejo de ^{99m} Tc (%)							
			RHT	^{99m} TcO ₄ ⁻	Otros complejos hidrófilos	Kin	Pico previo	Td	Picos posteriores	Lp
	0	30	0,7	0	0,6	11,1	1,8	86,1	0	0,1
87	0	240	0,7	3,5	0,6	4,4	2,1	88,9	0,6	0
	0	480	0,4	7,1	0,7	2,6	2,3	86,5	0,7	0
87 + pABA	25	30	0,5	0,1	0,5	1,9	2,1	93,1	1,8	0
	25	330	0,6	1,6	0,6	1,3	2,2	93,8	0,3	0
93	25	30	0,6	0	0,5	4,3	2,1	92,4	0,3	0,2
	25	300	0,5	1,3	0,5	2,9	2,2	92,2	0,6	0
	25	480	np	4,6	0,7	3	3,1	87,2	0,7	0,1
87 + pABA	50	30	0,8	0	0,4	1,7	2,2	92,3	3,1	0
	50	240	1	0	0,5	0,7	1,8	94,7	2,3	0
	50	480	0,6	0,7	0,5	1,3	2	93,2	2,4	0
94	50	30	0,7	0	0,8	1,6	2,1	95,2	0,2	0,1
	50	300	0,6	0,9	0,4	1,1	1,9	95,1	0,4	0
	50	480	np	1,9	0,9	2,5	1,9	91	0,8	0,2
87 + pABA	100	30	np	0,1	0,8	0,5	1,9	93,2	3,4	0
	100	300	0,7	0	0,4	0,3	2	95,2	2	0
	100	480	0,7	0,7	0,6	0,3	2	94	2,1	0
86	200	30	0,6	0,2	0,3	0,4	2,1	96	0,2	0,6
	200	240	0,9	0	0,5	0,2	2,1	93,3	2,9	0,7
	200	480	0,8	0,6	0,5	0,3	1,8	96,5	0	0,3
Np = análisis no realizado, Td = producto termodinámico (pico principal), Kin = complejos cinéticos, Lp = complejos lipófilos.										

Ejemplo 10

Efecto de los cierres sobre RCP y complejos lipófilos de ^{99m}Tc

Se estudió el efecto del cierre del vial sobre el radiomarcado para diversas formulaciones de kit liofilizado. Los kits liofilizados producidos usando dos cierres de caucho diferentes (West Pharmaceutical Services) se reconstituyeron según el procedimiento expuesto en el ejemplo 7. Se observaron diferencias en RCP e impurezas radiomarcadas (véase la tabla 6, que muestra el promedio de 10 determinaciones de 10):

TABLA 6

Efecto del cierre sobre RCP y complejos lipófilos de ^{99m}Tc

Lote	Formulación	Cierre	% de RCP (media de 10)	% de complejos lipófilos de ^{99m}Tc
87*	82/1	4023/50 gris	86,8	0,1
94	82/2	4023/50 gris	93,9	0,1
88*	82/1	PH701/45AS rojo-marrón	92,3	1,3
98	82/2	PH701/45AS rojo-marrón	93,8	1,4
* Calentado a 90°C durante 10 minutos en un bloque calefactor.				

Ejemplo 11

Efecto del contenido en complejo de tecnecio lipófilo sobre la biodistribución

Se llevaron a cabo experimentos en ratas Wistar macho normales (peso corporal 150-250 g) y se realizaron disecciones a 1 hora tras la inyección intravenosa de preparaciones de ^{99m}Tc -compuesto 3. Las últimas se prepararon a partir de una formulación de kit liofilizado, descrita como lote n° 58 (véase el ejemplo 6 para detalles), y no se calentaron o bien se calentaron durante diferentes tiempos a 90°C y se enfriaron hasta temperatura ambiente antes de la administración. El análisis de HPLC usando el sistema H (ejemplo 5) confirmó los diferentes niveles de impurezas lipófilas mostradas en la tabla 6 (a continuación). Se calcularon los datos de biodistribución para cada órgano/tejido de preparación, se notificaron los datos para cada animal individual y la media y desviación estándar del grupo de tres. Se aplicó una prueba de análisis de varianza de un único factor/de una sola vía (ANOVA) o una prueba t de Student de 2 colas, desapareada (2 muestras, varianza distinta) a estos datos usando un paquete de hoja de cálculo SR-2 de Microsoft Excel 97. Los resultados se consideraron significativamente diferentes si el valor p era inferior a 0,05. Los resultados se proporcionan en la tabla 7:

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 309 361 T3

TABLA 7

% Medio de dosis inyectada (con desviaciones estándar) para preparaciones calentadas durante diversos periodos de tiempo (0-45 min. a 90°C)

Preparación (lote nº 58)	Sin calor (13008)		10 min. (13009)		45 min. (13025)	
Contenido lipófilo	3,1%		5,4%		7,8%	
Órgano	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Peso del animal	204,05	9,16	212,02	5,03	201,72	3,10
Hueso	2,40	0,18	0,89	0,20	0,95	0,07
Músculo	2,71	0,32	2,87	0,61	3,62	0,99
Sangre	1,88	0,15	2,79	0,45	3,26	0,29
Riñones	19,59	3,19	18,96	0,93	18,39	1,02
Vejiga y orina	63,07	4,07	58,22	4,57	51,04	8,20
Pulmón	0,16	0,02	0,17	0,02	0,21	0,06
Hígado	2,24	0,09	6,35	0,34	10,24	0,54
Bazo	0,07	0,01	0,15	0,02	0,26	0,07
Estómago	0,17	0,06	0,35	0,33	0,46	0,16
ID, IG y heces	2,64	1,16	4,04	1,47	6,15	2,95
Corazón	0,04	0,00	0,05	0,01	0,06	0,01
Tiroide	0,02	0,00	0,03	0,01	0,02	0,00
Canal	5,00	0,96	5,12	2,04	5,34	2,51
Sitio de inyección	1,01	0,40	0,86	0,46	0,59	0,01

Ejemplo 12

Efecto de la sal de ácido débil sobre la biodistribución y el contenido en complejo de tecnecio lipófilo

Se evaluaron los cambios en la biodistribución producidos por la adición de acetato de sodio trihidratado a la formulación mediante la comparación de los lotes de kit liofilizados números 58 y 65. Entonces se llevaron a cabo estudios de biodistribución y reconstitución de kits tal como para el ejemplo 10. Se analizaron estos datos mediante el uso de una prueba t de Student de 2 colas, desapareada. Hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) en la retención sanguínea de radioactividad (del 2,95% al 2,12%) y también una disminución significativa en la radioactividad asociada al hígado ($p < 0,05$) desde el 6,10% hasta el 2,82%.

ES 2 309 361 T3

TABLA 8

% Medio de dosis inyectada (con desviaciones estándar) para formulaciones con o sin acetato de sodio trihidratado

Nº de lote (Preparación)	58 (15093)		65 (15160)	
Formulación	Sin acetato		Con acetato	
Contenido lipófilo	3,1%		1,0%	
Órgano	Media	D.E.	Media	D.E.
Peso del animal	179,28	4,86	163,72	12,31
Hueso	0,98	0,03	0,70	0,02
Músculo	2,87	0,03	2,90	0,17
Sangre	2,95	0,08	2,12	0,02
Riñones	18,52	0,71	21,37	1,00
Vejiga y orina	61,66	0,85	61,23	2,43
Pulmón	0,23	0,01	0,16	0,04
Hígado	6,10	0,38	2,82	0,09
Bazo	0,16	0,01	0,07	0,00
Estómago	0,15	0,04	0,39	0,40
ID, IG y heces	2,48	0,43	3,27	1,50
Corazón	0,06	0,00	0,06	0,01
Tiroide	0,03	0,00	0,03	0,01
Canal	3,81	0,26	4,90	0,26
Sitio de inyección	0,73	0,02	0,82	0,12

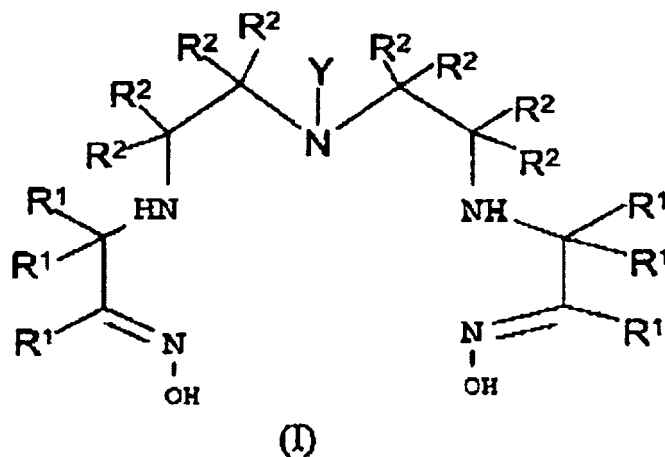
Ejemplo 13

Comparación de la captación de coágulo en un modelo de rata de tromboembolia venosa

Se estudiaron preparaciones con variaciones conocidas en complejos de ^{99m}Tc lipófilos (lotes 58 y 65, véase el ejemplo 7). Por tanto, se anestesiaron las ratas (Wistar macho, 250-350 g) con uretano al 15%. Tras la laparotomía, se aisló la vena cava y se le retiró el tejido graso circundante. Se insertó un cable de platino (1,5 cm x 0,5 mm) en la vena cava inferior y 5 minutos más tarde se inyectaron 0,4 ml de ácido elágico ($1,2 \times 10^{-4}$ M) por vía intravenosa a través de la vena femoral para iniciar la formación de coágulo. 60 minutos más tarde se inyectaron 0,1 ml (50 MBq por animal) de los lotes 58 o bien 65 (preparados tal como para el ejemplo 7) a través de la misma vena y tras 60 minutos más se sacrificaron los animales y se extrajo el coágulo, se pesó y se contó. También se diseccionaron y contaron otros tejidos, por ejemplo, sangre, pulmón, corazón. La captación del trazador en el coágulo se determinó como la concentración relativa (cpm/g de coágulo por dosis/g de animal) y coágulo a tejido de fondo. El peso promedio de los coágulos formados en este modelo era de aproximadamente 27 mg, n=32, (intervalo de 5-50 mg). La concentración relativa de radioactividad en el coágulo fue de 8,01 (n=4, DE=3,33) para el lote 58 y 7,49 (n=4, DE=1,84) para el lote 65.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una composición de complejo de tecnecio que comprende un complejo metálico del radioisótopo ^xTc con un ligando de fórmula (I):



en la que:

cada R^1 y R^2 es independientemente un grupo R;

x es 94m, 99 o 99m;

Y es $(A)_n-Z$

en el que:

Z es un resto de direccionamiento biológico de peso molecular inferior a 5.000;

$-(A)_n-$ es un grupo conector en el que cada A es independientemente $-\text{CO}-$, $-\text{CR}_2-$, $-\text{CR}=\text{CR}-$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{CR}_2\text{CO}_2-$, $-\text{CO}_2\text{CR}_2-$, $-\text{NR}-\text{NRCO}-$, $-\text{CONR}-$, $-\text{NR}(\text{C}=\text{O})\text{NR}-$, $-\text{NR}(\text{C}=\text{S})\text{NR}-$, $-\text{SO}_2\text{NR}-$, $-\text{NRSO}_2-$, $-\text{CR}_2\text{OCR}_2-$, $-\text{CR}_2\text{SCR}_2-$, $-\text{CR}_2\text{NR}\text{CR}_2-$, un grupo cicloheteroalquileo C_{4-8} , un grupo cicloalquileo C_{4-8} , un grupo arileno C_{5-12} , o un grupo heteroarileno C_{3-12} o un resto de polialquilenglicol, poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico);

n es un número entero de valor 0 a 10;

cada grupo R es independientemente H o alquilo C_{1-10} , alquilarilo C_{3-10} , alcoxialquilo C_{2-10} , hidroxialquilo C_{1-10} , fluoroalquilo C_{1-10} , o 2 o más grupos R, junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo carbocíclico, heterocíclico, saturado o insaturado;

en el que:

- (i) menos del 10% del ^xTc presente en la composición de complejo de tecnecio comprende complejos de ^xTc transitorios del ligando de fórmula I; y
- (ii) menos del 5% del ^xTc presente en la composición de complejo de tecnecio comprende complejos de ^xTc lipófilos del ligando de fórmula I;

en el que dicho procedimiento comprende la reacción del ligando de fórmula (I) con el radioisótopo ^xTc en un disolvente adecuado, con calentamiento a un intervalo de temperatura de 50°C a 80°C durante 10 minutos a 20 minutos en presencia de:

- (a) un agente reductor;
- (b) un ácido orgánico débil que tiene un pKa en el intervalo de 3 a 7, o una sal del mismo con un catión biocompatible;
- (c) un radioprotector.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que menos del 5% del ^{99m}Tc presente en la composición de complejo de tecnecio comprende complejos de ^{99m}Tc transitorios del ligando de fórmula I.

3. El procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que menos del 3% del ^{99m}Tc presente en la composición de complejo de tecnecio comprende complejos de ^{99m}Tc lipófilos del ligando de fórmula I.

4. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que x es 99m.

5. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, en el que Z es un péptido de 3 a 20 aminoácidos.

6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que el péptido de 3 a 20 aminoácidos es un fragmento de α_2 -antiplasmina.

7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el fragmento de α_2 -antiplasmina comprende el tetrapéptido Asn-Gln-Glu-Gln.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que el fragmento de α_2 -antiplasmina comprende el péptido:

Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Xaa-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly.

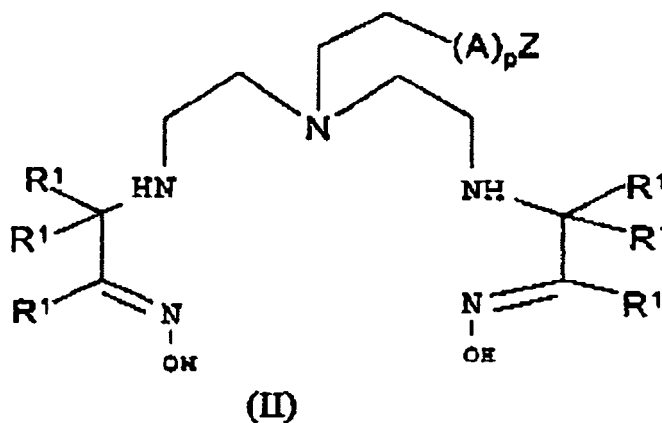
en el que Xaa es Tyr o I-Tyr.

9. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, en el que Y es

-CH₂CH₂-NR-(A)_m-Z, en el que m es un número entero de valor 0 a 5.

10. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, en el que cada R¹ es independientemente alquilo C₁₋₃, alcoxialquilo C₂₋₄, hidroxialquilo C₁₋₃ o fluoroalquilo C₁₋₃.

11. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, en el que el ligando es de fórmula (II):



en la que:

cada R¹ es independientemente alquilo C₁₋₃ o fluoroalquilo C₁₋₃; y

p es un número entero de valor 0 a 3.

12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que (A)_n es -CO- o NR-.

13. El procedimiento según las reivindicaciones 11 y 12, en el que cada R¹ es CH₃ y (A)_p es NH y Z es Ac-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Xaa-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly-, en el que Xaa es Tyr o I-Tyr, y Ac es N-acetilo.

14. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el radioprotector es el ácido para-aminobenzoico o una sal biocompatible del mismo.

ES 2 309 361 T3

15. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 14, en el que la composición de complejo de tecnecio es un producto radiofarmacéutico en una forma adecuada para la administración a mamíferos.

16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que:

- (i) el ligando de fórmula (I) según la reivindicación 1;
- (ii) el agente reductor biocompatible,
- (iii) el ácido orgánico débil que tiene un pKa en el intervalo de 3 a 7 o una sal del mismo con un catión biocompatible;
- (iv) el radioprotector;

se proporcionan como un kit.

17. El procedimiento según la reivindicación 16, en el que el ligando del kit es tal como se define en las reivindicaciones 5 a 10.

18. El procedimiento según la reivindicación 17, en el que el ligando es de fórmula II tal como se define en las reivindicaciones 11 a 13.

19. El procedimiento según las reivindicaciones 16 a 18, en el que el kit comprende además un agente de ajuste del pH.

20. El procedimiento según las reivindicaciones 16 a 19, en el que el agente reductor biocompatible del kit comprende estaño (II).

21. El procedimiento según las reivindicaciones 16 a 20, en el que el ácido orgánico débil del kit es ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido glucoheptónico, ácido benzoico, un fenol o un ácido fosfónico.

22. El procedimiento según la reivindicación 16, en el que el radioprotector comprende ácido para-aminobenzoico o una sal biocompatible del mismo.

23. El procedimiento según las reivindicaciones 16 a 22, en el que el kit está liofilizado.

24. El procedimiento según las reivindicaciones 16 a 23, en el que el kit comprende:

- (i) el ligando de fórmula II según la reivindicación 11;
- (ii) un agente reductor biocompatible que comprende estaño (II);
- (iii) un ácido orgánico débil o sal del mismo con un catión biocompatible que comprende ácido metilendifosfónico;
- (iv) un radioprotector que comprende ácido para-aminobenzoico o una sal biocompatible del mismo;
- (v) un agente de ajuste del pH que comprende bicarbonato de sodio.

Figura 1: Porcentaje de especies lipófilas de ^{99m}Tc frente al % de D.I. en el hígado.

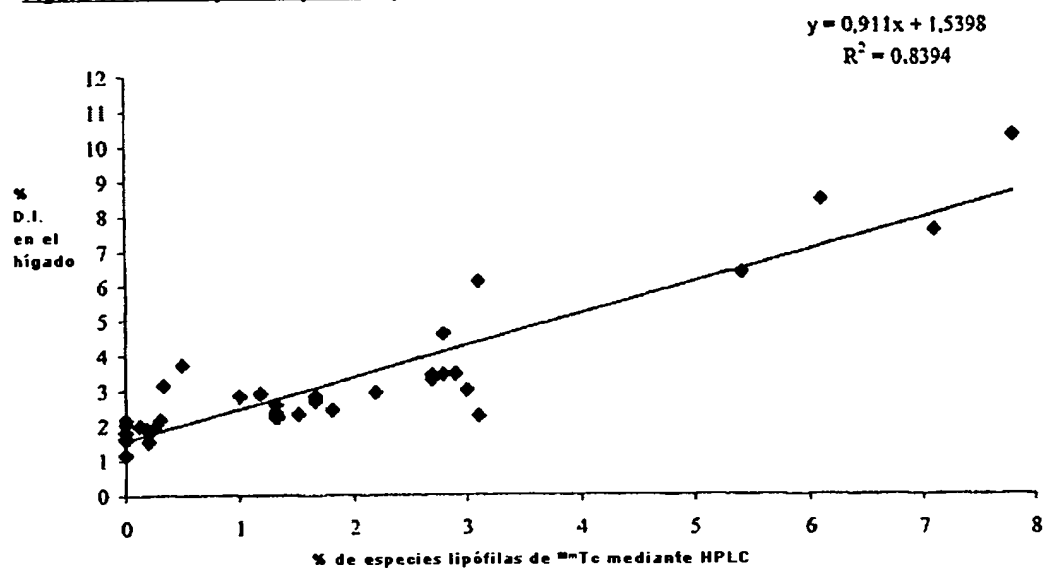


Figura 2: Perfil de HPLC (sistema H) de preparación de complejo de ^{99m}Tc de aza-diaminadioxima (formulación 82/4).

Fig 2A (escala completa)

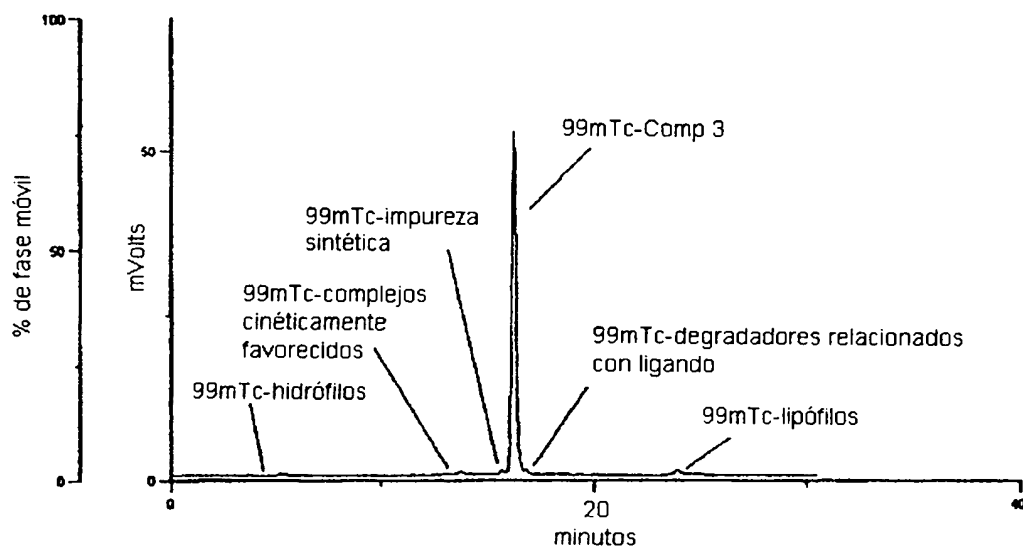


Fig. 2B (escala ampliada)

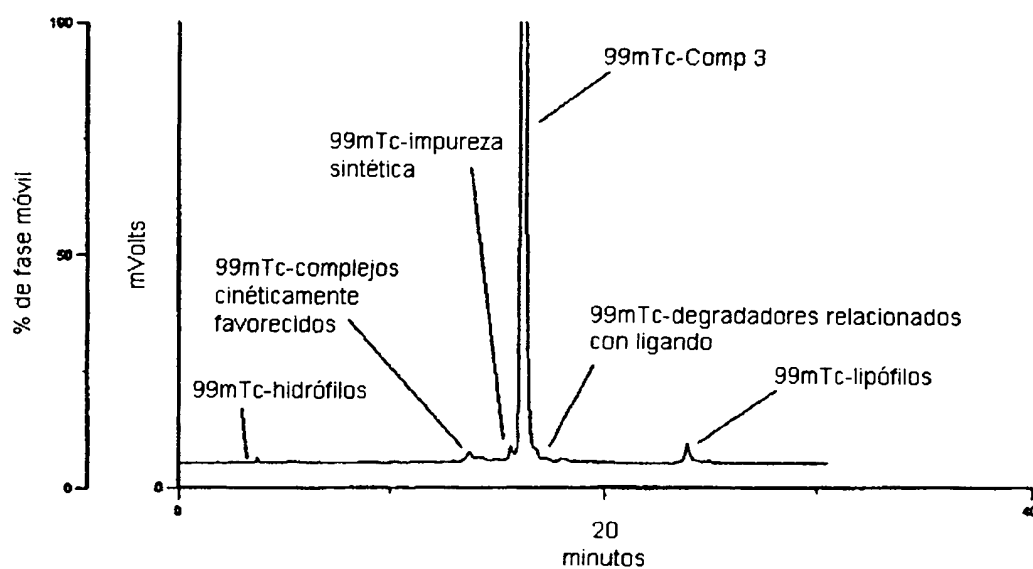


Figura 3: Comparación de los sistemas H y J de HPLC para el análisis del compuesto 3 marcado con ^{99m}Tc , lote 58).

Fig. 3A (Sistema J)

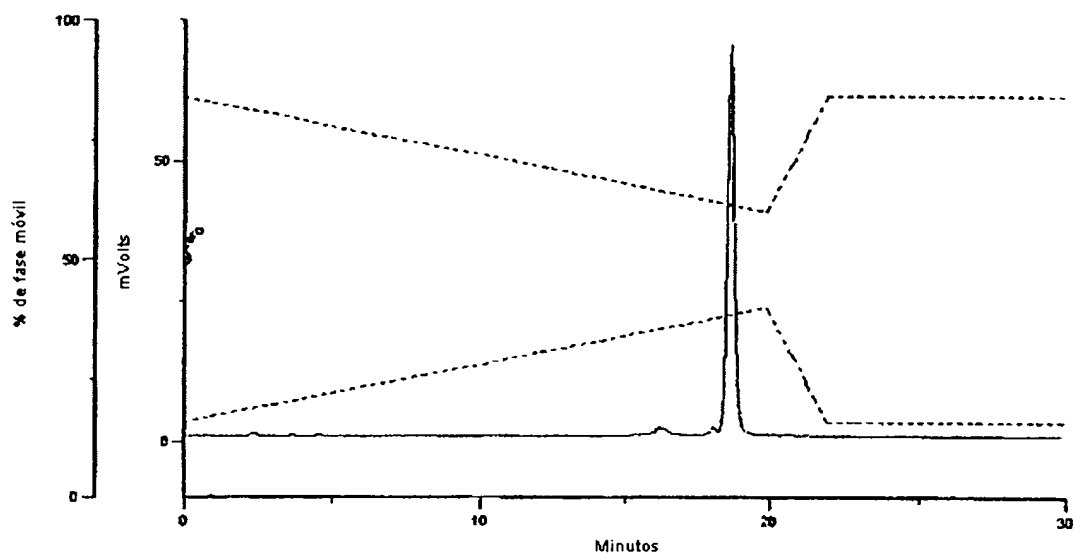


Fig. 3B (Sistema H)

