



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 745**

51 Int. Cl.:  
**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05817391 .5**

96 Fecha de presentación : **21.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1814598**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54 Título: **Agentes de contraste para señalar matriz extracelular.**

30 Prioridad: **22.11.2004 NO 20045081**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.05.2011**

73 Titular/es: **GE HEALTHCARE AS.**  
**Intellectual Property Dept. P.O. Box 4220**  
**Nydalen Nycoveien 1-2**  
**0401 Oslo, NO**

72 Inventor/es: **Løvhaug, Dagfinn;**  
**Eriksen, Morten;**  
**Fjerdingsstad, Hege B. y**  
**Healey, Andrew**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 745 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

Agentes de contraste para señalar matriz extracelular

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevos agentes de contraste y su uso en técnicas de imágenes diagnósticas. Más específicamente la invención se refiere a agentes de contraste que comprenden vectores de localización que se unen a áreas de formación de colágeno y matriz extracelular, ECM. Dichos agentes de contraste pueden utilizarse para la localización de fibrosis activa (deposición de colágeno) y el diagnóstico de un número de condiciones de enfermedad como por ejemplo insuficiencia cardíaca, fibrosis de hígado y pulmón, fibrosis retroperitoneal, aterosclerosis, artritis, cáncer y trastornos de piel. Además dicho agente de contraste puede  
10 utilizarse para mostrar afecciones inflamatorias de cicatrización crónica, tejido cicatrizante y adherencias, investigación de tamaño de infarto, mostrar infartos tempranos y diagnóstico de insuficiencia cardíaca congestiva.

**Antecedentes de la invención**

15 Los colágenos son las proteínas más abundantes en el reino animal. Actualmente se conocen veinticinco tipos diferentes. La unidad estructural básica es una triple hélice; en el colágeno I, la hélice consiste en tres polipéptidos, en el que cada uno contiene 1050 aminoácidos. Las fibrilas de colágeno se forman por interacciones laterales entre las triple hélices. Algunos colágenos, notablemente el colágeno IV, forman hojas de dos dimensiones.

Las secuencias de aminoácidos de moléculas de colágeno son altamente repetitivas, y esta regularidad se refleja en la estructura de las fibrilas de colágeno. La secuencia de aminoácidos del colágeno I contiene aproximadamente 20 copias de un motivo de 18 aminoácidos en el que cada tercer aminoácido es una glicina.

20 Los diversos colágenos son producidos por fibroblastos y algunas células epiteliales. La transcripción original es un polipéptido pro-colágeno que contiene secuencias de señales para la exportación desde las células y también un pro-péptido que evita la asociación para formar triple hélices. Aproximadamente el 50 % de los residuos de prolina y 15-20 % de las lisinas en las cadenas de pro-colágeno son sometidos a procesamiento intracelular para formar hidroxiprolina e hidroxilisina. Estas modificaciones son esenciales para las propiedades mecánicas del colágeno.  
25 Afuera de la célula, los pro-péptidos son escindidos, comenzando el procedimiento de autoensamblaje.

Los colágenos son componentes esenciales de estructuras tales como huesos y tendones y también de matriz extracelular en general. Por ejemplo, el colágeno IV forma la red básica de las membranas basales a las que las células endoteliales y epiteliales se unen. Parte de la diversidad de los colágenos es explicada por los diferentes tipos de colágeno, pero también existe una gran variedad de moléculas asociadas al colágeno. Las fibras de colágeno usualmente están asociadas a proteoglicanos. Estas proteínas, que consisten en un polipéptido principal y una o más cadenas laterales de glucosaminoglicanos, también son una clase muy diversa. En la membrana basal, la laminina y la entactina (nidogeno) son componentes importantes. Las fibulinas son una clase de proteínas con sitios de unión para varias proteínas de la membrana basal. La undulina es una proteína formadora de fibras que se encuentra en asociación con el colágeno en bajas cantidades en el hígado normal, y en altas cantidades en el hígado fibrótico.  
30  
35

El colágeno y otras proteínas en el tejido conectivo contienen la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp, que confiere unión a la clase integrina de la molécula de adhesión a la célula. Otras secuencias de aminoácidos también pueden constituir el motivo de unión principal, y otras partes del ligando contribuyen a la afinidad así como especificidad. Las integrinas  $\beta 1$  son importantes en la unión al colágeno. Otras proteínas de unión al colágeno incluyen los receptores de dominio discoidina, que responden al colágeno mediante la activación de una tirosina quinasa.  
40

Las fibras de colágeno son lateralmente flexibles, pero ni elásticas ni comprimibles. Las propiedades elásticas del tejido conectivo están contribuidas por la proteína elastina y sus proteínas asociadas oxitalán y elaunina. Las fibrilinas 1 y 2 son otras proteínas que forman fibras elásticas en asociación con la elastina y otro componente estructural, glicoproteína asociada a la microfibrila. Las fibras elásticas anormales se encuentran en áreas de fibrosis hepática.  
45

La deposición de colágeno es un procedimiento común en la cicatrización de una lesión, llevando a la formación de "tejido cicatrizante" familiar. La deposición de colágeno es un procedimiento que disminuye la funcionalidad del tejido. Esto es evidente donde la elasticidad del tejido es importante, siendo un ejemplo saliente el tejido cicatrizante que se forma durante la cicatrización de un infarto del miocardio. En el hígado, los efectos de fibras rígidas son menos evidentes. Parte del procedimiento de fibrosis de hígado es la deposición del material de matriz extracelular en el espacio entre los hepatocitos y el endotelio fenestrado de sinusoides hepáticos, coincidente con la transformación de sinusoides en capilares que poseen una membrana basal ordinaria. Esta transformación disminuye la funcionalidad del hígado impidiendo la transferencia de solutos entre la sangre y los hepatocitos.  
50

- La fibrosis hepática comienza con lesión que causa el daño o muerte de las células hepáticas. La lesión inicia una respuesta inflamatoria. La liberación de citoquinas, factores quimiotácticos y fragmentos de proteínas de matriz ECM (colágeno y fibronectina) causa la activación de las células hepáticas y reclutamiento de células inflamatorias, tales como granulocitos. La inflamación, incluyendo el estrés oxidante, es el factor común de la mayoría de las causas de fibrosis hepática. Un importante evento es la activación de células estrelladas (también conocidas como células de almacenamiento de grasa o células Ito). La función más conocida de estas células en el hígado normal es almacenar la vitamina A. En la activación, las mismas pierden su vitamina A y se diferencian en miofibroblastos. Estas células son las células productoras de colágeno.
- Los agentes causales de fibrosis hepática son numerosos: alcohol, virus de hepatitis, colangitis, hemacromatosis, enfermedad de Wilson y esquizostomiasis. En animales experimentales (usualmente ratas), la fibrosis puede ser inducida por tetracloruro de carbono o tioacetamida. La mayoría de estos agentes producen patrones definidos de lesión hepática, incluyendo deposición de colágeno. El rol de la respuesta inflamatoria es variable; en algunas condiciones, por ejemplo hemocromatosis, el estrés oxidante es importante.
- Si la lesión es limitada en grado y tiempo, la fibrosis resultante es reversible. En el hígado, el estrés prolongado puede llevar a cirrosis, caracterizada por daño general, formación de nódulos de regeneración, y fibrosis que distorsiona la arquitectura del hígado. En las ratas, el colágeno Tipo I tiene una vida media de 30 días y el Tipo III posee una vida media de 15 días. Cuando la cirrosis es inducida por tetracloruro de carbono, las vidas medias de ambos colágenos se reduce en un 50%. Las cantidades de colágeno alcanzan niveles 5-10 veces más altos que los valores normales (pero nunca por encima de 30-35 mg/g).
- El punto de diagnóstico y tratamiento de la fibrosis hepática es la prevención de daño hepático irreversible y la consiguiente función reducida. El incremento en la cantidad y patrones alterados de deposición de colágeno indican la fibrosis hepática. Una biopsia positiva es considerada la respuesta definitiva. Las biopsias son procedimientos invasivos con una frecuencia de complicaciones significativas de 1-5 %. Las biopsias no guiadas únicas pasarán por alto la cirrosis en el 10-30 % de los casos. El diagnóstico correcto puede incrementar a 100% si se examinan tres muestras. Debido a que la incidencia de complicaciones se incrementa con el número de biopsias tomadas, parece que las triple biopsias pueden incrementar la incidencia de complicaciones en el orden del 10 %. Además, la evaluación de las biopsias está lejos de ser sencilla.
- Dentro de cualquier etapa de la enfermedad hepática, existe una variación de hasta cuatro veces en el área de fibrosis; además, hay una superposición sustancial en el área de fibrosis entre las diferentes etapas. En consecuencia, la cantidad de colágeno, según lo calculado por el análisis de imágenes asistido por computadora tiene poco valor en la decisión de la etapa de fibrosis. Los observadores experimentados que utilizan esquemas de niveles estandarizados proporcionan información confiable en la clasificación por etapas. En realidad, estos sistemas funcionan tan bien que hay poco incentivo en buscar marcadores histológicos adicionales más allá del colágeno. Sin embargo, la proteína tenascina de matriz ECM es depositada en lesiones tempranas y a menudo está ausente en el tejido cicatrizante maduro, mientras la vitronectina es un marcador de tejido fibroso maduro.
- Los marcadores serológicos para la fibrosis hepática que se utilizan hasta ahora puede dividirse en dos grupos: Marcadores para alteraciones en función hepática (recuento de plaquetas, trans-aminasas hepáticas) y marcadores para recambio de ECM. Estos últimos incluyen marcadores de deposición de colágeno (por ejemplo, pro-péptidos de colágeno en circulación) y/o degradación de colágeno (por ejemplo, fragmentos en circulación de colágeno IV). Una combinación de marcadores seleccionados cuidadosamente puede dar resultados mucho más precisos que los marcadores individuales, pero no existe acuerdo universal sobre este tema.
- Existe claramente una necesidad de un ensayo confiable que pueda diagnosticar fibrosis en las etapas tempranas, antes de que se produzca el daño irreversible. Una característica muy deseable de ensayos futuros es la capacidad de cuantificar cambios en el ECM.
- Según lo explicado más arriba, la deposición excesiva de colágeno reduce la elasticidad del tejido. Esto también incluye el tejido cicatrizante que se forma durante la cicatrización de un infarto del miocardio. Después de la lesión al corazón o el incremento persistente en el estrés en la pared cardíaca, el corazón intenta compensarse mediante la remodelación. Este procedimiento implica alteraciones progresivas en el tamaño y forma de las cámaras ventriculares, asociado con cambios en la composición del miocardio. Las respuestas típicas incluyen agrandamiento de los miocitos sobrevivientes y cambio en los tipos, reticulación y concentración de colágeno. Parece que inicialmente, la matriz extracelular es parcialmente degradada concurrente con la hipertrofia de miocitos cardíacos. Posteriormente, hay una fase compensatoria crónica a medida que la concentración de colágeno regresa al nivel normal. Pero si el corazón es incapaz de compensarse, la remodelación da como resultado una dilatación ventricular marcada a pesar de la fibrosis prominente. La etapa final de la insuficiencia cardíaca se caracteriza por otra remodelación de la matriz extracelular concurrente con desorganización de las miofibrilas y pérdida de miocitos. El colágeno continúa acumulándose, pero las fibrilas de colágeno se establecen en una manera irregular.

La fibrosis es un componente de más que 200 enfermedades pulmonares. La lesión repetida o estrés sostenido por ejemplo, inflamación y/o partículas inhaladas, son componentes comunes de la etiología, junto con factores genéticos que inclinan la balanza en la dirección de la deposición de tejido conectivo. Un ejemplo es la deficiencia del inhibidor de la  $\alpha_1$ -proteinasas, una proteína cuya actividad también puede reducirse como consecuencia del tabaquismo. Su función principal es inhibir la elastasa neutrófila. Como en la fibrosis de otros órganos, el desequilibrio entre la síntesis y la degradación puede iniciar procedimientos de reparación que realmente lesionan la función. Como en la fibrosis del corazón o del hígado, los miofibroblastos figuran prominentemente en la patología. Originalmente son reclutados como fibroblastos que posteriormente se diferencian. Parece que el "procedimiento de reparación" puede continuar en ausencia de inflamación perceptible, dando como resultado la pérdida progresiva de la función.

#### **Descripción de la técnica relevante**

El documento WO 89/10758 describe compuestos para la unión a la membrana superficial de biopartículas. Estos compuestos comprenden una sustancia bio-afectante y se selecciona al menos un sustituyente de hidrocarburo de manera que el compuesto sea suficientemente no polar para impartir la capacidad de unión del lípido al compuesto en el que la sustancia bio-afectante puede ser un colorante de cianina.

El documento WO 93/11120 describe compuestos que se unen al lípido que contiene partículas biocompatibles tales como células y virus. Estos compuestos se seleccionan de manera que los compuestos sean suficientemente no polares para impartir capacidad de unión del lípido al compuesto.

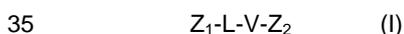
#### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona nuevos agentes de contraste útiles en el diagnóstico y monitoreo del tratamiento de enfermedades relacionadas a la formación excesiva de colágeno. Las enfermedades e indicaciones asociadas a la deposición excesiva de colágeno son por ejemplo insuficiencia cardíaca, fibrosis de pulmón e hígado, aterosclerosis, artritis y trastornos de la piel.

De ese modo, la presente invención proporciona agentes de contraste útiles en el diagnóstico de insuficiencia cardíaca y otras enfermedades que incluyen la deposición excesiva de colágeno tal como aquellas mencionadas más arriba, que comprenden un resto de localización que incorpora  $^{99m}\text{Tc}$  y un colorante de cianina que comprende 2 o más restos de ácido sulfónico.

La presente invención además proporciona procedimientos de imágenes de dichas enfermedades y también procedimientos de monitoreo del avance de tratamiento para dichas enfermedades. La invención también proporciona nuevas composiciones farmacéuticas y precursores para la preparación de agentes de contraste diagnósticos. Se proporcionan kits de agentes de contraste, en particular kits para la preparación de agentes de contraste radiofarmacéuticos.

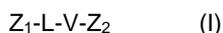
Los agentes de contraste de la invención están descritos por la fórmula general (I):



que a partir de ahora se describirá, con más detalle.

#### **Descripción detallada de la invención**

Vista desde un aspecto la invención proporciona agentes de contraste de fórmula (I) según lo que se define en las reivindicaciones. En el agente de contraste de la fórmula general (I):



$Z_1$  comprende  $^{99m}\text{Tc}$  y  $Z_2$  es un colorante de cianina, V es un resto de localización con afinidad de unión para áreas de formación de colágeno, L es un enlace covalente, un biomodificador o un resto conector.

$Z_1$  comprende un resto  $Y_1M$  en el que  $Y_1$  es un resto capaz de unirse a V o L (cuando están presentes) y al mismo tiempo transportar M en el que M es  $^{99m}\text{Tc}$ . Por transportar se quiere decir cualquier forma de asociación entre el

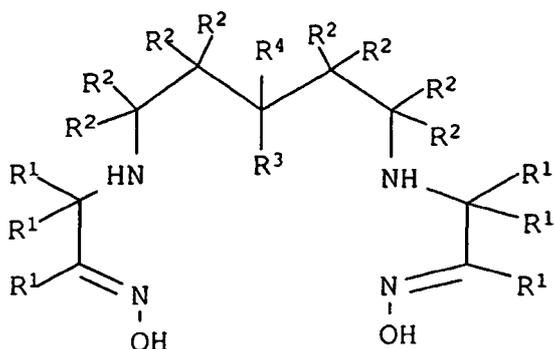
resto  $Y_1$  y  $M$  tal como un enlace químico, por ejemplo enlace covalente o enlaces electrovalentes o iónicos o por absorción o cualquier otro tipo de asociación.

$Y_1$  representa un agente quelante de fórmula (III).

5  $^{99m}\text{Tc}$  es útil en la modalidad de imágenes Radio y SPECT que posee baja o ninguna emisión beta y alfa y con una vida media de más de una hora.

Los agentes quelantes son bien conocidos desde el estado de la técnica y los ejemplos típicos de dichos agentes quelantes se describen en la Tabla I del documento WO 01/77145.

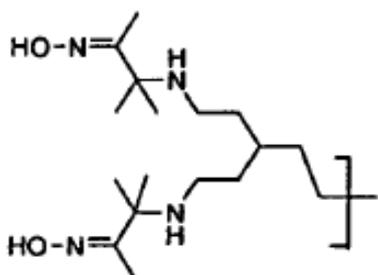
Uno de dichos agentes quelantes es de fórmula (II):



(II)

10 en la que cada  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  independientemente representan H, alquilo  $C_{1-10}$ , alquilarilo  $C_{3-10}$ , alcoialquilo  $C_{2-10}$ , hidroxialquilo  $C_{1-10}$ , alquilamina  $C_{1-10}$ , fluoroalquilo  $C_{1-10}$ , o 2 o más grupos R, junto con los átomos a los que se unen forman un anillo carboxílico, heterocíclico, saturado o insaturado.

El agente quelante Y, de la presente invención es un compuesto de fórmula (III), de aquí en adelante denominado cPN216.



15

Fórmula (III)

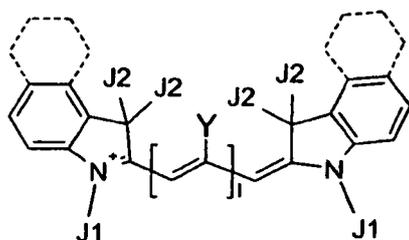
La síntesis de los agentes quelantes de fórmula (II) y (III) se describe en el documento WO 03/006070.

El resto  $Z_2$  de Fórmula (I) es un resto capaz de la detección directamente o indirectamente en un procedimiento de imágenes ópticas.

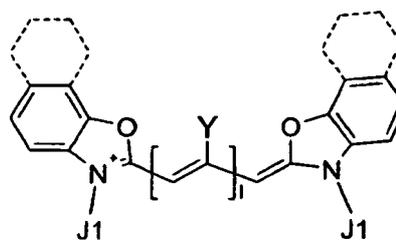
20 Los restos de imagen óptica de la presente invención son los colorantes de cianina (CyDye<sup>TM</sup>). Los colorantes de cianinas son compuestos definidos por una cadena de polieno que contiene un número impar de átomos de carbono unidos por enlaces carbono-carbono, únicos y múltiples alternantes, preferentemente dobles, terminados en cualquier extremo por un grupo amino, uno de los cuales es cuaternizado. La cianina y análogos cromóforos arilo-conector-arilo opcionalmente transportan sustituyentes de anillo pendientes o condensados. La descripción  
25 general de colorantes de cianina y síntesis de los mismos se describen en el documento US 6.048.982, US 5.268.486 y patente EP N° 1 037 947. Los colorantes de cianina son particularmente útiles debido al amplio intervalo de propiedades espectrales y variaciones estructurales disponibles. Un intervalo de colorantes de cianina son bien conocidos y ensayados, tienen baja toxicidad, y están comercialmente disponibles (GE Healthcare,

anteriormente Amersham Biosciences). Los colorantes de cianina son una única familia de colorantes altamente intensos con buena solubilidad acuosa. Son insensibles al pH entre pH 3-10, exhiben baja unión no específica, y son más fotoestables que la fluoresceína.

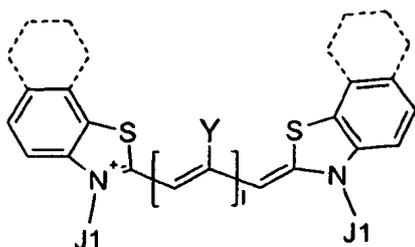
5 Los colorantes de cianina incluyen carbacianinas, oxacianinas, tiacianinas y azacianinas que se muestran más abajo mediante las fórmulas generales.



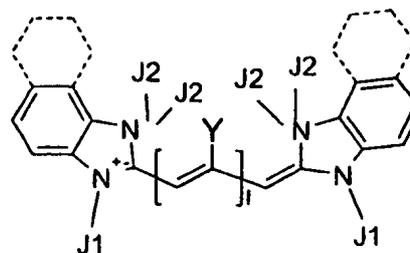
Fórmula VI: Carbacianinas



Fórmula VII: Oxacianinas



Fórmula VIII: Tiacianinas



Fórmula IX: Azacianinas

10 En estas estructuras los grupos J1 son iguales o diferentes y son grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, preferentemente alquilos C1 a C6, y pueden comprender un éter o un grupo -N-CO-N-. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos con grupos carboxi, ácido sulfónico, amina, amonio o éster. Los grupos J1 pueden formar puentes con cualquiera de los átomos de carbono de las cadenas de polieno, por ejemplo por un grupo -N-CO-N- o un grupo éter. Los grupos J2 son también iguales o diferentes y son grupos alquilo sustituidos o no sustituidos. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos con grupos carboxi o ácido sulfónico o grupos alquilo inferior, tales como alquilos

15 C1 a C6, tales como grupos metilo. Los grupos aromáticos opcionales están indicados por líneas de puntos, para abarcar ambas estructuras que comprenden anillos benzo condensados y anillos nafto condensados. Los anillos son sustituidos o no sustituidos. Los anillos pueden sustituirse con grupos ácido sulfónico, grupos carboxílico, grupos hidroxilo, grupos alquil(sulfoalquil)amino, grupos bis(sulfoalquil)amino, grupos sulfoalcoxi, grupo sulfoalquilsulfonilo, grupos alquilo o alquilo sustituido o sulfoalquilamino. Los grupos alquilo son preferentemente

20 alquilos inferiores con por ejemplo 1 a 6 átomos de carbono. Y se selecciona de hidrógeno, un grupo haluro, grupo amina o un sulfonilo, y es preferentemente hidrógeno. La cadena de polieno del colorante de cianina también puede contener uno o más grupos químicos cíclicos que forman puentes entre dos o más de los átomos de carbono de la cadena de polieno, por ejemplo mediante la inclusión de un grupo -CO- entre dos de los átomos de carbono de la cadena, como en los colorantes esquaraina, o mediante la inclusión de un puente alquilo. Estos puentes podrían servir para incrementar la química o fotoestabilidad del colorante.

25

En las fórmulas VI a IX, I es un número entero positivo 1, 2, 3 o 4 que proporciona trimetincianinas, que posee un puente de carbono de tres átomos de carbono, colorantes de cianina pentametina, heptametina o nonametina. Preferentemente, el colorante de cianina es un colorante con puentes de carbono de 3, 5 o 7 átomos de carbono, respectivamente.

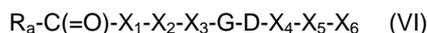
30 J1 y J2 son centros de unión potenciales para la unión del colorante al resto de localización V, opcionalmente a través de un resto conector L, siendo preferente J1. En un aspecto preferente un J1 está unido al resto de localización V, mientras el otro grupo R1 es un grupo alquilo C1 a C6 opcionalmente sustituido.

Otras descripciones de restos apropiados en los procedimientos de imágenes ópticas se encuentran en el documento WO 2005/003166.

5 El resto V del compuesto de fórmula (I) comprende la secuencia de aminoácidos X<sub>3</sub>-G-D que posee afinidad para las áreas de formación de colágeno. El compuesto comprende otros aminoácidos y otros restos opcionales, en los que la secuencia X<sub>3</sub>-G-D es el sitio de unión del vector peptídico que funciona como un vector que se une a un área de formación de colágeno.

10 El compuesto de fórmula (I) de la invención está limitado por la formación de uno o más puentes de ciclización en la parte del vector peptídico. Un compuesto de péptido monocíclico puede obtenerse por la formación de un enlace de disulfuro o un enlace tioéter entre los aminoácidos. Los compuestos de fórmula (I) comprenden dos puentes de ciclización entre diferentes aminoácidos de los compuestos. El término "puentes de ciclización" se refiere a cualquier combinación de aminoácidos o con aminoácidos y los grupos -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- con grupos funcionales que permite la introducción de un puente. n representa un número entero positivo de 1 a 10. Los ejemplos preferentes son disulfuros, miméticos de disulfuro tales como el puente -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-carba, puentes tioacetal, tioéter (cistationa o lantionina) y puentes que contienen ésteres y éteres. Un puente forma un enlace disulfuro y un  
15 segundo puente comprende un enlace tioéter (sulfuro).

El vector V de fórmula (I) está representado por la fórmula (VI)



20 y comprende dos puentes de ciclización,  
en los que,

X<sub>1</sub> representa un enlace covalente o 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos, en los que uno de los residuos de aminoácidos opcionalmente es funcionalizado con un resto conector L y preferentemente dichos residuos de aminoácidos poseen una cadena lateral funcional tal como un grupo ácido o amina preferentemente seleccionado de ácido aspártico o glutámico, lisina, ornitina, ácido diaminobutírico o ácido diaminopropiónico;  
25

X<sub>2</sub> y X<sub>4</sub> representan independientemente residuos de cisteína o homocisteína que forman enlaces de disulfuro o tioéter, u otros residuos de aminoácidos capaces de formar un puente de ciclización tal como ácido aspártico y lisina, preferentemente X<sub>2</sub> y X<sub>4</sub> representan residuos de cisteína o homocisteína;

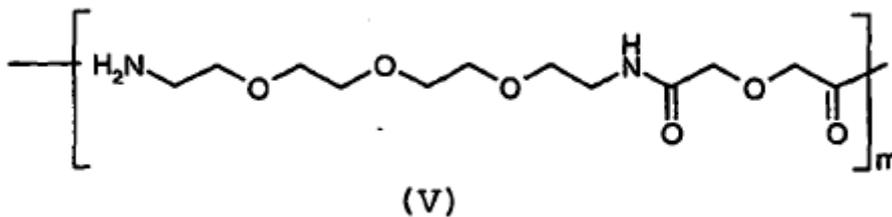
X<sub>3</sub> representa arginina, N-metilarginina o un mimético de arginina;

30 X<sub>5</sub> representa una tirosina, una fenilalanina, una 3-yodo-tirosina o un residuo de naftilalanina, y más preferentemente una fenilalanina o un residuo de 3-yodo-tirosina;

X<sub>6</sub> representa un residuo de aminoácido que contiene tiol, preferentemente una cisteína o un residuo de homocisteína; y

35 R<sub>a</sub> representa los restos -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- capaces de formar un puente a cualquiera de X<sub>2</sub>, X<sub>4</sub> o X<sub>6</sub>; y n representa un número entero positivo de 1 a 10.

40 En un aspecto de la invención el resto L de fórmula (I) representa un resto de biomodificador homogéneo preferentemente en base al bloque de construcción PEG monodisperso que comprende 1 a 10 unidades de dicho bloque de construcción, dicho biomodificador tiene la función de modificar las tasas de farmacocinética y depuración sanguínea de dichos agentes. Adicionalmente, L también puede representar 1 a 10 residuos de aminoácidos preferentemente glicina, lisina, ácido aspártico o serina. En una realización preferente, L representa una unidad biomodificadora que comprende una estructura similar a PEG monodispersa, el ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de fórmula (V),



en la que m equivale a un número entero de 1 a 10 y en la que la unidad terminal C es un resto amida.

Según lo observado más arriba, el biomodificador, L, modifica las tasas de farmacocinética y depuración sanguínea de los compuestos. El biomodificador produce la captación reducida de los compuestos en los tejidos es decir en músculo, hígado, etc. proporcionando de ese modo una mejor imagen de diagnóstico como resultado de menor interferencia de fondo. La secreción es principalmente a través de los riñones y esto añade una ventaja adicional del biomodificador.

L además puede representar un resto preferentemente obtenido de ácido glutárico y/o succínico y/o una unidad basada en polietilenglicol y/o una unidad de fórmula (V) según lo que se ilustra más arriba.

Otros elementos L representativos incluyen polisacáridos del tipo estructural, polisacáridos del tipo almacenamiento, poliaminoácidos y éteres de metilo y etilo de los mismos, y polipéptidos, oligosacáridos y oligonucleótidos, que pueden o no contener sitios de escisión de enzimas.

Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse mediante la utilización de todos procedimientos conocidos de síntesis química, pero particularmente es útil la metodología en fase sólida de Merrifield que emplea un sintetizador de péptidos automático (J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964)). Los procedimientos estándar para el abordaje de síntesis se describen en E. Atherton & R.C. Sheppard, "Solid phase peptide synthesis: a practical approach", 1989, IRL Press, Oxford.

Se utiliza una resina de síntesis con un grupo conector lábil al ácido, a la que el residuo de aminoácido deseado con terminal C protegido se une mediante la formación de enlace amida. Por ejemplo, puede aplicarse una resina AM de amida denominada Rink con un conector obtenido de (dimetoxifenil-aminometil)-fenoxi (Rink, H. (1987), Tetrahedron Lett. 30, página 3787). La escisión acidolítica del péptido de esta resina producirá una amida péptida. Alternativamente, puede utilizarse una resina de O-Bis-(aminoetil)etilenglicol tritilo (K. Barlos et al (1988), Liebigs Ann. Chem, p. 1079) que con la escisión acidolítica produce un péptido con un asa amina primaria.

Las peptidil resinas están ensambladas en una dirección terminal C a terminal N. El grupo protector de  $N^{\alpha}$ -amino del aminoácido terminal C primero se elimina y el segundo aminoácido en la secuencia se acopla mediante la utilización de reactivos de condensación apropiados. Los ciclos de acoplamiento y desprotección del  $N^{\alpha}$ -amino después se repiten en etapas alternantes hasta que las secuencias deseadas son ensambladas.

En general, todos los grupos reactivos presentes están protegidos durante la síntesis del péptido. Se conoce un amplio intervalo de grupos protectores para aminoácidos (véase, por ejemplo, Greene, T.W. & Wuts, P.G.M. (1991) Protective groups in organic synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York). Puede utilizarse un abordaje de grupo protector ortogonal (Barany, G. et al (1977), J. Am. Chem. Soc, 99, página 7363). De ese modo por ejemplo, mediante la combinación de diferentes grupos protectores tales como el grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo (Fmoc) lábil a la piperidina con el super grupo 4-metiltritilo (Mtt) lábil al ácido, el grupo 2-acetildimedona (Dde) lábil a la hidrazina y el grupo *terc*-butiloxicarbonilo (Boc) lábil al ácido es posible introducir selectivamente diferentes restos en diferentes sitios de amina. Además, mediante la combinación del grupo protector tritilo (Trt) lábil al ácido para la cadena lateral Cys con la protección del *terc*-butilo de otros residuos Cys (lábil en condiciones oxidativas ácidas por ejemplo TFA-2% dimetilsulfoxido) se logra la formación selectiva de disulfuro.

Las peptidil resinas completadas pueden ser cloroacetiladas en el extremo terminal N para introducir un puente tioéter entre el extremo terminal N y un residuo Cys.

Los péptidos son etiquetados con  $^{99m}\text{Tc}$  mediante el tratamiento de un compuesto disuelto en solución tamponada libre de oxígeno y destilada (pH aproximadamente 9) y se mantienen bajo atmósfera de nitrógeno con solución de Sn-MDP y  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  tal como se conoce a partir del estado de la técnica.

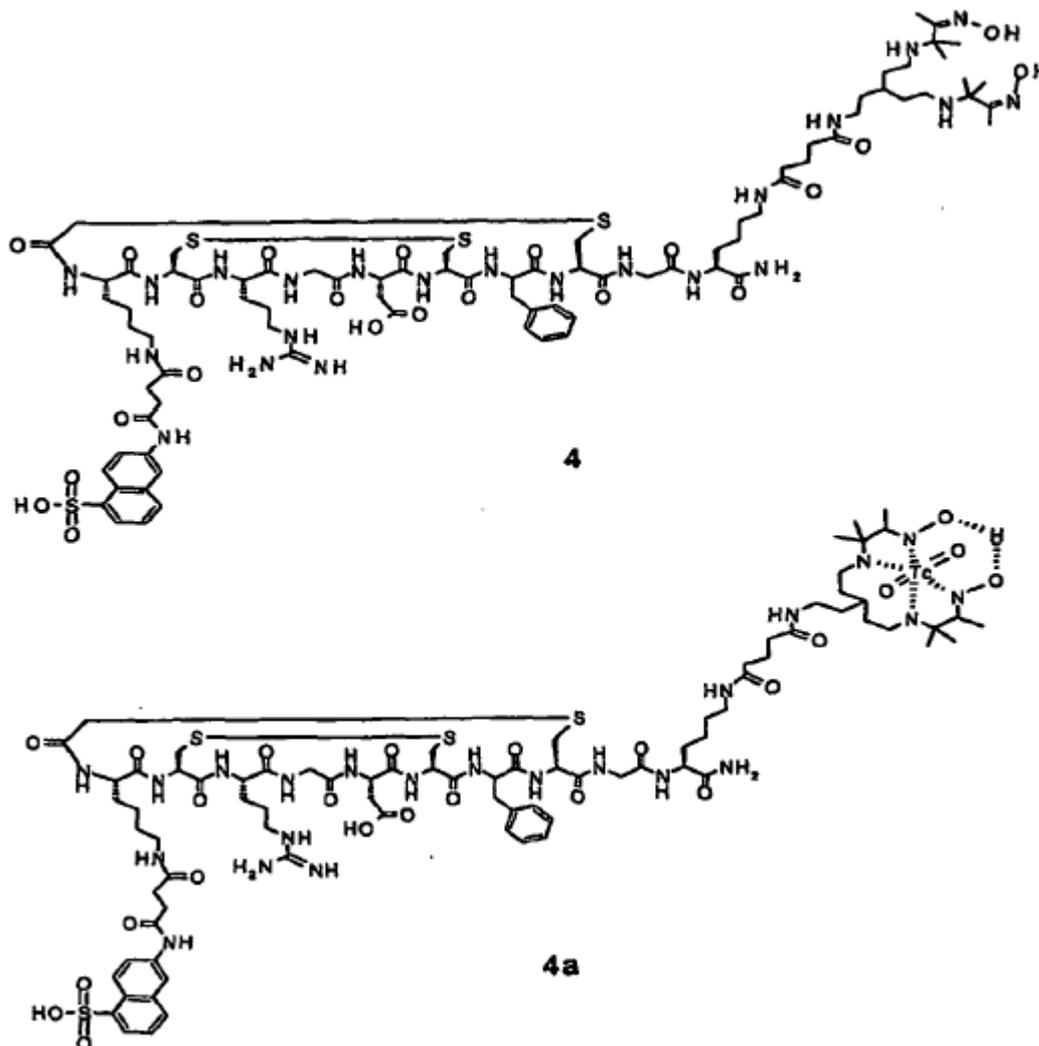
La invención además se ilustra mediante los ejemplos 1 a 4. Los ejemplos describen la síntesis de compuestos con dos diferentes restos Z y/o  $\text{Y}_1\text{M}$ . También se describe el etiquetado de los compuestos con  $^{99m}\text{Tc}$ .

La posición de los diversos aminoácidos en los péptidos es visualizada por la numeración sobrescrita (por ejemplo Cys<sup>2</sup>).

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

- 5 Cys<sup>2-6</sup>; c[CH<sub>2</sub>CO-Lys(N-(5-sulfo-naftalen-2-il)-Succ)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-GlutcPn216)-NH<sub>2</sub> (**4**) y su quelato <sup>99m</sup>Tc (**4a**)



- 10 Síntesis en fase sólida de la resina 1 ClCH<sub>2</sub>CO-Lys-Cys(tBu)-Arg(Pmc)-Gly-Aso(tBu)-Cys(tBu)-Phe-Cys(Trt)-Gly-Lys(Boc)-Rink amida MBHA

- 15 La peptidil resina que corresponde a la secuencia anterior se ensambló mediante química peptídica en fase sólida estándar (Barany, G; Kneib- Cordonier, N; Mullenm D.G. (1987) Int. J. Peptide Protein Research 30, 705-739) en una resina Rink Amida MBHA (0,73 mmol/g; de NovaBiochem). Se utilizó un sintetizador de péptido modelo 433A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Los residuos (del extremo terminal carboxilo) se ensamblaron en una escala de 0,25 mmol mediante la utilización de acoplamiento único con un exceso molar de 4 veces de aminoácidos protegidos con N<sup>α</sup>-Fmoc (cartuchos de 1 mmol) y 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio-hexafluorofosfato (HBTU)/1-hidroxi-benzotriazol (HOBt)/diisopropil-etil-amina (DIEA) en N-metilpirrolidona (NMP) mediante la utilización de ciclos de acoplamiento de 2,5 horas. La desprotección con Fmoc se logró con monitoreo de

conductividad mediante la utilización de piperidina al 20% en NMP. Los grupos protectores de cadena lateral de aminoácidos utilizados fueron 4-metiltrilito (Mtt) para Lys<sup>1</sup>, *tert*-butilo (tBu) para Cys<sup>2</sup>, Cys<sup>6</sup> y Asp, 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc) para Arg, trilito (Trt) para Cys<sup>8</sup>, y *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) para Lys<sup>10</sup>.

5 La peptidil resina ensamblada después se transfirió a un equipo de burbujeo manual de nitrógeno (Wellings, D.A., Atherton, E. (1997) en *Methods in Enzymology* (Fields, G. ed), 289, páginas 53-54, Academic Presss, Nueva York). El extremo terminal N se desprotegió con Fmoc y después se cloroacetiló en dimetilformamida (DMF), mediante la utilización de un exceso molar de 10 veces de anhídrido simétrico formado mediante la reacción de ácido cloroacético (20 equivalentes) con *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) (10 equivalentes) en diclorometano (DCM). El grupo protector de Mtt en N<sup>ε</sup>-Lys<sup>1</sup> se eliminó selectivamente mediante el tratamiento de la peptidil resina con DCM que contenía 5% de triisopropilsilano (TIS) y 1% de ácido trifluoroacético (TFA) durante 5 x 2 minutos o hasta que el filtrado se volviera incoloro. La peptidil resina terminada resina 1 ClCH<sub>2</sub>CO-Lys-Cys(tBu)-Arg(Pmc)-Gly-Asp(tBu)-Cys(tBu)-Phe-Cys (Trt)-Gly-Lys(Boc)-Rink Amida MBHA se neutralizó con DIEA al 5% en DMF y finalmente se lavó con DMF y DCM y se secó *al vacío*.

### Síntesis de Cys2-6: c[CH<sub>2</sub>CO-LysCN-(5-sulfo-naftalen-2-il)-Succ)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-Lys-NH<sub>2</sub> 3

15 Se disolvió ácido 6-amino-1-naftalenosulfónico (ácido de Dahl) (1 equivalente, 0,5 mmol.) en DMF que contenía N-metilmorfolina (NMM) (2 equivalentes), y después se añadió anhídrido succínico (10 equivalentes). Después de la reacción durante la noche el disolvente se eliminó bajo presión reducida y se purificó el producto mediante RP-HPLC preparativa (HPLC de Fase Inversa). La columna (Phenomenex Luna C18 10 $\mu$ , 22 x 250 mm) se eluyó a 10 ml/min con un gradiente de 5 a 15% de acetonitrilo (ACN) en TFA acuoso al 0,1% durante 40 minutos. Las fracciones pico deseadas recolectadas de seis corridas consecutivas se combinaron y se liofilizaron produciendo 146 mg de ácido N-(-5-Sulfo-naftalen-2-il)-succinámico **2** puro. RP-HPLC analítica: t<sub>R</sub> = 16,7 minutos, (Phenomenex Luna 5 $\mu$ , 4,6 x 250 mm, ACN al 5-15 % en TFA acuoso al 0,1% durante 20 minutos a 1 ml/min,  $\lambda$ =214 nm). MS de electrospray: [M+H]<sup>+</sup> de producto esperado en 324,0 m/z, experimental en 324,0 m/z.

25 Se añadió una solución de ácido N-(-5-Sulfo-naftalen-2-il)-succinámico **2** (5 equivalentes) y *N*-óxido de hexafluorofosfato de *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]piridin-1-ilmetileno]-*N*-metilmetanaminio (HATU) (5 equivalentes) en DMF que contenía NMM (15 equivalentes) a la peptidil resina **1**. La reacción se dejó que continúe durante toda la noche en un equipo de burbujeo manual de nitrógeno.

30 La resina de péptido obtenida después se trató con TFA que contenía 2,5% de TIS y 2.5% de agua durante 2 horas para escindir el péptido protegido con tBu Cys<sup>2,6</sup> de la resina eliminado simultáneamente todo otro grupo protector de cadena lateral del péptido. El residuo de resina se filtró y se lavó con pequeñas cantidades de TFA puro. El filtrado combinado y los lavados se concentraron mediante evaporación rotatoria y después se trituró con dietil éter para obtener el péptido en bruto. El precipitado se aisló por centrifugación, se lavó con éter y después se liofilizó a partir de ACN al 50%-TFA acuoso al 0,1% produciendo 60 mg de producto en bruto.

35 El péptido lineal después se ciclizó, primero mediante formación del puente tioéter producido mediante la agitación del péptido a 0,5 mg/ml en ACN al 50% -agua pH 7,5 (ajustado por amoníaco líquido) durante 60 minutos a RT. El producto ciclizado se aisló por liofilización. En segundo lugar, el puente de disulfuro interno se formó por desprotección simultánea de tBu y formación de disulfuro en TFA- dimetilsulfóxido al 2% a 0,5 mg/ml durante 60 minutos a RT. Se eliminó el TFA bajo presión reducida y el péptido se aisló del éter y se secó según lo que se describe más arriba, produciendo 62 mg de producto cíclico. El péptido en bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa. La columna (Phenomenex Luna C18 10 $\mu$ , 50 x 250 mm) se eluyó a 50 ml/min con un gradiente de 15 a 20% ACN en TFA acuoso al 0,1% durante 60 minutos. Las fracciones pico deseadas se combinaron y se liofilizaron produciendo 12 mg de producto puro **3**. RP-HPLC analítica: t<sub>R</sub> = 12,9 minutos, (Phenomenex Luna 5 $\mu$ , 4,6 x 250 mm, ACN 15-25 % en TFA acuoso al 0,1% durante 20 minutos a 1 ml/min,  $\lambda$ =214 nm). MS de electrospray: [M+H]<sup>+</sup> de producto esperado en 1458,5 m/z, experimental en 1458,2 m/z.

### 45 Conjugación de cPN216-glutarilo a péptido **3**.

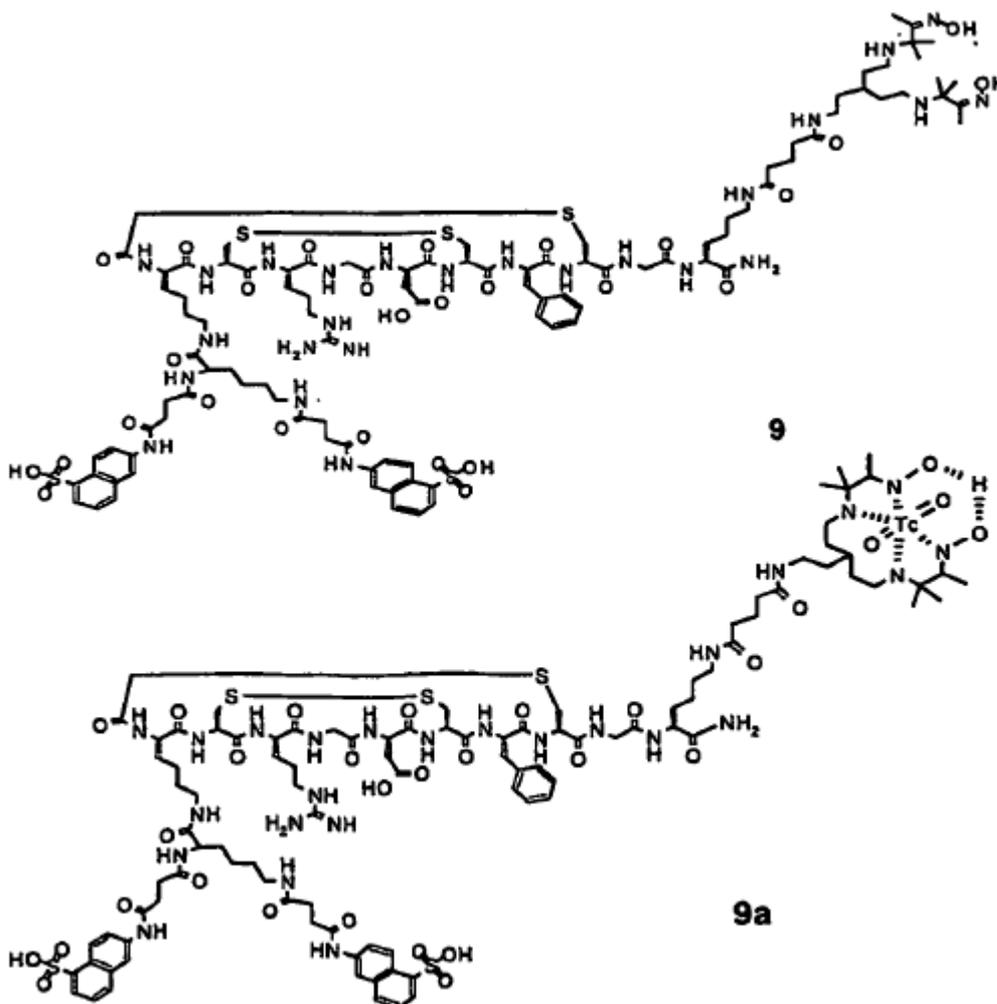
50 Se añadió una solución de cPN216-glutaril-tetrafluorotiofenil éster (2 equivalentes) en DMF a una solución de péptido **3** (1 equivalente, 0,008 mmol) en DMF seguido por NMM (6 equivalentes). Después de agitar durante toda la noche la mezcla de la reacción se preparó eliminando el disolvente bajo presión reducida seguido mediante RP-HPLC preparativa. La columna (Phenomenex Luna C18 10 $\mu$ , 22 x 250 mm) se eluyó a 10 ml/min con un gradiente de ACN al 13 a 20% en TFA acuoso al 0,1% durante 60 minutos. Las fracciones pico deseadas recolectadas se combinaron y se liofilizaron produciendo 8 mg de compuesto **4** puro. RP-HPLC analítica: t<sub>R</sub> = 18,4 minutos, (Phenomenex Luna 5 $\mu$ , 4,6 x 250 mm, ACN al 15-25 % en TFA acuoso al 0,1% durante 20 minutos a 1 ml/min,  $\lambda$ =214 nm). MS de Electrospray: [M+H]<sup>2+</sup> de producto esperado a 949,4 m/z, experimental en 949,5 m/z.

Etiquetado con  $^{99m}\text{Tc}$  del péptido 4

El péptido 4 (0,1 mg) se reconstituyó en solución salina o metanol (0,1 ml) y se transfirió a un kit Toolbox liofilizado de excipientes. El kit Toolbox, diseñado para proporcionar condiciones de etiquetado con radio genérico para quelatos basado en amina, contenía cloruro estañoso deshidratado (16  $\mu\text{g}$ ), ácido metileno difosfónico (25  $\mu\text{g}$ ) hidrógeno carbonato de sodio (4500  $\mu\text{g}$ ), carbonato de sodio (600  $\mu\text{g}$ ), para-aminobenzoato de sodio (200  $\mu\text{g}$ ), Kit pH= 9,2. Después se añadió inyección de pertechnetato de sodio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) (2,1 GBq) en solución salina (3 ml), el kit se invirtió una pocas veces para disolver los contenidos y después se dejó que incube a temperatura ambiente durante 15 - 20 minutos. Inmediatamente se analizó una muestra mediante HPLC e ITLC y el péptido etiquetado con  $^{99m}\text{Tc}$  se administró al sujeto de ensayo entre 1-3 horas después de la reconstitución del kit.

Ejemplo 2

Cys2-6:  $c[\text{CH}_2\text{CO-Lys(N-[5-sulfo-naftalen-2-il]-Succ-Lys(N-[5-sulfo-naftal/en-2-il]-Succ)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys)-Gly-Lys(Glut-cPn216)-NH_2$  (**9**) y su quelato  $^{99m}\text{Tc}$  (**9a**)

Síntesis de Cys2-6:  $c[\text{CH}_2\text{CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-Lys(Glut-cPn216)-NH_2$  7

La peptidil resina 1 descrita en el Ejemplo 1 más arriba se protegió con  $\text{N}^{\epsilon}$ -Lys $^1$  mediante el tratamiento con una solución de 2-acetildimedona (Dde-OH) en DMF durante 2 horas mediante la utilización de un equipo de burbujeo manual de nitrógeno. El péptido parcialmente protegido se escindió a partir de la resina con el tratamiento con TFA que contenía 2,5% de TIS y 2,5% de agua durante 2 horas. La mezcla de la reacción se preparó y el péptido se

aisló del éter y se liofilizó según lo que se describe más arriba en el Ejemplo 1, produciendo 70 mg de  $\text{ClCH}_2\text{CO-Lys(Dde)-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-Gly-Lys-NH}_2$  **5**.

5 El péptido lineal **5** se ciclizó mediante la formación del puente tioéter según lo que se describe en el Ejemplo 1 y el producto en bruto (78 mg) se purificó mediante RP-HPLC preparativa. La columna (Phenomenex Luna C18 10 $\mu$ . 50 x 250 mm) se eluyó a 50 ml/min con un gradiente de ACN al 20 a 45% en TFA acuoso al 0,1% durante 60 minutos. Las fracciones pico deseadas se combinaron y se liofilizaron produciendo 26 mg de  $\text{c[CH}_2\text{CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-Gly-Lys-NH}_2$  purificado **6**. RP-HPLC analítica:  $t_R = 16,35$  minutos, (Phenomenex Luna 5 $\mu$ , 4,6 x 250 mm, ACN al 20-50 % en TFA acuoso al 0,1 % durante 20 minutos a 1 ml/min,  $\lambda=214$  nm). MS de Electrospray:  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$  de producto esperado en 716,8 m/z, experimental en 716,7 m/z.

10 Después se añadió el quelato cPN216-glutaril-tetrafluorotiofenil éster (2 equivalentes) en DMF al péptido **6** (1 equivalente, 0,009 mmol) seguido por NMM (3 equivalentes) y la mezcla se agitó durante toda la noche. El grupo Dde en  $\text{N}^\epsilon\text{-Lys}^1$  después se eliminó mediante la adición de suficiente hidrazina a la mezcla de la reacción para dar una solución al 2%. Después de 30 minutos el disolvente se eliminó bajo presión reducida y el producto se aisló por precipitación y liofilización según lo que se describe más arriba. La desprotección final con  $t\text{Bu}$  y formación de disulfuro del péptido se realizó según lo que se describe en el Ejemplo 1 produciendo 18 mg de péptido **7**.

#### Introducción de un resto del ácido de Dahl ramificado en la posición $\text{N}^\epsilon\text{-Lys}^1$ del péptido **7**

20 Se añadió una solución de N-( $\text{N}^\epsilon$ -di-Boc-lysyloxi)succinimida (3 equivalentes) en DMF al péptido **7** (1 equivalente, 0,006 mmol) seguido por NMM (5 equivalentes). Después de 18 horas la reacción se completó y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo de péptido se trató con TFA que contenía 2,5% de TIS y 2,5% de agua durante 15 minutos dando Cys2-6;  $\text{c[CH}_2\text{CO-Lys(N-Lys)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-Lys(Glut-cPn216)-NH}_2$  **8** que se aisló por precipitación y se liofilizó según lo que se describe más arriba.

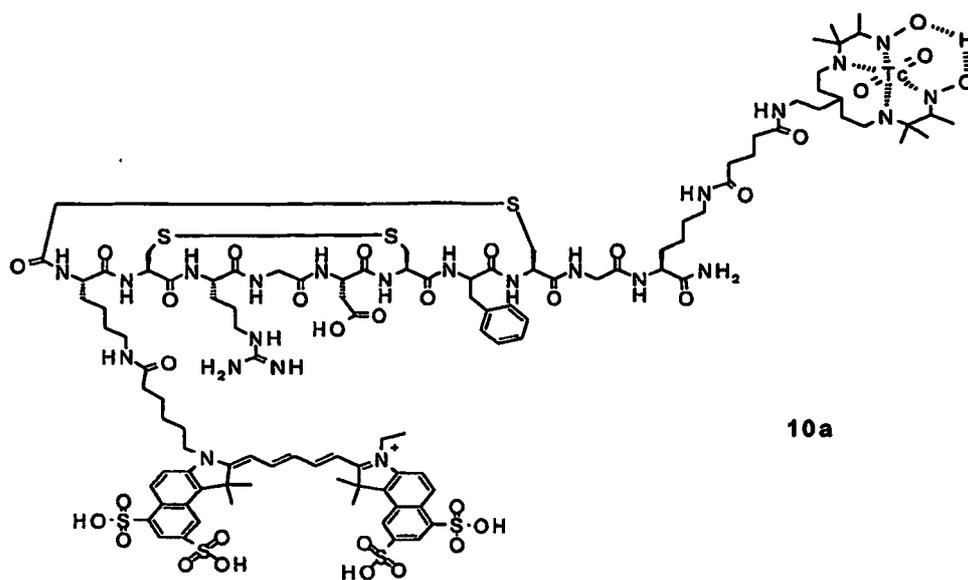
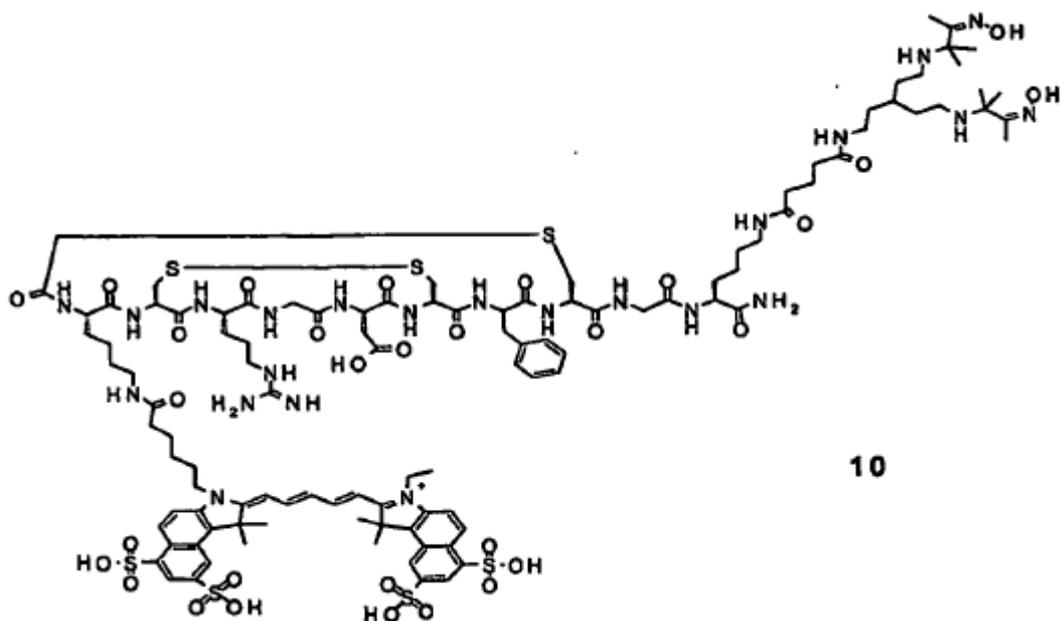
25 Se activó el ácido N-(5-sulfo-naftalen-2-il)-succinámico **3** (10 equivalentes) mediante HATU (10 equivalentes) en DMF que contenía NMM (30 equivalentes). Después de 30 minutos se añadió la mezcla a una solución de péptido **8** (1 equivalente) en DMF y se permitió que la reacción avance durante 24 horas. Se preparó la mezcla según lo que se describe más arriba y el producto de péptido liofilizado se purificó mediante RP-HPLC preparativa. La columna (Phenomenex Luna C18 10 $\mu$ , 10 x 250 mm) se eluyó a 5 ml/min con un gradiente de ACN al 10 a 30% en TFA acuoso al 0,1% durante 40 minutos. Las fracciones pico deseadas se combinaron y se liofilizaron produciendo 2 mg de péptido puro **9**. RP-HPLC analítica:  $t_R = 17,4$  minutos, (Phenomenex Luna 5 $\mu$ , 4,6 x 250 mm, ACN al 5-30 % en TFA acuoso al 0,1% durante 20 minutos a 1 ml/min,  $\lambda=214$  nm). MALDI-TOF MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de producto esperado en 2330,95 m/z, experimental en 2330,27 m/z.

#### Etiquetado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ del péptido **9**

El péptido **9** se etiquetó con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en las condiciones descritas para el etiquetado del péptido 4 en el Ejemplo 1.

#### Ejemplo 3

*Cys2-6;  $\text{c[CH}_2\text{CO-Lys(Cy5.5)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-Lys(Glut-cPn216)-NH}_2$  **10** su quelato  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (**10a**)*



#### Acoplamiento de Cy5.5 al péptido 7

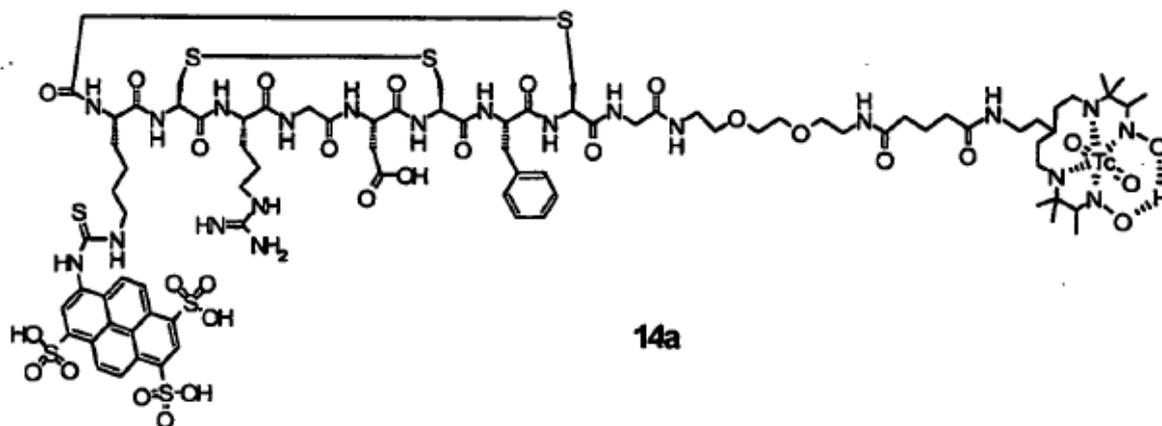
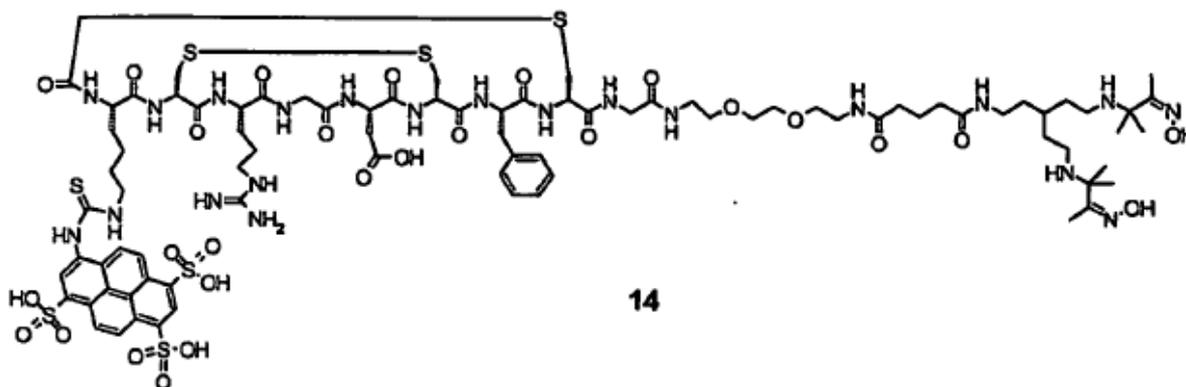
- 5 Se disolvió el Cy5.5-N-hidroxisuccinimida éster (2 equivalentes) en NMP y la solución se añadió al péptido 7 (1 equivalente, 0,005 mmol) seguido por NMM (5 equivalentes). La reacción se dejó que continúe en la oscuridad durante dos días. La mezcla de la reacción después se concentró por evaporación rotatoria a 45 grados y después se diluyó con TFA acuoso al 0,1 % y se purificó mediante RP-HPLC preparativa. La columna (Phenomenex Luna C18 10 $\mu$ , 22 x 250 mm) se eluyó a 10 ml/min con un gradiente de ACN al 15 a 30% en TFA acuoso al 0,1% durante 60 minutos. Las fracciones pico deseadas se combinaron y se liofilizaron para lograr 3,2 mg de péptido puro **10**.
- 10 RP-HPLC analítica:  $t_R$  = 20,9 minutos, (Phenomenex Luna 5 $\mu$ , 4.6 x 250 mm, ACN al 15-30 % en TFA acuoso al 0,1% durante 20 minutos a 1 cumin,  $\lambda=214$  nm). MS de Electrospray:  $[M+H]^{2+}$  de producto esperado en 1245,97 m/z, experimental en 1246,1 m/z.

Etiquetado con  $^{99m}\text{Tc}$  del péptido **10**

El péptido **10** se etiquetó con  $^{99m}\text{Tc}$  en las condiciones descritas para el etiquetado del péptido 4 in Ejemplo 1.

Ejemplo 4

5 Cys2-6; ácido *c*[CH<sub>2</sub>CO-Lys(8-thiouryl-pireno-1,3,6-trisulfónico)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-BAEG-Glut-cPn216 **14** su quelato  $^{99m}\text{Tc}$  (**14a**)

Síntesis de Cys2-6, *c*[CH<sub>2</sub>CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-CysPhe-Cys]-Gly-BAEG-Glut-cPN216 **13**

La peptidil resina correspondiente a la secuencia anterior se ensambló en una tritil resina de O-Bis-(aminoetil)etilenglicol (BAEG) (0,44 mmol/g; de NovaBiochem) en una manera similar a la peptidil resina en el Ejemplo 1. El grupo protector de N<sup>ε</sup>-Lys<sup>1</sup> utilizado fue 1-(4,4-demetil-2,6-dioxociclohex-1-ilidene)etilo (Dde). La peptidil resina ensamblada después se transfirió a un equipo de burbujeo manual de nitrógeno, el extremo terminal N se desprotegió con Fmoc y después se cloroacetiló mediante la utilización de un exceso molar de 10 veces del anhídrido simétrico en DMF, formado por la reacción de ácido cloroacético (20 equivalentes) con DIC (10 equivalentes) en DCM. La escisión del péptido parcialmente protegido de la resina se efectuó mediante el tratamiento de peptidil resina con TFA que contenía 2,5% de TIS y 2.5% de agua durante 2 horas. La mezcla de la reacción se preparó y el péptido ClCH<sub>2</sub>CO-Lys(Dde)-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-Gly-DEG-NH<sub>2</sub> **11** se aisló del éter y se liofilizó según lo que se describe más arriba en el Ejemplo 1.

El péptido lineal **11** (30 mg) se ciclizó mediante la formación del puente tioéter según lo que se describe en el Ejemplo 1 y el producto en bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa. La columna C-18 (Vydac 218TP1 022, 10 $\mu$ , 22 x 250 mm) se eluyó a 10 ml/min con un gradiente de ACN al 25 a 40% en TFA acuoso al 0,1% durante 60 minutos. Las fracciones pico deseadas se combinaron y se liofilizaron para lograr 15 mg de péptido purificado *c*[CH<sub>2</sub>CO-Lys(Dde)-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-Gly-DEG-NH<sub>2</sub> **12**. RP-HPLC analítica: t<sub>R</sub> = 19,2 minutos, (Phenomenex Luna 5 $\mu$ , 4,6 x 250 mm, ACN al 25-40 % en TFA acuoso al 0,1% durante 20 minutos a 1

ml/min,  $\lambda=214$  nm). MS de Electrospray:  $[M+H]^+$  de producto esperado en 1434 m/z, experimental en 1434,6 m/z.

5 Se disolvió el péptido **12** (1 equivalente, 15 mg) en DMF y se añadió cPN216-glutaril-tetrafluorotiofenil éster (2 equivalentes) seguido por NMM (3 equivalentes) y la mezcla se agitó durante toda la noche. El grupo Dde en  $N^{\epsilon}$ -Lys<sup>1</sup> después se eliminó mediante la adición de suficiente hidrazina a la mezcla de la reacción para dar una solución al 2%. Después de 30 minutos el disolvente se eliminó bajo presión reducida y el producto se aisló por precipitación y liofilización según lo que se describe más arriba. La desprotección final con *t*Bu y la formación de disulfuro del péptido se realizó según lo que se describe en el Ejemplo 1. El péptido **13** completamente ciclizado produjo 18 mg.

#### Conjugación de ácido 8-isotiocianatopireno-1,3,6-trisulfónico y el péptido **13**

10 El péptido **13** (1 equivalente, 5 mg) se disolvió en DMF y el pH se ajustó a 8 mediante la adición de NMM en pequeñas alícuotas. Después se añadió la sal trisódica de ácido 8-isotiocianatopireno-1,3,6-trisulfónico (5 equivalentes) en DMF, y la mezcla de la reacción se agitó durante toda la noche. La reacción se monitoreó mediante RP-HPLC y análisis de MS, y el producto se purificó mediante RP-HPLC preparativa. La columna (Phenomenex Luna C18 10  $\mu$ , 22 x 250 mm) se eluyó a 10 ml/min con un gradiente de ACN al 5 a 60% en TFA acuoso al 0,1% durante 60 minutos. Las fracciones pico deseadas se combinaron y se liofilizaron produciendo 0,8 mg de péptido puro **14**. RP-HPLC analítica: tR = 2,04 minutos (pico ancho), (Phenomenex Luna 3 $\mu$ , 4,6 x 5 mm, ACN al 10-80 % en TFA acuoso al 0,1% durante 10 minutos a 2 ml/min,  $\lambda=214$  nm). MS de Electrospray:  $[M+H]^{2+}$  de producto esperado a 1047,8 m/z, experimental en 1048,2 m/z.

#### Etiquetado con $^{99m}\text{Tc}$ del péptido **14**

20 El péptido **14** se etiquetó con  $^{99m}\text{Tc}$  en las condiciones descritas para el etiquetado del péptido 4 en el Ejemplo 1.

## Listado de secuencias

<110> Amersham Health AS  
 <120> Agente de contraste  
 <130> PN0466  
 <160> 3  
 <170> Patentin, versión 3.1

**<210> 1**

**<211 > 10**

**<212> PRT**

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<220>

**<221> THIOETH**

**<222> (1)..(8)**

<223> Puente tioéter entre residuos 1 y 8

<220>

<221> Disulfuro

**<222> (2)..(6)**

<223> Puente disulfuro entre residuo 2 y 6

<400>

**Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Lys**

**1**

**5**

**10**

**<210> 2**

**<211> 11**

**<212> PRT**

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<220>

**<221> THIOETH**

**<222> (1)..(9)**

<223> Puente tioéter entre residuos 1 y 9

<220>

<221> Disulfuro

**<222> (2)..(6)**

<223> Puente disulfuro entre residuo 2 y 6

<400> 2

**Lys Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Lys**  
**1                    5                    10**

**<210> 3**  
**<211> 9**  
**<212> PRT**  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintetizado  
**<220>**  
**<221> THIOETH**  
**<222> (1)..(8)**  
 <223> Puente tioéter entre residuos 1 y 8  
 <220>  
 <221> Disulfuro  
**<222> (2)..(6)**  
 <223> Puente disulfuro entre residuos 2 y 6  
 <400> 3

**Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly**  
**1                    5**

Listado de Secuencias

<110> Amersham Health AS  
 <120> Agente de contraste  
**<130> PN0463**  
**<160> 3**  
 <170> Patentin, versión 3.1  
**<210> 1**  
**<211> 10**  
**<212> PRT**  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintetizado  
**<220>**  
**<221> THIOETH**  
**<222> (1)..(8)**  
 <223> Puente tioéter entre residuos 1 y 8  
 <220>  
 <221> Disulfuro  
**<222> (2)..(6)**  
 <223> Puente tioéter entre residuos 2 y 6  
 <400> 1

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Lys  
 1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<220>

<221> THIOETH

<222> (1)..(9)

<223> Puente tioéter entre residuos 1 y 9

<220>

<221> DISULFID

<222> (2)..(6)

<223> Puente disulfuro entre residuos 2 y 6

<400> 2

Lys Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Lys  
 1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<220>

<221> THIOETH

<222> (1)..(8)

<223> Puente tioéter entre residuos 1 y 8

<220>

<221> DISULFID

<222> (2)..(6)

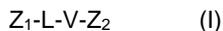
<223> Puente disulfuro entre residuos 2 y 6

<400> 3

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly  
 1 5

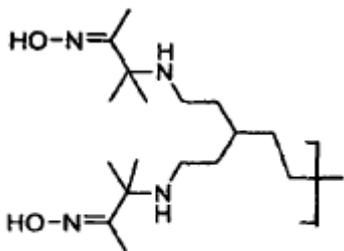
REIVINDICACIONES

1. Un agente de contraste de la fórmula general (I):



en la que

5  $Z_1$  es un resto indicador de fórmula  $Y_1M$  en la que  $M$  es  $^{99m}\text{Tc}$  y  $Y_1$  es un agente quelante de fórmula (III):

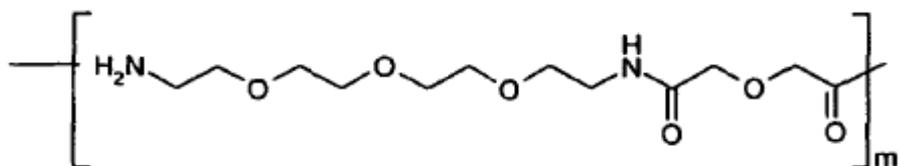


(III);

$Z_2$  es un colorante de cianina que comprende 2 o más restos de ácido sulfónico;

L es un enlace covalente, o:

- (i) representa un péptido que comprende 1-10 residuos de aminoácidos;
- 10 (ii) representa residuos de glicina, lisina, ácido aspártico o serina;
- (iii) comprende una o más unidades de ácido dicarboxílico, unidades de etilenglicol o componentes similares a PEG o combinaciones de los mismos;
- (iv) comprende una o más unidades de diciclolilo, glicolilo o succinilo o combinaciones de los mismos; o,
- 15 (v) es una unidad biomodificadora que comprende una estructura similar a PEG monodispersa de ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de fórmula (V)



(V)

en la que  $m$  equivale a un número entero de 1 a 10 y en la que la unidad terminal C es un resto amida.; y, V es un resto de fórmula (VI)

20  $R_a-C(=O)-X_1-X_2-X_3-G-D-X_4-X_5-X_6 \quad (VI)$

que comprende dos puentes de ciclización,

en la que,

$X_1$  representa un enlace covalente o 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos;

25  $X_2$  y  $X_4$  independientemente representan residuos de cisteína u homocisteína que forman enlaces de disulfuro o tioéter, o residuos de aminoácidos capaces de formar un puente de ciclización tal como ácido aspártico y lisina,

X<sub>3</sub> representa arginina, N-metilarginina o un mimético de arginina;

X<sub>5</sub> representa un residuo de tirosina, fenilalanina, 3-yodo-tirosina o naftilalanina,

X<sub>6</sub> representa un residuo de aminoácido que contiene tiol,

5 R<sub>a</sub> representa los restos -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- capaces de formar un puente a cualquiera de X<sub>2</sub>, X<sub>4</sub> o X<sub>6</sub>; y n representa un número entero positivo de 1 a 10.

2. Un agente de contraste según la reivindicación 1 en el que

X<sub>1</sub> representa 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos en el que al menos uno de los residuos de aminoácidos posee una cadena lateral funcional tal como un grupo ácido o amina preferentemente seleccionado de ácido aspártico o glutámico, lisina, ornitina, ácido diaminobutírico o ácido diaminopropiónico;

10 3. Un agente de contraste según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en el que

X<sub>2</sub> y X<sub>4</sub> independientemente representan residuos de cisteína u homocisteína

4. Un agente de contraste según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que

X<sub>6</sub> representa un residuo de cisteína u homocisteína.

15 5. Una composición radiofarmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un agente de contraste de Fórmula general I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una sal del mismo, junto con uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, para su uso en la potenciación del contraste de imagen en las imágenes *in vivo*.

20 6. Uso de un agente de contraste de Fórmula I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la fabricación de un agente de contraste para su uso en un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad asociada con la formación de colágeno.

7. Un procedimiento para generar imágenes mejoradas de un cuerpo humano o animal al que se le administra una composición de agente de contraste que comprende un agente de contraste de Fórmula I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, cuyo procedimiento comprende generar una imagen de al menos parte de dicho cuerpo.

25 8. Un procedimiento para generar imágenes mejoradas de un cuerpo humano o animal al que se le administra previamente una composición de agente de contraste que comprende un agente de contraste de Fórmula I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, cuyo procedimiento comprende generar una imagen de al menos parte de dicho cuerpo.

30 9. Un kit para la preparación de una composición radiofarmacéutica que comprende el agente de contraste de fórmula I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que dicho kit comprende un conjugado de ligando-quelato y un agente reductor, en el que dicho conjugado de ligando-quelato es de la fórmula Y<sub>1</sub>-L-V-Z<sub>2</sub>, en la que Y<sub>1</sub>, L, V y Z<sub>2</sub> son según se define en la reivindicación 1.

10. El kit de la reivindicación 9 en el que el agente reductor es una sal estañosa.

35 11. El kit de la reivindicación 9 o 10 que adicionalmente comprende uno o más estabilizantes, antioxidantes, agentes volumétricos para liofilización y solubilizantes.