

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 858**

51 Int. Cl.:

A61K 49/06

(2006.01)

A61K 51/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03782484 .4**

96 Fecha de presentación: **22.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1590005**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2005**

54 Título: **Conjugados con biomoléculas de los (4S, 8S)- y (4R,8R)- ácidos 4-p-bencil-8-metil-3,6,9-triaza-3N,6N,9N-tricarboximetil-1, 11-undecanodioicos, puros en cuanto a enantiómeros, procedimientos para su preparación y su utilización para la preparación de agentes farmacéuticos**

30 Prioridad:
04.02.2003 DE 10305462

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.04.2012

73 Titular/es:
**BAYER SCHERING PHARMA
AKTIENGESELLSCHAFT
MÜLLERSTRASSE 178
13353 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:
**LEHMANN, Lutz;
FRIEBE, Matthias;
BRUMBY, Thomas;
SÜLZLE, Detlev y
PLATZEK, Johannes**

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

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).

ES 2 377 858 T3

DESCRIPCIÓN

Conjugados con biomoléculas de los (4S,8S)- y (4R,8R)-ácidos 4-p-bencil-8-metil-3,6,9-triaza-³N,⁶N,⁹N-tricarboximetil-1,11-undecanodioicos, puros en cuanto a enantiómeros, procedimientos para su preparación y su utilización para la preparación de agentes farmacéuticos

El invento se refiere a los objetos caracterizados en las reivindicaciones: a conjugados con biomoléculas de los (4S,8S)- y (4R,8R)-ácidos 4-p-bencil-8-metil-3,6,9-triaza-³N,⁶N,⁹N-tricarboximetil-1,11-undecanodioicos, puros en cuanto a enantiómeros, a procedimientos para su preparación y a su utilización para la preparación de agentes farmacéuticos destinados al radiodiagnóstico, a la radioterapia o al diagnóstico por RMN.

El uso de radiofármacos para finalidades diagnósticas y terapéuticas se conoce desde hace mucho tiempo en el sector de la investigación biológica y médica. En particular, los radiofármacos se utilizan para representar determinadas estructuras tales como, por ejemplo, el esqueleto, los órganos o los tejidos. El uso diagnóstico tiene como premisa el uso de tales agentes radiactivos que, después de su aplicación, se enriquecen específicamente en las estructuras existentes en un paciente, que deben de ser investigadas. Estos agentes radiactivos, que se enriquecen localmente, pueden ser rastreados, registrados o escintigrafiados por medio de unos detectores adecuados, tales como por ejemplo cámaras de escintilación u otros procedimientos adecuados de registro. La distribución y la intensidad relativa del agente radiactivo detectado caracterizan al sitio de una estructura, en la que se encuentra el agente radiactivo, y puede representar la presencia de anomalías en estructuras y en funciones, modificaciones patológicas, etc.

De un modo similar, se pueden administrar unos radiofármacos como agentes terapéuticos, para irradiar determinados tejidos o zonas enfermos/as. Tal tratamiento requiere la preparación de agentes terapéuticos radiactivos, que se enriquecen en determinadas estructuras, órganos o tejidos.

Un radiofármaco desarrollado por la entidad IDEC Pharmaceuticals Corp. para la terapia del "linfoma no de Hodgkin" es Zevalin® (véase p.ej. *Cancer* (2002) febrero 15: 94, (supl. 4):1.349-57). El ion radiante es en este caso el ⁹⁰Y que emite rayos β, que está unido a un anticuerpo específico para un tumor a través de un compuesto quelante (un derivado sustituido con metilo de ácido dietilen-triamina-pentaacético (MX-DTPA)).

La resonancia magnética nuclear (RMN) es hoy en día un método, que se usa ampliamente y que se aprovecha para la generación de imágenes *in vivo*, con el que se pueden representar vasos corporales y tejidos corporales (inclusive tumores) a través de la medición de las propiedades magnéticas de los protones en el agua del cuerpo. Para esto se emplean p.ej. unos agentes de contraste, que dan lugar a un refuerzo del contraste en las imágenes resultantes o respectivamente que hacen legibles a estas imágenes tan sólo a través de la influencia sobre determinados parámetros de RMN de los protones del cuerpo (p.ej. los periodos de tiempo de relajación T¹ y T²). Sobre todo pasan a usarse unos compuestos complejos de iones paramagnéticos, tales como p.ej. unos compuestos complejos que contienen gadolinio (p.ej. Magnevist®), debido al efecto de los iones paramagnéticos sobre el acortamiento de los periodos de tiempo de relajación.

Tanto los iones paramagnéticos, tales como p.ej.: Gd³⁺, Mn²⁺, Cr³⁺, Fe³⁺ y Cu²⁺ así como también muchos radionúclidos metálicos, se pueden administrar en una forma libre como soluciones, ya que son altamente tóxicos. Con el fin de hacer adecuados a estos iones para un uso *in vivo*, por regla general ellos se convierten en compuestos complejos. Por ejemplo, en el documento de solicitud de patente europea EP-A-0 071 564 se describe, entre otras cosas, la sal de meglumina del compuesto complejo con gadolinio(III) del ácido dietilen-triamina-pentaacético (DTPA) como agente de contraste para la tomografía por RMN. Un preparado, que contiene este compuesto complejo, fue autorizado internacionalmente bajo el nombre de Magnevist® como primer agente de contraste de RMN. Este agente de contraste se distribuye extracelularmente después de una aplicación por vía intravenosa y es segregado por vía renal mediante secreción glomerular. Prácticamente no se observa ningún paso del mismo a través de membranas celulares intactas. El Magnevist® es especialmente bueno para la representación de zonas patológicas (p.ej. inflamaciones y tumores).

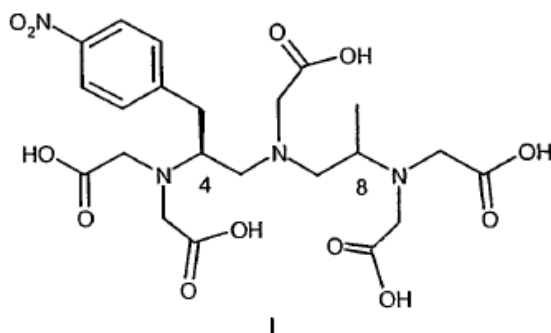
No obstante, los agentes radioterapéuticos y agentes de contraste conocidos no se pueden emplear satisfactoriamente para todos los casos de uso. Así, muchos de estos agentes se distribuyen por todo el espacio extracelular del cuerpo. Con el fin de aumentar la eficiencia de estos agentes en el diagnóstico *in vivo* y en la terapia, se intenta aumentar su especificidad y su selectividad, por ejemplo, para células dianas o para deseadas zonas y estructuras del cuerpo. Un mejoramiento de estas propiedades se puede conseguir, por ejemplo, mediante acoplamiento de los compuestos complejos con metales a biomoléculas según el principio de dirección de fármacos hacia dianas (en inglés "drug-targeting"). Como biomoléculas se ofrecen proteínas plasmáticas, anticuerpos, sus fragmentos, hormonas, factores de crecimiento y substratos de receptores y enzimas (p.ej. véase el documento de solicitud de patente internacional WO 97/12850, Institut für Diagnostikforschung an der FU Berlin (Instituto para la investigación del diagnóstico en la Universidad Libre de Berlín). Sin embargo, hasta ahora, p.ej. la especificidad para un tumor (el enriquecimiento en tumores) en muchos casos todavía no es lo suficientemente alta, lo que constituye un objetivo importante especialmente en el caso de la radioinmunoterapia.

Además, es deseable poner a disposición agentes para el diagnóstico y la terapia, que junto a una especificidad lo más alta que sea posible para una diana, posean una gran estabilidad *in vivo* para los iones metálicos convertidos en complejos, que en la mayoría de los casos son tóxicos.

Una misión del invento consistió, por consiguiente, en poner a disposición nuevos agentes para el radiodiagnóstico y el diagnóstico por RMN, así como para la radioterapia, que no tengan las mencionadas desventajas y en particular que tengan una alta estabilidad *in vivo*, una buena compatibilidad y sobre todo unas propiedades específicas para ciertos órganos. Por una parte, la retención en los tejidos tumorales o en los órganos que se han de investigar, debe de ser suficiente para poder conseguir con una pequeña dosificación la calidad de las imágenes o respectivamente una suficiente irradiación, que se necesitan para un diagnóstico y una terapia eficientes. Por otra parte, a continuación se debe de garantizar una segregación de los metales, lo más rápida y ampliamente completa que sea posible, desde el cuerpo. Además, los agentes de contraste de RMN deben de mostrar una alta relaxividad para protones y, por consiguiente, en el caso de un aumento de la intensidad de las señales, deben de permitir una reducción de las dosis.

Se emprendieron diferentes ensayos para mejorar las propiedades de unos derivados de DTPA bioacoplables mediante la introducción de ciertos sustituyentes.

Cummins y colaboradores describen p.ej. una síntesis detallada de derivados de DTPA sustituidos con metilo, que se pueden acoplar, por ejemplo, con anticuerpos ("A Convenient Synthesis of Bifunctional Chelating Agents Based on Dietilenetriaminepentaacetic Acid and Their Coordination Chemistry with Yttrium" (Una síntesis conveniente de agentes quelantes bifuncionales, que se basan en el ácido dietilen-triamina-pentaacético, y su química de coordinación con itrio", Bioconjugate Chemistry, (1991), 180-186. Brechbiel y colaboradores, "Synthesis of (1-(p-isothiocyanatobenzyl) derivatives of DTPA and EDTA. Antibody Labeling and Tumor-Imaging Studies" (Derivados de 1-(p-isotiocianatobencilo) de DTPA y EDTA. Marcación con anticuerpos y estudios de representación en imágenes de tumores), Inorg. Chem. (1986), 25, 2. 772-2.781). En la solicitud de patente internacional WO 88/ 01618 de Gansow y colaboradores se divulga un DTPA, que está provisto de un sustituyente metilo en la posición 8 y de un sustituyente bencilo funcionalizado en *para* en la posición 4.

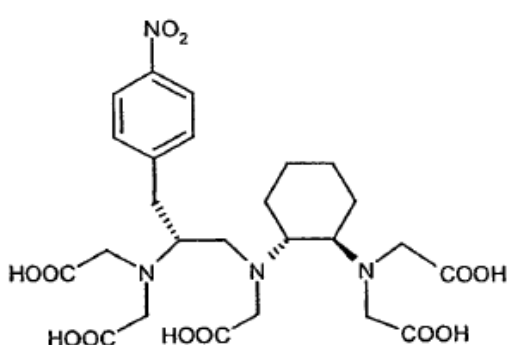


El compuesto I fue designado MX-DTPA, mx-DTPA o también 1B4M-H₅DTPA.

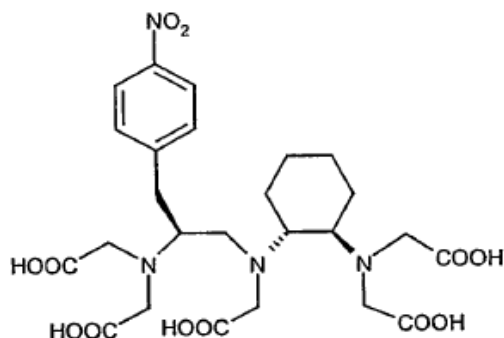
La solicitud de patente internacional WO 01/41743 de la entidad IDEC Pharmaceuticals Corporation describe una síntesis regioselectiva del compuesto I, que parte de una (S)-p-nitrofenil-alanina protegida con Boc y de una diamina monoprottegida. El centro estereogénico en la posición 4 de este compuesto se describe como de configuración S; el centro estereogénico en la posición 8 no es definido.

Tal como ya se ha mencionado más arriba, MX-DTPA es un componente del preparado Z EVALIN[®] para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin. También aquí, se emplea como ligando quelante la mezcla de (4S,8R)- y (4S,8S)-MX-DTPA.

McMurry y colaboradores (J. Med. Chem., (1998), 41, 3.546-3.549) pudieron mostrar que unos DTPA sustituidos con ciclohexilo, que han sido sustituidos con nitrobencilo, a causa de la estructura rígida y voluminosa del anillo de ciclohexano, poseen una configuración preferida. Así, el compuesto I I (y est o t también sería válido para el enantiómero) tiene una estabilidad *in vitro* e *in vivo* más alta que el compuesto III.



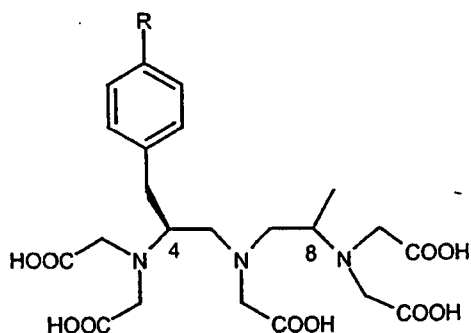
II



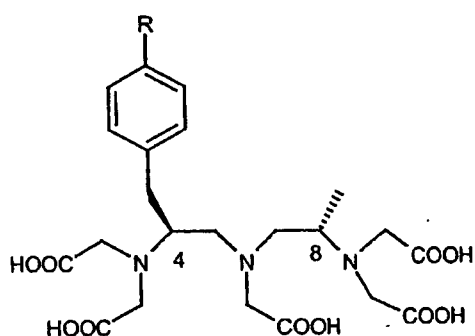
III

A pesar de que MX-DTPA (I) mostró unas propiedades bien investigadas y aceptables - p.ej. una estabilidad aumentada de los compuestos complejos, comparada con la del DTPA sin sustituir -, sigue siendo deseable aumentar aún más la estabilidad de los compuestos complejos con metales *in vivo* y poner a disposición unos agentes para el diagnóstico y la terapia, que presentan una seguridad lo más alta que sea posible.

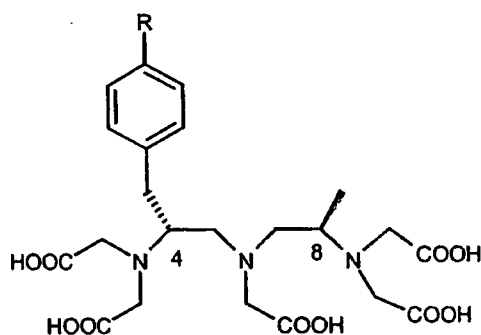
Por fin, se encontró que unos derivados de MX-DTPA, en los que el sustituyente metilo (en la posición 8), que es relativamente pequeño, ha sido introducido de un modo enantioselectivo, en el caso de una adecuada configuración presenta *in vitro* sorprendentemente una estabilidad termodinámica manifiestamente más alta que la de la mezcla de diastereoisómeros (IV) (véase más abajo).



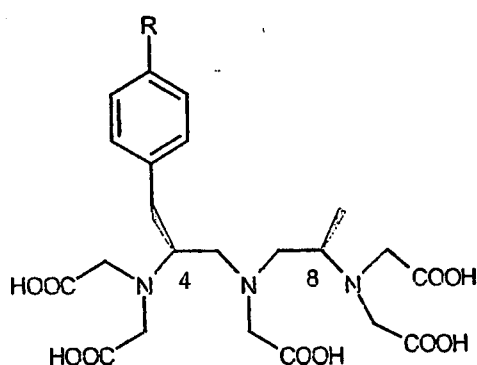
IV



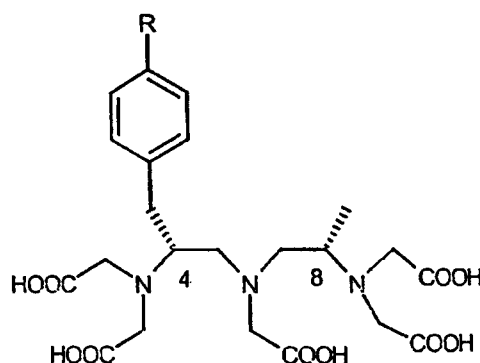
Va



Vb



VIa



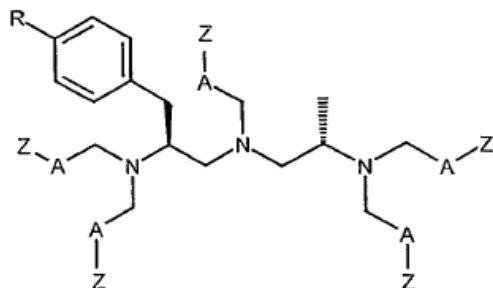
VIb

En este caso, tal como se encontró, tiene que presentarse la configuración de los sustituyentes metilo y bencilo como (4S,8S) (véase el compuesto V a) o (4R,8R) (véase el compuesto V b), con el fin de conseguir el efecto descrito. Las configuraciones (4S,8R) o (4R,8S) (véase el compuesto VI a o r espectivamente b) dan lugar, por el contrario, a una estabilidad disminuida del compuesto complejo. Un experimento impresionantemente ejemplificativo pudo mostrar, que en una mezcla de en cada caso un equivalente de V a (R = -NO₂), VIa (R = -NO₂) y de la sal de Gd(III), se forma casi exclusivamente el compuesto complejo con G d de l co mpuesto V a. Además, se pu do determinar la constante de estabilidad termodinámica para el compuesto V a con un valor $\log K_y = 24,7 \pm 0,7$, que, por consiguiente, está m anifiestamente aum entada f rente a l a co nstante de estabilidad d e l a m ezcla d e diastereoisómeros IV ($\log K_y = 22,5$ (J. Med. Chem. (1998), 41, 3546-3549). Además, se encontró que la radiotoxicidad del co mpuesto co mplejo co n un m etal del co mpuesto V a *in vivo* ha disminuido f rente a l a del compuesto VIa.

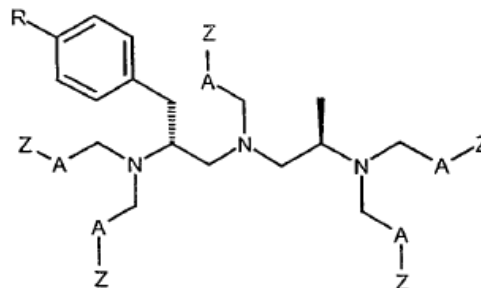
Este resultado es inesperado y sorprendente, puesto que en el caso de los sustituyentes metilo en la posición 8 no se trata de ninguna estructura rígida, "que organiza el espacio" o que es exigente desde el punto de vista estérico, tal como ocurre en el caso del sustituyente ciclohexilo de los compuestos II y III. Así, era de esperar que todos los cuatro estereoisómeros tuviesen casi las mismas propiedades de formación de compuestos complejos. Tal como ya se ha descrito, se puso de manifiesto que, al compararlos, los compuestos V a y V b conformes al invento poseen unas propiedades de formación de compuestos complejos manifiestamente mejores que los compuestos VIa y VIb.

Además de esto, los compuestos conformes al invento muestran una buena relaxividad y una buena solubilidad en agua, de tal manera que ellos se adecuan como agentes farmacéuticos para el radiodiagnóstico y el diagnóstico por RMN así como para la radioterapia.

El invento se refiere por consiguiente a unos conjugados de las fórmulas generales VIIa y VIIb



VII a

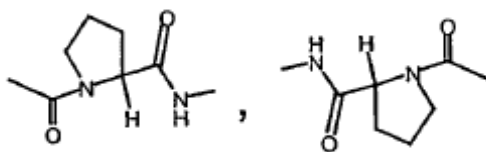


VII b

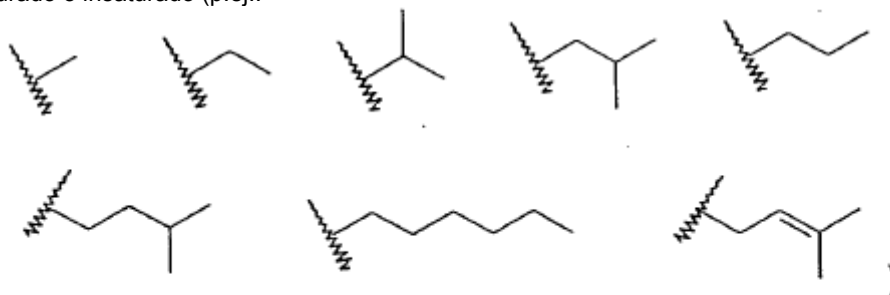
en las que

- Z representa un átomo de hidrógeno o un equivalente de un ion metálico de un elemento con el número atómico 21-29, 31, 32, 37-39, 42-44, 46, 47, 49, 58-71, 75, 77, 82 u 83,
 A representa un grupo -COO,
 R representa una biomolécula unida a través de un grupo funcional, o un radical alquilo de C₁ - C₂₅ lineal o ramificado, saturado o insaturado y eventualmente interrumpido por uno hasta seis átomos de O, o

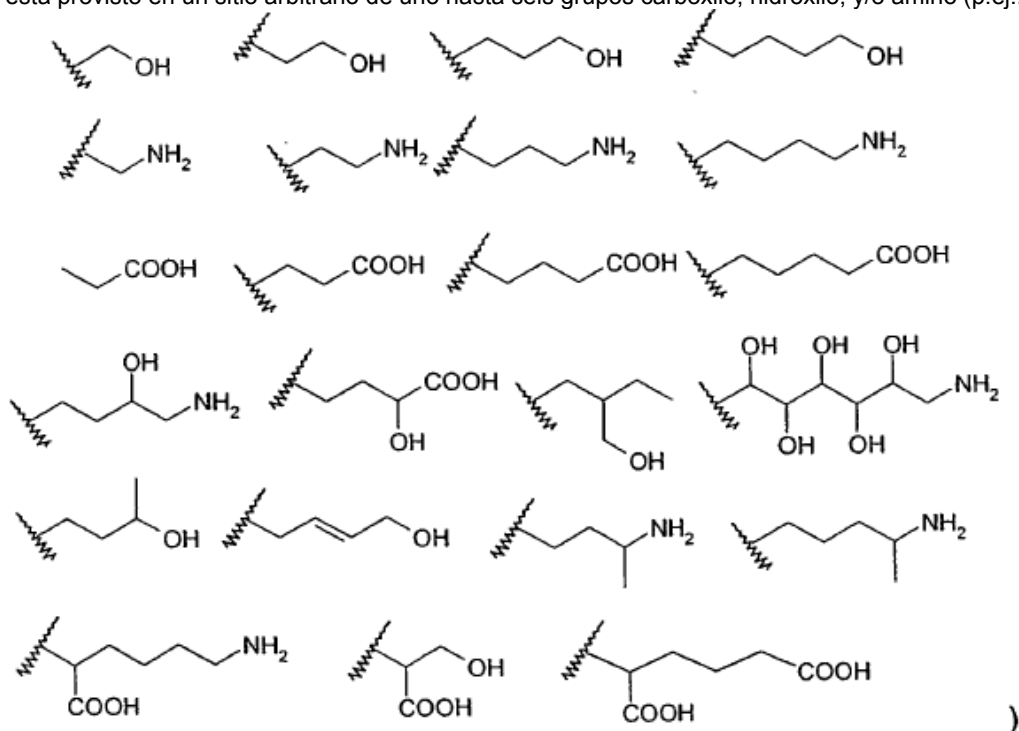
respectivamente por grupos fenileno,
-NHCO-, -CONH-,



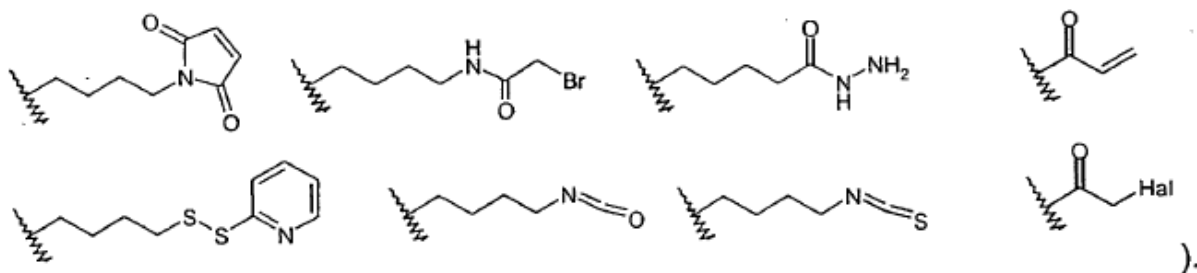
- 5 y/o -NH-(C=S)-NH, que eventualmente está sustituido en un sitio arbitrario con uno hasta seis grupos carboxilo, grupos hidroxilo, grupos amino u otros grupos funcionales, a través de los cuales pueden estar unidas las biomoléculas, así como sus sales con bases orgánicas o inorgánicas, con las condiciones de que el radical alquilo ha de contener por lo menos una biomolécula unida a través de un grupo funcional y de que por lo menos dos Z han de representar un equivalente de un ion metálico.
- 10 El radical R puede representar un radical alquilo con 1 - 25 átomos de carbono (conteniendo él por lo menos un grupo funcional a través del cual está unida una biomolécula). Este radical alquilo puede ser lineal o ramificado, saturado o insaturado (p.ej.:



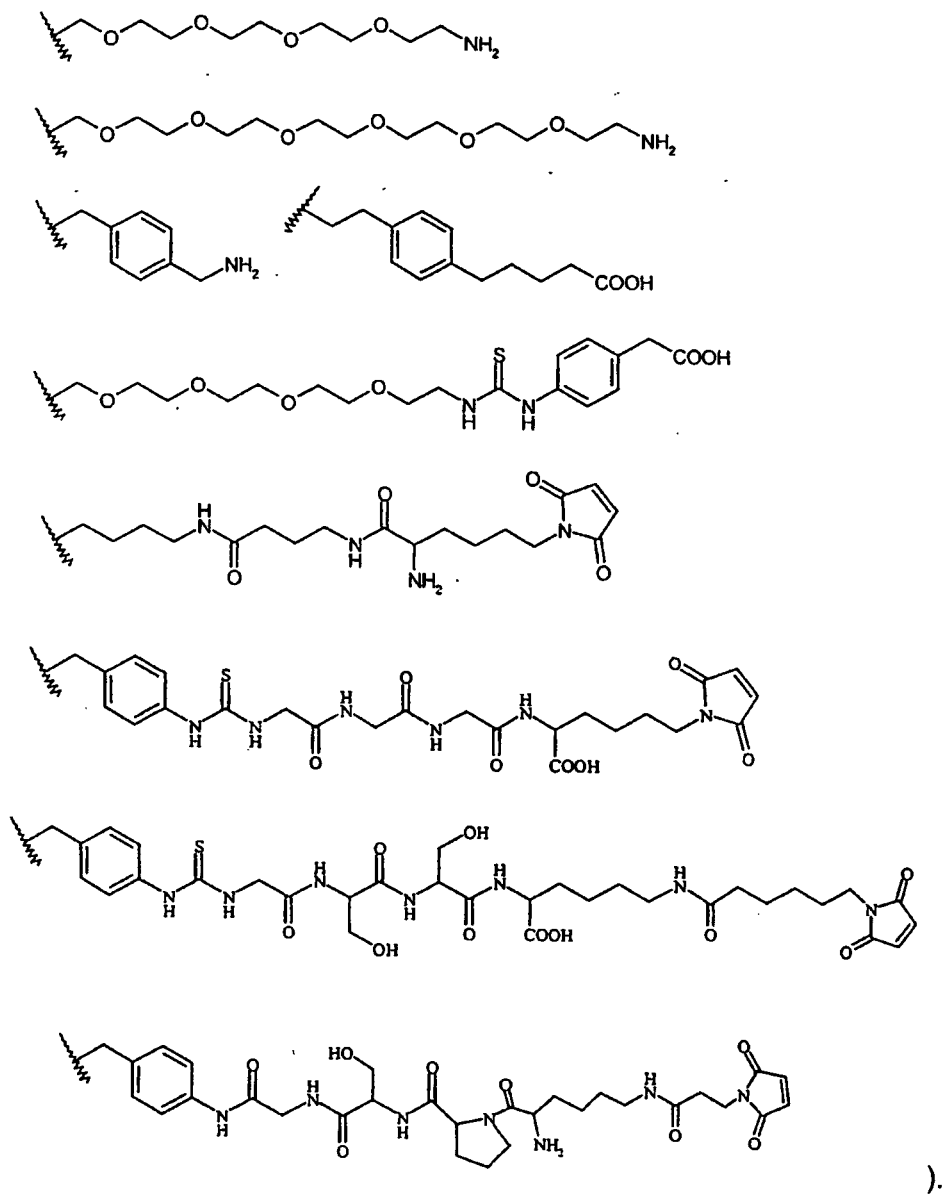
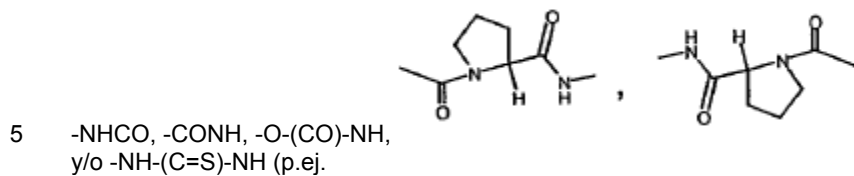
y está provisto en un sitio arbitrario de uno hasta seis grupos carboxilo, hidroxilo, y/o amino (p.ej.:



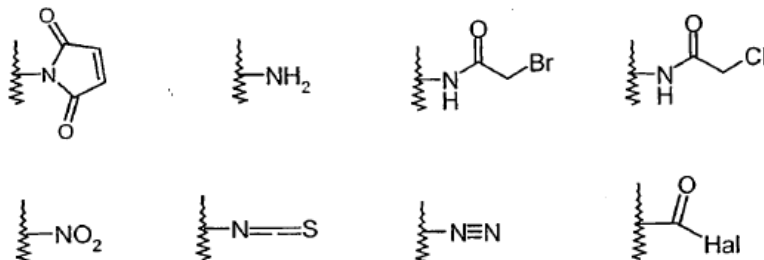
- 15 o por lo menos de otro grupo fijador funcional, que puede estar unido con una biomolécula - tal como p.ej. carboxilo, carboxilo activado, amino, nitrilo, isocianato, tiocianato, hidrazina, semicarbazido, tiocarbamido, bromoacetamido, yodoacetamido, acrilato, acilamino, de anhídridos mixtos, azido, de cloruro de ácido, hidróxido, de cloruro de sulfonilo, vinilsulfono, carbodiimido, maleimido, dioxo u otro grupo fijador funcional (p.ej.
- 20



El radical alquilo de C₁ - C₂₅ puede estar interrumpido eventualmente por uno hasta seis átomos de O, o por grupos fenileno,



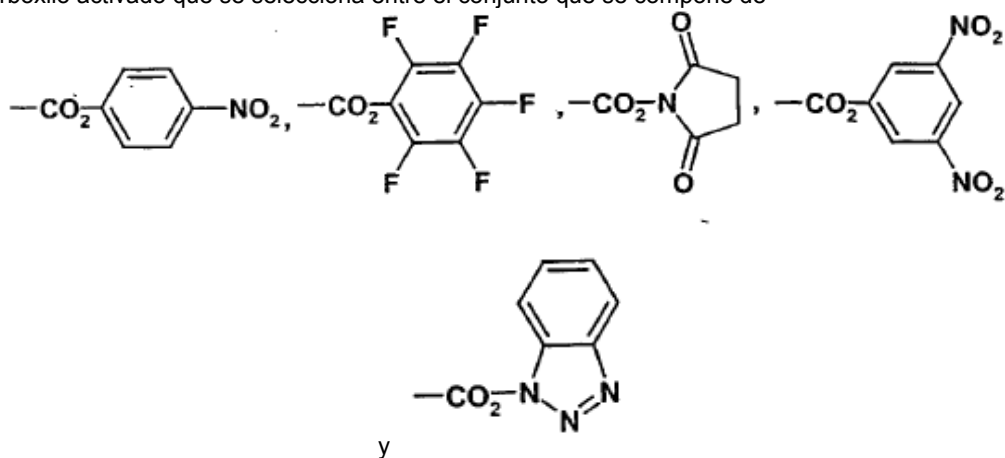
R puede representar por sí mismo también un grupo funcional, tal como p.ej. carboxilo, carboxilo activado, amino, nitro, i socianato, i sotiocianato, hi drazino, se micarbazido, t iosemicarbazido, cl oroacetamido, br omoacetamido, yodoacetamido, acr ilo, aci lamino, de anhídridos mixtos, azi do, de cloruro de áci do, de bromuro de áci do, de hidróxido, de cloruro de sulfonilo, vinilsulfono, carbodiimido, maleimido o diazo (p.ej.:



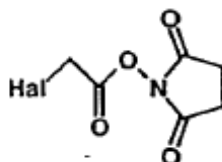
5 u otro grupo fijador funcional a través del cual está unida una biomolécula.

10 Un gran número de los posibles grupos fijadores antes mencionados permiten una reacción selectiva con grupos funcionales de las biomoléculas en el valor óptimo de pH, por ejemplo la reacción por adición con grupos -SH (cisteína en la biomolécula), y ciertamente de manera exclusiva de grupos -SH, p.ej. con maleimidas (compuestos con (2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo) véase más arriba) o bromoacetamidas, cuando tenga lugar el acoplamiento en la región débilmente ácida de valores del pH.

15 Por un grupo carboxilo activado se entienden precedentemente los grupos carboxilo, que están derivatizados de tal manera que ellos facilitan la reacción con una biomolécula. Son conocidos los grupos que pueden ser utilizados para la activación, y se puede remitir por ejemplo a la obra de M. y A. Bodanszky, "The Practice of Peptide Synthesis" (La práctica de la síntesis de péptidos), editorial Springer 1984. Unos ejemplos de ellos son aductos del ácido carboxílico con carbodiimidas o ésteres activados tales como p.ej. ésteres de hidroxibenzotriazol. Se prefiere especialmente el grupo carboxilo activado que se selecciona entre el conjunto que se compone de



25 Los ésteres activados de los compuestos precedentemente descritos se preparan tal como es conocido para un experto en la especialidad. Para el caso de los isocianatos o de los α -halógeno-acetatos, los correspondientes compuestos precursores con amino terminal se hacen reaccionar según métodos conocidos a partir de la bibliografía con tiousofosgenos o halogenuros de ácido 2-halo-acético. También es posible la reacción con unos ésteres correspondientemente derivatizados de N-hidroxi-succinimida tales como, por ejemplo:



(Hal = halógeno).

30 Por lo general, para esta finalidad se pueden utilizar todos los métodos usuales de activación para ácidos carboxílicos, que son conocidos a partir del estado de la técnica. Si el sustituyente R contiene un grupo amido, entonces éste se prepara, por ejemplo, haciendo reaccionar un ácido carboxílico activado con una amina. La activación del ácido carboxílico se efectúa según los métodos usuales. Ejemplos de adecuados reactivos de

activación son diciclohexil-carbodiimida (DCC), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida (EDC), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfonio (BOP) y hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio (HBTU), de manera preferida DCC. También es posible la adición de catalizadores con nucleófilos para O, tales como p.ej. N-hidroxi-succinimida (NHS) o N-hidroxi-benzotriazol.

Si en el caso del sustituyente se trata de una función de ácido carboxílico, entonces ésta se puede emplear en una forma protegida (p.ej. en forma del éster bencílico), y la separación del grupo protector se puede efectuar por hidrogenólisis.

Con el fin de unir esta función de ácido carboxílico a un apropiado grupo funcional de una biomolécula apropiada (acerca de la descripción de biomoléculas: véase más abajo), por regla general, éste deberá ser activado primeramente. De manera preferida, para esto se producen de manera intermedia unos ésteres activados, que son atacados luego por un grupo nucleófilo de la biomolécula. De este modo resulta un enlace covalente entre la biomolécula y el compuesto de la fórmula I. Unos ésteres activados preferidos son los ésteres de la N-hidroxi-succinimida, los ésteres del para-nitrofenol o los ésteres del pentafluorofenol. Si el grupo funcional debe de ser unido a la biomolécula en forma de un isotiocianato, entonces de manera preferida se utiliza primeramente una amina terminal, la cual, si es necesario, puede ser provista de un grupo protector adecuado. Los grupos protectores adecuados son conocidos a partir de la química de los péptidos. Después de haber separado el grupo protector, mediante reacción de la amina primaria terminal con tiofosgeno se puede producir el isotiocianato. Con este pueden reaccionar por adición los grupos nucleófilos de la biomolécula.

La síntesis de los conjugados se efectúa por regla general de tal manera que primeramente se produce un ligando o compuesto complejo quelato derivatizado y funcionalizado, que luego es unido con la biomolécula. Sin embargo, también es posible que, en el caso de la utilización de biomoléculas preparadas sintéticamente, durante la síntesis de la biomolécula el ligando o compuesto complejo quelato conforme al invento sea incorporado en ésta. Esto se puede efectuar, por ejemplo, durante la síntesis secuencial de oligopéptidos en un aparato automático (robot) de síntesis. En caso de que sea necesario, para ello los grupos protectores usuales en la síntesis de la correspondiente biomolécula se pueden introducir en el compuesto conforme al invento. Éstos se desdoblan luego en el aparato sintetizador con arreglo a los usuales algoritmos de síntesis.

Los compuestos conformes al invento contienen por lo menos dos centros de quiralidad (las posiciones 4 y 8). También, R puede contener uno o varios centros adicionales de quiralidad, no estableciéndose diferencia en las descripciones y en las reivindicaciones entre los diferentes enantiómeros, pero los mencionados compuestos abarcan siempre los dos enantiómeros y, en el caso de presentarse varios centros estéreos, ellos comprenden también todos los posibles diastereoisómeros así como sus mezclas.

Por el concepto de "biomolécula" se entiende predominantemente cualquier molécula que, o bien se presenta en la naturaleza, por ejemplo en el cuerpo, o que se había preparado por síntesis con una estructura análoga. Además de esto, por este concepto se entienden las moléculas, que pueden entrar en interacción con una molécula que aparece biológicamente, por ejemplo en el cuerpo, o en una estructura que allí aparece, de tal manera que, por ejemplo, los conjugados se pueden enriquecer en determinados sitios deseados del cuerpo. Por el concepto de "cuerpo" se entiende predominantemente cualquier cuerpo vegetal o animal, prefiriéndose los cuerpos animales y en particular los humanos.

Son biomoléculas, en particular, las moléculas que aparecen en seres vivos, que, como productos de la selección evolutiva, por medio de una cooperación ordenada y compleja, cumplen unas misiones específicas para el organismo, y constituyen el fundamento de sus funciones vitales (el metabolismo y el cambio de forma, la procreación y propagación, el balance energético). En las biomoléculas, las moléculas más grandes (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos, etc.) están constituidas en la mayoría de los casos por eslabones sencillos (aminoácidos, nucleobases, monosacáridos, ácidos grasos, etc.). Las correspondientes macromoléculas son designadas también como biopolímeros.

Ventajosamente, la biomolécula puede tener, por ejemplo, un entramado polipeptídico a base de aminoácidos con cadenas laterales, que pueden reaccionar con el grupo reactivo de los compuestos VIIa' y VIIb' (véase más abajo). Tales cadenas laterales incluyen, por ejemplo, los grupos carboxilo de restos de ácido aspártico y ácido glutámico, los grupos amino de restos de lisina, los grupos aromáticos de restos de tirosina y histidina y los grupos sulfhidrilo de restos de cisteína.

Una recopilación acerca de biomoléculas con numerosos ejemplos se encuentra en la obra "Chemie der Biomoleküle" (Química de las biomoléculas) de la TU-Graz (Universidad Técnica de Graz) (H. Berthold y colaboradores, Institut für Organische Chemie, TU-Graz, 2001), a la que también se puede acceder a través del internet dentro de la dirección www.orgc.tu-graz.ac.at.

Para la formación de los conjugados conformes al invento se adecuan especialmente las siguientes biomoléculas: biopolímeros, proteínas, tales como las proteínas, que tienen una función biológica, HSA (albúmina de suero humano), BSA (albúmina de suero bovino), etc., proteínas y péptidos, que se enriquecen en determinados sitios en

el organismo (p.ej. en receptores, membranas celulares, canales etc.), péptidos disociables por proteasas, péptidos con sitios sintéticos de rotura preestablecida (p.ej. ésteres y amidas lábiles, etc.), péptidos, que son disociados por metaloproteasas, péptidos con engarzadores fotodisociables, péptidos con grupos disociables por agentes oxidantes (oxidasa), péptidos con aminoácidos naturales y no naturales, glicoproteínas (glicopéptidos), proteínas de señal, proteínas antivirales y apoptosis (de muerte celular programada), biopolímeros modificados sintéticamente, tales como biopolímeros derivatizados con engarzadores, metaloproteasas modificadas y oxidasa derivatizadas, hidratos de carbono (desde mono- hasta polisacáridos), tales como azúcares derivatizados, azúcares disociables en el organismo, ciclodextrinas y sus derivados, aminoazúcares, quitosano, polisulfatos y derivados de ácido acetilneuramínico, anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos policlonales, minicuerpos, cadenas únicas (del inglés "single chains") (también las que están unidas con engarzadores para formar fragmentos múltiples), glóbulos sanguíneos rojos y otros componentes de la sangre, marcadores del cáncer (p.ej. CAA) y sustancias que median por la adhesión entre células (p.ej. Lewis X y derivados anti-Lewis X), fragmentos de ADN y ARN, tales como ADN's y ARN's derivatizados (p.ej. los que fueron encontrados por el procedimiento SELEX), ARN y ADN sintéticos (también con bases no naturales), PNAs (acrónimo de ácidos nucleicos peptídicos) (de Hoechst) y antisentido, β -aminoácidos (de Seebach), aminas vectoras para la infiltración en la célula, aminas biogénicas, compuestos farmacéuticos, preparados oncológicos, polímeros sintéticos, que están dirigidos hacia una diana biológica (p.ej. un receptor), esteroides (naturales y modificados), prostaglandinas, taxol y sus derivados, endotelinas, alcaloides, ácido fólico y sus derivados, lípidos bioactivos, grasas, ésteres de ácidos grasos, mono-, di- y triglicéridos modificados sintéticamente, liposomas, que están derivatizados junto a la superficie, micelas procedentes de ácidos grasos naturales o compuestos de perfluoroalquilo, porfirinas, texafrinas, porfirinas ampliadas, citocromos, inhibidores, neuramidasa, neuropéptidos, inmunomoduladores, tales como FK 506, CAPE y gliotoxina, endoglicosidasas, susstratos, que son activados por enzimas, tales como la calmodulina cinasa, la caseína cinasa II, la glutatión-S-transferasa, la heparinasa, metaloproteasas de matriz, la cinasa del receptor β de insulina, UDP-galactosa 4-epimerasa, fucosidasas, proteínas G, galactosidasas, glicosidasas, glicosil transferasas y la xilosidasa, antibióticos, vitaminas y compuestos análogos a vitaminas, hormonas, intercambiadores de ADN, nucleósidos, nucleótidos, lectinas, vitamina B12, Lewis X y compuestos afines, psoralenos, antibióticos del tipo de dieno-trienos, carbacilinas, VEGF (acrónimo del inglés "vascular endothelial growth factor" (factor de crecimiento endotelial vascular)), somatostatina y sus derivados, derivados de biotina, antihormonas, proteínas y compuestos sintéticos específicos/os para tumores, polímeros, que se enriquecen en zonas de carácter ácido o básico del cuerpo (distribución controlada por el valor del pH), mioglobinas, apomioglobinas, etc., péptidos de neurotransmisores, factores de necrosis tumoral, péptidos, que se enriquecen en un tejido inflamado, reactivos para agrupaciones de sangre (en inglés "bloodpool"), proteínas transportadoras de aniones y cationes, poliésteres (p.ej. del ácido láctico), poliamidas y polifosfatos.

La mayoría de las biomoléculas antes citadas son obtenibles comercialmente de Merck, Aldrich, Sigma, Calbiochem o Bachem.

Además, como biomoléculas se pueden emplear todos los "grupos fijadores de proteínas plasmáticas" o respectivamente todos los "grupos de fijación a dianas", que se divulgan en los documentos WO 96/23526 y WO 01/08712.

Además, los compuestos de las fórmulas VII a y b pueden constituir conjugados con todas aquellas moléculas, que se hacen reaccionar dentro del estado de la técnica con colorantes fluorescentes, con el fin de, por ejemplo, determinar su localización dentro de la célula mediante microscopía de epifluorescencia. Los compuestos pueden estar conjugados también con unos medicamentos que son en principio arbitrarios, con el fin de vigilar entonces, después de la administración del medicamento, el transporte de éste dentro del organismo mediante la técnica de RMN o de escintigrafía. Además, es posible que los conjugados conformes al invento a base de los compuestos de las fórmulas VII a y b y de las biomoléculas contengan otras moléculas adicionales, que han sido conjugadas con las biomoléculas. Por lo tanto, por el concepto de "biomolécula" se abarcan dentro del sentido del invento todas las moléculas, que se presentan en sistemas biológicos, y todas las moléculas, que son biocompatibles (en lo que respecta a la definición de biomoléculas, véase más arriba).

La relaxividad de los compuestos complejos paramagnéticos conformes al invento es tan alta, que ellos se adecuan especialmente bien para el diagnóstico por RMN.

Los compuestos conformes al invento se fijan a proteínas. Esta propiedad les hace posible permanecer, unidos a proteínas del plasma, durante más tiempo en la corriente sanguínea y hacer posible así una representación del espacio vascular. Además de esto, se hace posible también la representación de unos sitios con una permeabilidad aumentada, tal como se pueden encontrar por ejemplo en tumores. Esta permeabilidad vascular aumentada constituye, además, una base para la terapia tumoral con compuestos complejos con metales radiactivos. El fármaco abandona el vaso dentro del tumor, permanece en el tejido y somete a éste a su radiación terapéuticamente eficaz.

La fijación de proteínas plasmáticas hace posible también un diagnóstico con generación de imágenes para la localización de infartos o necrosis como consecuencia del enriquecimiento de las sustancias conformes al invento en el infarto o en la necrosis.

La detección, la localización y la vigilancia de necrosis o infartos es un sector importante en la medicina. Así, el infarto de miocardio no da lugar inmediatamente a un tejido irreversiblemente incapaz de funcionar, sino que inicia

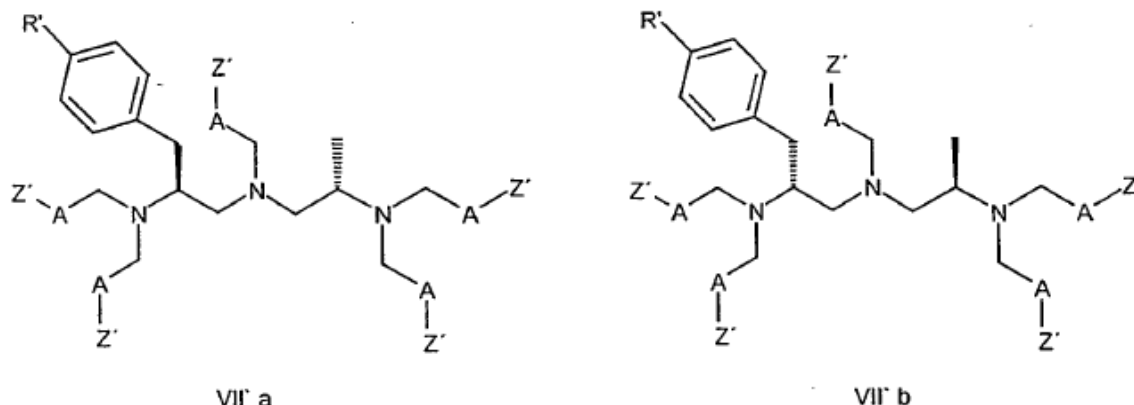
un proceso dinámico, que se extiende a lo largo de un prolongado período de tiempo (de algunas semanas a varios meses). La enfermedad transcurre aproximadamente en tres fases, que no están separadas nítidamente entre sí, sino que se solapan. La primera fase, el desarrollo del infarto de miocardio, abarca las 24 horas después del infarto, en las que la destrucción avanza como una onda de choque (fenómeno de frente de onda) desde el subendocardio hacia el miocardio. La segunda fase, el infarto ya existente, comprende la estabilización de la zona en la que tiene lugar una formación de fibras (fibrosis) como proceso de curación. La tercera fase, el infarto curado, comienza después de que todo el tejido destruido haya sido reemplazado por un tejido cicatricial fibroso. Durante este período de tiempo tiene lugar una extensa reestructuración.

Para realizar la evaluación de un infarto de miocardio, tiene una importancia decisiva el hecho de saber qué tamaño tiene la porción del tejido que se ha perdido definitivamente durante el infarto y en qué lugar se efectuó la pérdida, puesto que de este conocimiento depende el tipo de la terapia.

Los infartos se efectúan no sólo en el miocardio sino también en otros tejidos tales como los existentes en el cerebro o en los riñones.

Mientras que el infarto es curable hasta cierto punto, en el caso de una necrosis, la muerte tisular limitada localmente, sólo se pueden impedir o por lo menos aliviar las secuelas dañinas para el resto del organismo. Las necrosis pueden resultar de diferentes modos: por lesiones, agentes químicos, déficit de oxígeno o por irradiación. Como en el caso del infarto, el conocimiento de la extensión y del tipo de una necrosis es importante para el ulterior modo de proceder por el médico.

La preparación de los conjugados conformes al invento de las fórmulas VII a y b se efectúa mediante el recurso de que los compuestos de las fórmulas generales VII' a y VII' b



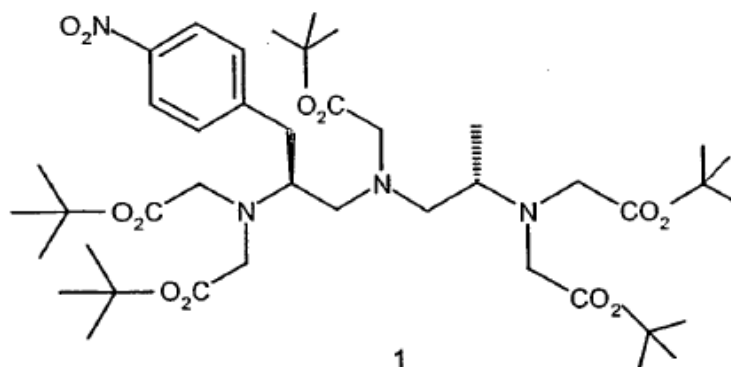
En las que **Z'** tiene el significado de **Z** o de un grupo protector de carboxilo, **R'** representa un grupo funcional y **A** representa un grupo -COO, eventualmente después de la separación de los grupos protectores de carboxilo, se hacen reaccionar de un modo en sí conocido con una biomolécula, y a continuación (eventualmente después de la separación de los grupos protectores de carboxilo), los ácidos así obtenidos se hacen reaccionar de un modo en sí conocido con por lo menos un óxido metálico o con una sal metálica de un elemento con los números atómicos 21-29, 31, 32, 37-39, 42-44, 46, 47, 49, 58-71, 75, 77, 82 u 83, y a continuación, en el caso de que se desee, los átomos de hidrógeno ácidos presentes se transforman en sales fisiológicamente compatibles con compuestos inorgánicos y/u orgánicos o con aminoácidos.

La reacción con la biomolécula se puede efectuar con quelatos de metales (Z' representa e quivalentes de iones metálicos), con compuestos quelantes (Z' representa el drógeno) o con compuestos quelantes protegidos (Z' representa unos grupos protectores de carboxilo) de las fórmulas VII'a y VII'b, de tal manera que la separación de los grupos protectores o respectivamente la introducción de los iones metálicos deseados se efectúe según sea la vía de reacción escogida.

Como grupos protectores de carboxilo **Z'** entran en cuestión grupos alquilo, arilo y aralquilo inferiores, por ejemplo los grupos metilo, etilo, propilo, butilo, fenilo, bencilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, bis(4-nitro-fenil)-metilo, así como trialkil-sililo.

La separación de los grupos protectores **Z'** se efectúa de un modo en sí conocido, por ejemplo mediante hidrólisis, saponificación alcalina de los ésteres, de manera preferida con un álcali en una solución acuosa-alcohólica, a unas temperaturas de 0 °C a 50 °C, o en el caso de los ésteres bencílicos mediante hidrogenación catalítica y en el caso de los ésteres t-butilícos mediante hidrólisis en condiciones ácidas, por ejemplo con ácido clorhídrico o trifluoroacético (Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos protectores en la síntesis orgánica), 2ª edición, T.W. Greene y P.G.M. Wutz, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1991).

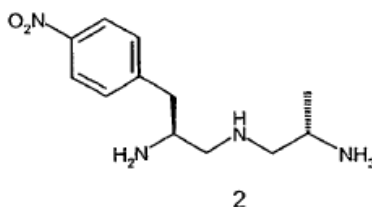
La preparación de los conjugados de las fórmulas VIIa y VIIb conformes al invento se ilustra en lo sucesivo con el Ejemplo del compuesto 1 escogido.



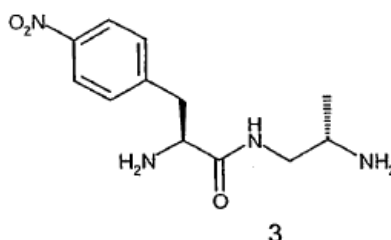
en el que Z' es t-butilo.

5 Mediante una saponificación alcalina y un subsiguiente tratamiento con un intercambiador de iones, el compuesto 1 se puede transformar en el compuesto VII' a con grupos carboxilo libres.

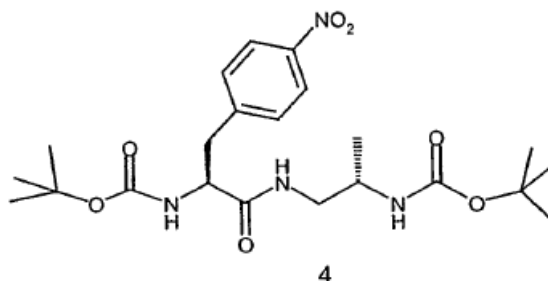
El compuesto 1 resulta a partir de la triamina 2 mediante una reacción de alquilación con el éster terc.-butilico de ácido bromoacético en una mezcla de acetonitrilo y agua, con carbonato de potasio como base.



10 El compuesto 2 es accesible mediante reducción de la amida 3 con un compuesto complejo de borano y tetrahidrofurano. En este caso se siguen las condiciones, como se han descrito por ejemplo en *J. Amer. Chem. Soc.*, (1990), 9608.



15 La amida 3 se prepara a partir de la diamina 4 protegida dos veces con Boc, mediante reacción con ácido trifluoroacético y diclorometano.



20 La formación de la amida 4 se efectúa en este caso según los métodos bien conocidos para un experto en la especialidad, por ejemplo, la activación de un ácido por

- cloruro de oxalilo: *J. Org. Chem.*, 29: 843 (1964)
- cloruro de tionilo: *Helv.*, 42: 1653 (1959)
- carbodiimidas. *Helv.* 46: 1550 (1963)
- carbodiimidas/hidroxisuccinimida: *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1839 (1964) así como *J. Org. Chem.* 53: 3583 (1988);

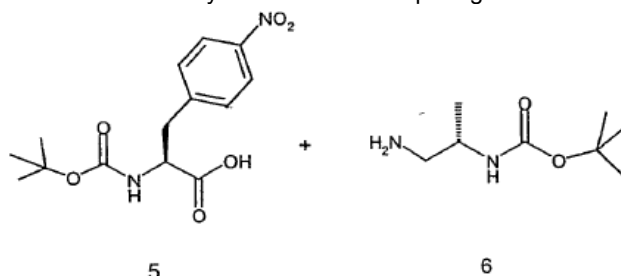
25 *Synthesis* 453 (1972)

- el método del anhídrido: 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina: *J. Am. Chem. Soc.* 90: 1651 (1968); *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 26:493 (1985); *Am. Soc.* 73: 3547 (1951)

- el método de la imidazolidina: Am. Soc. 91:2691 (1969)

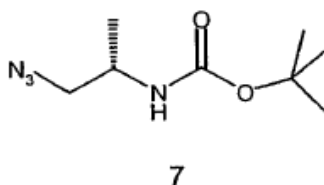
J. Med. Chem. 1996, 39, 2596; Tetrahedron Letters 1994, 35, 5, 981; Bioorg. Med. Letters 1996, 6, 55; J. Chem. Soc. Commun. 1994, 201.

a partir del ácido 5 obtenible comercialmente y de la amina monoprotectada 6.

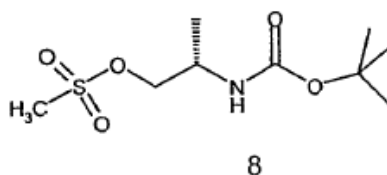


5

El compuesto 6 se establece por reducción de la azida 7 con hidrógeno y Pd/C en acetato de etilo.

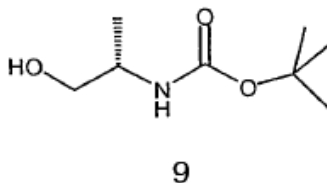


El compuesto 7 resulta de la reacción de sustitución del mesilato 8 con aziduro de sodio.

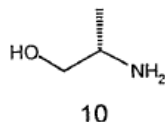


10

El mesilato 8 se puede obtener mediante reacción con un alcohol 9 y el cloruro de ácido metanosulfónico.



El alcohol 9 es el producto de una reacción entre el (S)-2-amino-1-propanol (10) o btenible comercialmente y el dicarbonato de di-*tert*.-butilo [(Boc)₂O] en tetrahidrofurano.



15

El grupo nitró contenido en el compuesto 1 sirve, después de su transformación en el grupo amino, directamente como sitio de fijación para biomoléculas, por ejemplo a través de una formación de una amida con ayuda de ésteres activados o a través de una aminación reductora con grupos carbonilo o después de una transformación en grupos que reaccionan selectivamente. Estas reacciones de transformación son bien conocidas para un experto en la especialidad.

20

Así, Gansow (documento de patente europea EP 4 84984) y Meares (documento de patente de los EE.UU. US 4622420) describen la preparación de halógeno-acetamidas de compuestos formadores de complejos, que encuentran utilización para el acoplamiento con grupos -SH o -NH₂.

25

El grupo isotiocianato hace posible un acoplamiento selectivo con grupos amino. Su preparación y la reacción con aminas para dar las correspondientes tioureas se han descrito, por ejemplo, en el documento de patente US 4680338 de Immunomedics. La reacción con hidrazidas para dar las correspondientes tio-semicarbazidas se expone en el documento de solicitud de patente internacional WO 95/15335 de Neorx Corp.

Las maleimididas hacen posible una reacción selectiva con grupos -SH. Su preparación y su reacción se describen,

por ejemplo, en los documentos de patentes US 5273743 y EP 446071 de Hybritech o EP 345723 de Nihon Medi Physics.

La introducción de los deseados iones metálicos de compuestos complejos para la preparación de agentes de diagnóstico por RMN (resonancia magnética nuclear) se puede efectuar del modo que se ha divulgado en los documentos de patentes EP 71564, EP 130934 y en el documento de publicación para información de solicitud de patente alemana DE-OS 34 01 052. Para ello, el óxido metálico o una sal metálica (por ejemplo, un cloruro, nitrato, acetato, carbonato o sulfato) del elemento deseado se disuelve o suspende en agua y/o en un alcohol inferior (tal como metanol, etanol o isopropanol), y se hace reaccionar con la solución o suspensión de la cantidad equivalente del compuesto formador de complejos conforme al invento.

La neutralización de grupos carboxi libres que están eventualmente todavía presentes, se efectúa con ayuda de bases inorgánicas (p.ej. hidróxidos, carbonatos o bicarbonatos) de p.ej. sodio, potasio, litio, magnesio o calcio y/o de bases orgánicas, tales como, entre otras, aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como p.ej. etanolamina, morfolina, glucamina, N-metil- y N,N-dimetil-glucamina, así como de aminoácidos de carácter básico, tales como p.ej. lisina, arginina y ornitina o de amidas de aminoácidos originalmente neutros o de carácter ácido.

Para la preparación de los compuestos complejos neutros, por ejemplo a sales de compuestos complejos de carácter ácido en una solución o suspensión acuosa, se les puede añadir tanta cantidad de la base deseada, que se alcance el punto neutro. La solución obtenida se puede concentrar seguidamente por evaporación en vacío hasta sequedad. Frecuentemente, es ventajoso precipitar las sales neutras formadas mediante adición de disolventes miscibles con agua, tales como p.ej. alcoholes inferiores (metanol, etanol, isopropanol y otros), cetonas inferiores (acetona y otras), éteres polares (tetrahidrofurano, dioxano, 1,2-dimetoxietano y otros), y obtener de esta manera unos materiales cristalizados que son fáciles de aislar y bien purificables. Se ha acreditado como especialmente ventajoso añadir la base deseada, ya durante la formación del compuesto complejo, a la mezcla de reacción, y ahorrarse de esta manera una etapa del procedimiento.

Si los compuestos formadores de complejos deben de encontrar utilización para la preparación de agentes de radiodiagnóstico o radioterapéuticos, entonces la preparación de los compuestos complejos a partir de los compuestos formadores de complejos se puede efectuar según los métodos descritos en "Radiotracers for Medical Applications" (Radiotrazadores para aplicaciones médicas), tomo I, CRC Press, Boca Ratón, Florida (1983).

Puede ser deseable preparar el compuesto complejo tan sólo poco antes de su utilización, en particular cuando él deba de ser empleado como un radiofármaco. Por lo tanto, el invento abarca también un estuche para la producción de radiofármacos, que comprenden un compuesto de la fórmula VIIa o VIIb, en la que Z representa un radioisótopo. Son objeto del invento, además, unos agentes farmacéuticos, que contienen por lo menos un compuesto fisiológicamente compatible de la fórmula general VIIa o VIIb, eventualmente con los aditivos usuales en la galénica.

La preparación de los agentes farmacéuticos conformes al invento se efectúa de un modo en sí conocido, suspendiendo o disolviendo los compuestos complejos conformes al invento - eventualmente mediando adición de los aditivos usuales en la galénica - en un medio acuoso, y a continuación esterilizando eventualmente la suspensión o solución. Unos aditivos adecuados son, por ejemplo, tampones fisiológicamente inocuos (tales como p.ej. trometamina), adiciones de compuestos formadores de complejos o compuestos complejos débiles (tales como p.ej. ácido dietilentriaminapentaacético o los compuestos complejos con Ca correspondientes a los compuestos complejos con metales conformes al invento) o - en caso necesario - unos electrolitos tales como p.ej. cloruro de sodio o - en caso necesario - agentes antioxidantes tales como p.ej. ácido ascórbico.

Si para la administración por vía enteral o para otras finalidades se desean unas suspensiones o soluciones de los agentes conformes al invento en agua o en una solución salina fisiológica, ellas se mezclan con una o varias sustancia(s) coadyuvante(s) usuales en la galénica [p.ej. metil-celulosa, lactosa, manitol] y/o con uno o varios agente(s) tensioactivo(s) [p.ej. lecitinas, Tween®, Myrj®] y/o con una(s) sustancia(s) aromatizante(s) para la corrección del sabor [p.ej. aceites esenciales].

En principio, también es posible preparar los agentes farmacéuticos conformes al invento también sin ningún aislamiento de las sales de compuestos complejos. En cualquier caso se tiene que prestar un cuidado especial en llevar a cabo la formación del quelato de tal manera que las sales y las soluciones de sales conformes al invento estén prácticamente exentas de iones metálicos no convertidos en compuestos complejos, que tienen un efecto tóxico.

Esto se puede garantizar, por ejemplo, con ayuda de indicadores colorimétricos tales como naranja de xilenol mediante valoraciones de control durante el proceso de preparación.

El invento se refiere, por consiguiente, también a procedimientos para la preparación de los compuestos complejos y de sus sales. Como última medida de seguridad queda una purificación de la sal de compuesto complejo, que se ha aislado.

Los agentes farmacéuticos conformes al invento contienen de manera preferida desde 1 fmol hasta 1,3 mol/l de la sal del compuesto complejo y se añaden dosificadamente por regla general en unas cantidades de 0,5 pmol/kg-

5 mmol/kg. Ellos están destinados a la aplicación por vía enteral y parenteral. Los compuestos complejos conformes al invento pasan a usarse

1. para el diagnóstico por RMN en forma de sus compuestos complejos con los iones paramagnéticos de los elementos con los números atómicos 21-29, 42, 44 y 58-70. Unos iones adecuados son, por ejemplo, los iones de cromo(III), hierro(II), cobalto(II), níquel(II), cobre(II), praseodimio(III), neodimio(III), samario(III) e iterbio(III). A causa de sus fuertes momentos magnéticos, son especialmente preferidos para el diagnóstico por RMN los iones de gadolinio(III), terbio(III), disprosio(III), holmio(III), erbio(III), manganeso(II) y hierro(III).
2. para el radiodiagnóstico y la radioterapia en forma de sus compuestos complejos con radioisótopos de los elementos con los números atómicos 26, 27, 29, 31, 32, 37-39, 43, 46, 47, 49, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 75, 77, 82 y 83.

Los agentes conformes al invento cumplen las múltiples y variadas condiciones previas para la idoneidad como agentes de contraste para la tomografía de espín nuclear. Así, ellos son sobresalientemente adecuados, después de una aplicación por vía oral o parenteral, mediante aumento de la intensidad de la señal, para mejorar en su poder expresivo a la imagen obtenida con ayuda del tomógrafo de espín nuclear. Además, ellos muestran la alta actividad, que es necesaria para cargar al cuerpo con unas cantidades lo más pequeñas que sean posibles de sus sustancias ajenas, y la buena compatibilidad, que es necesaria para mantener el carácter no invasivo de las investigaciones.

La buena solubilidad en agua y la pequeña osmolalidad de los agentes conformes al invento permite preparar unas soluciones altamente concentradas, para mantener la carga volumétrica de la circulación dentro de unos límites soportables y para compensar la dilución mediante el líquido corporal, es decir que los agentes de diagnóstico por RMN tienen que ser de 100 a 1.000 veces mejor solubles en agua que para la espectroscopía por RMN. Además, los agentes conformes al invento no sólo tienen una alta estabilidad *in vitro*, sino también una estabilidad *in vivo* sobresalientemente alta, de tal manera que una liberación o un intercambio de los iones, que no están unidos por enlaces covalentes en los complejos - que son en sí tóxicos -, dentro del período de tiempo en el que se segregan completamente otra vez los nuevos agentes de contraste, sólo se efectúa de un modo extremadamente lento.

Por lo general, los agentes conformes al invento son añadidos dosificadamente para el uso como agentes de diagnóstico por RMN en unas cantidades de 0,0001-5 mmol/kg, de manera preferida de 0,005-0,5 mmol/kg. Los detalles del uso se discuten p.ej. en la cita de H.-J.- Weinmann y colaboradores, *Am. J. of Roentgenology* 142, 619 (1984).

Unas bajas dosificaciones (por debajo de 1 mg/kg de peso corporal) de los agentes de diagnóstico por RMN específicos para ciertos órganos, son empleables, por ejemplo, para la detección de tumores y de un infarto cardíaco. Unas dosificaciones especialmente bajas de los compuestos complejos conformes al invento son adecuadas para el uso en la radioterapia y el radiodiagnóstico. Así, pasan a emplearse tanto para finalidades terapéuticas como también para finalidades de diagnóstico unas dosificaciones de 0,5 pM/kg - 5 µM/kg, de manera preferida de 50 pM/kg - 500 nM/kg. Usualmente, en lo que respecta al ion de metal radiactivo se utilizan unas concentraciones molares aproximadamente 100 - 100.000 veces más pequeñas que lo que se da el caso de los compuestos formadores de quelatos o respectivamente de los bioconjugados con compuestos formadores de quelatos, de tal manera que, por lo tanto, los compuestos formadores de quelatos o respectivamente los bioconjugados con compuestos formadores de quelatos se presentan en un exceso.

Además, los compuestos complejos conformes al invento se pueden utilizar ventajosamente como reactivos de susceptibilidad y como reactivos de desplazamiento (en inglés "shift" para la espectroscopía por RMN *in vivo*).

Los agentes conformes al invento son adecuados también como agentes de radiodiagnóstico y radioterapéuticos a causa de sus ventajosas propiedades radiactivas y de la buena estabilidad de los compuestos complejos que están contenidos en ellos. Detalles acerca de su uso y dosificación se describen p.ej. en "Radiotracers for Medical Applications", CRC-Press, Boca Raton, Florida, 1983, así como en las citas de Eur. J. Nucl. Med. 17 (1990) 346-364 y Chem. Rev. 93 (1993) 1137-1156.

Para la SPECT (acrónimo de Single Photon Emission Computed Tomography = tomografía computarizada por emisión de fotones individuales) se adecuan los compuestos complejos con los isótopos ^{111}In y $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Otro método de generación de imágenes con radioisótopos es la tomografía por emisión de positrones, que utiliza unos isótopos que emiten positrones, tales como p.ej. ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{52}Fe , ^{55}Co , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{86}Y y $^{94\text{m}}\text{Tc}$ (Heiss, W.D.; Phelps, M.E.; Positron Emission Tomography of Brain (Tomografía por emisión de positrones del cerebro), editorial Springer Verlag Berlin, Heidelberg, Nueva York 1983).

Los compuestos conformes al invento son adecuados sorprendentemente también para la diferenciación entre tumores malignos y benignos en zonas sin una barrera hematoencefálica.

Ellos se distinguen también por el hecho de que son eliminados completamente desde el cuerpo y, por consiguiente, son bien compatibles.

Puesto que las sustancias conformes al invento se enriquecen en tumores malignos (no hay ninguna difusión en tejidos sanos, pero una alta permeabilidad de los vasos tumorales), ellas pueden apoyar también a la radioterapia de tumores malignos. Ésta se diferencia del correspondiente diagnóstico sólo por la cantidad y el tipo del isótopo utilizado. El objetivo es en este caso la destrucción de células tumorales por medio de una radiación de onda corta rica en energía con un radio de alcance lo más pequeño que sea posible. Para esto, se aprovechan unas interacciones de los metales, que están contenidos en los compuestos complejos (tales como p.ej. hierro o gadolinio) con radiaciones ionizantes (p.ej. rayos X) o con rayos de neutrones. Por medio de este efecto se aumenta significativamente la dosis local de radiación en el lugar, en donde se encuentra el compuesto complejo metálico (p.ej. en tumores). Con el fin de producir la misma dosis de radiación en el tejido maligno, en el caso del uso de tales compuestos complejos con metales se puede reducir considerablemente la carga por radiaciones para un tejido sano y, por consiguiente, se pueden reducir los efectos secundarios gravosos para los pacientes. Los conjugados de compuestos complejos con metales conformes al invento se adecuan por lo tanto también como una sustancia radiosensibilizante en el caso de la radioterapia de tumores malignos (p.ej. el aprovechamiento de efectos de Mössbauer o en el caso de la terapia por captura de neutrones). Unos adecuados iones que emiten rayos β son p.ej. ^{46}Sc , ^{47}Sc , ^{48}Sc , ^{72}Ga , ^{73}Ga , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re y ^{188}Re , prefiriéndose ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{72}Ga , ^{153}Sm y ^{67}Cu . Unos adecuados iones que emiten rayos α , que tienen pequeños períodos de tiempo de semidesintegración son p.ej. ^{211}At , ^{211}Bi , ^{213}Bi y ^{214}Bi , prefiriéndose el ^{212}Bi . Un adecuado ion que emite fotones y electrones es el ^{158}Gd , que se puede obtener a partir del ^{157}Gd mediante captura de neutrones.

Si el agente conforme al invento está destinado al uso en la variante de la radioterapia que ha sido propuesta por R. L. Mills y colaboradores [Nature, tomo 336, (1988), página 787], entonces el ion central tiene que derivarse de un isótopo de Mößbauer tal como por ejemplo ^{57}Fe o ^{151}Eu .

En el caso de la aplicación *in vivo* de los agentes terapéuticos conformes al invento, éstos se pueden administrar en común con un vehículo adecuado, tal como p.ej. un suero o una solución fisiológica de cloruro de sodio, y se pueden administrar en común con otra proteína distinta tal como p.ej. la albúmina de suero humano. La dosificación depende en este caso del tipo de la perturbación celular, del ion metálico usado y del tipo del método de generación de imágenes.

Los agentes terapéuticos conformes al invento se aplican de manera preferida por vía parenteral, de manera más preferida por vía intravenosa.

Detalles de los usos de agentes radioterapéuticos se discuten p.ej. en la cita de R. W. Kozak y colaboradores, TIBTEC, octubre de 1986, 262 (véase también Bioconjugate Chem. 12 (2001) 7-34).

En conjunto, se ha conseguido sintetizar nuevos/as compuestos formadores de complejos, compuestos complejos con metales y sales de compuestos complejos con metales, que ofrecen unas posibilidades mejoradas en la medicina de diagnóstico y terapéutica.

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar más detalladamente el objeto del invento:

Los Ejemplos 10, 12 - 15, 18, 19, 20, 21, 28 - 31 describen unos conjugados con anticuerpos. Los conjugados con otras biomoléculas se pueden preparar según las siguientes prescripciones generales de trabajo:

En este caso "AAV" [acrónimo de Allgemeine Arbeitsvorschrift) representa una prescripción general de trabajo, "RP-18" designa una fase estacionaria de cromatografía en fase inversa. El número de los complejos por cada biomolécula se determinó mediante espectrografía o ICP (acrónimo del inglés "inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy" = espectroscopía de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente).

Prescripción general de trabajo (AAV) I: Conjugados de albúminas y amidas

3 mmol del ácido se disuelven en 15 ml de DMF (dimetilformamida), mediando enfriamiento con hielo se mezclan con 380 mg (3,3 mmol) de N-hidroxi-succinimida y 681 mg de diciclohexilcarbodiimida y se activan previamente durante 1 hora en el hielo. La mezcla del éster activado se añade gota a gota en el transcurso de 30 minutos a una solución de 16,75 g (0,25 mmol) de albúmina de suero bovino (BSA) en 150 ml de un tampón de fosfato (de pH 7,4), y se agita durante 2 horas a la temperatura ambiente. La solución de la tanda se filtra, el material filtrado se ultrafiltra a través de un AMICON[®] YM30 (límite de exclusión 30.000 Da), el material retenido se cromatografía a través de una columna con Sephadex[®] G50 y las fracciones de productos se liofilizan.

Prescripción general de trabajo (AAV) II: Conjugados de albúminas y maleimida

0,0438 mmol de la maleimida en 1 ml de DMF se añaden a 0,84 g (0,0125 mmol) de albúmina de suero bovino (BSA), disueltos en 15 ml de un tampón de fosfato (de pH 7,4), y se agita durante una hora a la temperatura

ambiente. La solución de la tanda se filtra, el material filtrado se ultrafiltra a través de un AMICON® YM30 (límite de exclusión 30.000 Da), el material retenido se cromatografía a través de una columna con Sephadex® G50 y las fracciones de productos se liofilizan.

5 Prescripción general de trabajo (AAV) III: Preparación de conjugados de amidas

3 mmol del ácido se disuelven en 15 ml de DMF, mediando enfriamiento con hielo se mezclan con 380 mg (3,3 mmol) de N-hidroxi-succinimida y 681 mg de dicitclohexilcarbodiimida y se activan previamente durante 1 hora en el hielo. La mezcla del éster activado se introduce gota a gota en una solución de 2,5 mmol del componente amínico en 15-150 ml de DMF y se agita durante una noche a la temperatura ambiente. La solución de la tanda se filtra y se cromatografía en presencia de gel de sílice.

Prescripción general de trabajo (AAV) IV: Preparación de conjugados de maleimida y SH

15 3 mmol de la maleimida en 15 ml de DMF se añaden gota a gota a 2,5 mmol del componente de SH en 15-150 ml de DMF y se agita durante una hora a la temperatura ambiente. La solución de la tanda se filtra, el material filtrado se ultrafiltra a través de un AMICON® YM30 (límite de exclusión 30.000 Da), el material retenido se cromatografía a través de una columna con Sephadex® G50 y las fracciones de productos se liofilizan.

20 Prescripción general de trabajo (AAV) V: Preparación de conjugados de una halógeno-acetamida y SH

3 mmol de la halógeno-acetamida en 15 ml de DMF se añaden gota a gota a 2,5 mmol del componente de SH en 15-150 ml de DMF y se agitan durante ocho horas a la temperatura ambiente. La solución de la tanda se filtra, el material filtrado se ultrafiltra a través de un AMICON® YM30 (límite de exclusión 30.000 Da), el material retenido se cromatografía a través de una columna con Sephadex® G50 y las fracciones de productos se liofilizan.

Ejemplo 1

a) (S)-Éster terc.-butílico de ácido (2-hidroxi-1-metil-etil)-carbámico

30 10,50 g (140 mmol) de (S)-(+)-2-amino-1-propanol se disolvieron en 110 ml de THF y se enfriaron a 0°C. A esta solución agitada se le añadió gota a gota una solución de 30,2 g (139 mmol) de dicarbonato de di-terc.-butilo en 45 ml de THF. La mezcla de reacción se agitó durante 90 minutos a 25°C y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio. El residuo se recogió en 300 ml de di-éter y a continuación se lavó con 90 ml de una solución 0,01 M de HCl. La fase orgánica se secó mediante sulfato de sodio y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio y en una bomba de aceite. El producto en bruto (20,4 g) se empleó sin más purificación para la siguiente reacción.

b) (S)-Éster 2-terc.-butoxicarbonilamino-propílico de ácido metanosulfónico

40 20,3 g (116 mmol) del compuesto 1a se disolvieron en 125 ml de diclorometano y se mezclaron con 17,7 g (175 mmol) de trietilamina. A 0°C se añadió gota a gota a esto una solución de 14,7 g (128 mmol) de cloruro de ácido metanosulfónico en 30 ml de diclorometano. La solución de reacción se agitó a 0°C durante 2 h y a continuación se mezcló con 300 ml de agua. La fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo dos veces con 150 ml de diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron una vez con 150 ml de una solución 0,1 M de HCl, dos veces en cada caso con 150 ml de una solución al 5 % de hidrógenocarbonato de sodio y finalmente con 50 ml de una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio. La solución se concentró por evaporación y se separó por cristalización en un armario frigorífico. Los cristales se lavaron con hexano frío. Resultaron 25,4 g (100 mmol) del producto deseado.

50 EM-FAB: 254 ($M^+ + 1,13$)

c) (S)-Éster terc.-butílico de ácido (2-azido-1-metil-etil)-carbámico

55 Una solución de 20,3 g (100 mmol) del compuesto 1b en 155 ml de DMSO se mezclaron con 7,8 g (120 mmol) de aziduro de sodio y se agitaron durante 24 h a 45°C. Se añadieron a esto 250 ml de una mezcla de agua y hielo. La mezcla se extrajo múltiples veces con 200 ml de diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron dos veces con 50 ml de una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se concentró por evaporación. Se obtuvieron 11,4 g de l producto en bruto. El producto en bruto se empleó sin más purificación para la siguiente reacción.

60 EM-FAB: 201 ($M^+ + 1,23$)

d) (S)-Éster terc.-butílico de ácido (2-amino-1-metil-etil)-carbámico

65 Una solución agitada de 11,4 g (57 mmol) del compuesto 1c en 165 ml del éster etílico de ácido acético se mezclaron con 1,8 g de Pd/C (al 10 %) y se sometieron durante 15 h a una atmósfera de hidrógeno de 4 bares. El catalizador se separó por filtración (a través de una denominada frita G4). El material filtrado se concentró por

evaporación en un evaporador rotatorio y se purificó mediante cromatografía en columna (en presencia de SiO₂ – con diclorometano $\oplus$ diclorometano : metanol 1:1). Se obtuvo el producto deseado con un rendimiento de 73 % (7,25 g; 42 mmol).

EM-FAB: 175 (M⁺ +1,29)

e) (S,S)-{Éster terc.-butílico de ácido 2-[2-terc.-butoxicarbonilamino-3-(4-nitro-fenil)-propionilamino]-1-metil-etil}-carbámico

Una solución agitada de 7,2 g (41 mmol) del compuesto 1d, 245 ml de agua y 245 ml de diclorometano se mezclaron con 12,9 g (42 mmol) de (S)-ácido 2-terc.-butoxicarbonilamino-3-(4-nitro-fenil)-propiónico obtenible comercialmente (de Bachem) y 6,4 g (42 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol - H₂O (HOBt). La solución se enfrió a 0 °C y se mezcló con 8,8 g (46 mmol) de 1-(dimetil-aminopropil)-3-etil-carbodiimida (EDCI). La solución de reacción se agitó durante siete horas a 0 °C, durante 12 horas a la temperatura ambiente y durante 24 horas a 60 °C. La solución se enfrió a la temperatura ambiente. La fase acuosa se separó y se extrajo múltiples veces con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una solución al 5 % de hidrógenocarbonato de sodio y con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Se secó mediante sulfato de sodio y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio. El residuo se mezcló con hexano, se trituró, se filtró con succión y se lavó posteriormente con hexano frío. El material sólido se secó en vacío a 30 °C. Se obtuvo el producto 1e deseado con un rendimiento de 77 % (14,9 g; 32 mmol).

EM-FAB: 467 (M⁺ +1,38)

f) (S,S)-N-(2-amino-propil)-3-(4-nitro-fenil)-propano-1,2-diamina

14,9 g (32 mmol) del compuesto 1e se suspendieron en 180 ml de diclorometano. A continuación, se añadieron gota a gota a esto 54,2 g (475 mmol) de ácido trifluoroacético. La solución se agitó durante una hora y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio. Se añadió a esto diclorometano y se concentró otra vez por evaporación. Se añadió a esto dietil-éter. El material sólido que había precipitado, se separó y se lavó con dietil-éter frío. El material sólido se secó en vacío a 35 °C. A una solución agitada de este material sólido (17,7 g) en 225 ml de THF absoluto se le añadieron gota a gota 225 ml (1 M) de un compuesto complejo de borano y tetrahidrofurano. La solución de reacción se calentó durante 6 h bajo reflujo y a continuación se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. Se añadieron con precaución 60 ml de metanol y se agitó durante otras 2 h. La solución se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio y se mezcló con 150 ml de etanol. Se introdujo HCl gaseoso, de tal manera que precipitó un material sólido. Se concentró por evaporación y se mezcló con dietil-éter seco. El material sólido se separó, se lavó con dietil-éter y se secó en vacío a 40 °C. Se obtuvieron 9,61 g (~26,6 mmol) del producto 1f deseado en forma del trihidrocloruro.

EM-FAB: 253 (M⁺ +1,28)

g) (S,S)-Éster terc.-butílico de ácido {[2-[(2-(bis-terc.-butoxicarbonilmetil-amino)-propil]-terc.-butoxicarbonilmetil-amino]-1-(4-nitro-bencil)-etil]-terc.-butoxicarbonilmetil-amino}-acético

A una solución agitada de 9,6 g (27 mmol) del compuesto 1f en 290 ml de acetonitrilo y 60 ml de agua se le añadieron gota a gota 43,8 g (317 mmol) de carbonato de potasio y 39 g (200 mmol) del éster terc.-butílico de ácido bromoacético. La solución se calentó durante ~ 7 h a 70 °C. Se añadieron otros 13,1 g (94 mmol) de carbonato de potasio y 8,8 ml (60 mmol) del éster terc.-butílico de ácido bromoacético. La solución se agitó durante ~ 7 h a 70 °C. La solución de reacción se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio, se lavó con agua y se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secaron mediante sulfato de sodio y se concentraron por evaporación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (en presencia de SiO₂ - diclorometano $\oplus$ diclorometano : metanol 98:2). Se obtuvo el producto 1g deseado con un rendimiento de 54 % (23,2 g; 42 mmol).

EM-FAB: 824 (M⁺ +1,58)

h) (S,S)-Ácido {[2-[(2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-1-(4-nitro-bencil)-etil]-carboximetil-amino}-acético

A una solución agitada de 14,8 g (130 mmol) de ácido trifluoroacético, 25,5 g (300 mmol) de diclorometano y 2,9 g (25 mmol) de trietilsilano se le añadieron 1,65 g (2 mmol) del compuesto 1g. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio y en una bomba de aceite. El residuo se mezcló con dietil-éter. El material sólido se separó por filtración y se lavó con dietil-éter. Se obtuvo el producto 1h deseado con un rendimiento de 99 % (1,0 g; 1,99 mmol).

EM-FAB: 543 (M⁺ +1,59)

Ejemplo 2

(S,S)-Éster terc.-butílico de ácido {[2-(4-amino-fenil)-1-[(2-(bis-terc.-butoxicarbonilmetil-amino)-propil]-terc.-butoxicarbonilmetil-amino)-metil]-etil]-terc.-butoxicarbonilmetil-amino}-acético

A una solución de 0,5 g (0,6 mmol) del compuesto 1g en 10 ml de isopropanol se le añadieron 0,2 g de Pd/C (al 10 %). La atmósfera sobre la solución de reacción fue provista de hidrógeno. La solución se agitó durante 5 h, se filtró y se concentró por evaporación. Se obtuvo el producto 2 deseado con un rendimiento de 81 % (397 mg; 0,5 mmol).

EM-FAB: 795 ($M^+ + 1,63$)

Ejemplo 3

(S,S)-Ácido [(1-(4-amino-bencil)-2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-etil)-carboximetil-amino]-acético

Método A: A una solución de 0,5 g (0,9 mmol) del compuesto 1h en 10 ml de isopropanol se le añadieron 0,2 g de Pd/C (al 10 %). La atmósfera sobre la solución de reacción fue provista de hidrógeno. La solución se agitó durante 5 h, se filtró y se concentró por evaporación. Se obtuvo el producto 3 deseado con un rendimiento de 87 % (410 mg; 0,78 mmol).

EM-FAB: 513 ($M^+ + 1,43$)

Método B: A una solución agitada de 3,64 g (32 mmol) de ácido trifluoroacético, 6,38 g (75 mmol) de diclorometano y 0,7 g (6 mmol) de trietilsilano se le añadieron 397 mg (0,5 mmol) del compuesto 2. La solución de reacción se agitó durante 1 h y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio y en una bomba de aceite. El residuo se mezcló con dietil-éter. El material sólido se separó por filtración y se lavó con dietil-éter. Se obtuvo el producto 3 deseado con un rendimiento de 99 % (253 mg; 0,5 mmol).

EM-FAB: 513 ($M^+ + 1,48$)

Ejemplo 4

(S,S)-Ácido [(2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-1-[4-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-bencil]-etil)-carboximetil-amino]-acético

A una solución agitada de 1,02 g (2 mmol) del compuesto 3 y 774 mg (6 mmol) de diisopropiletilamina en 20 ml de DMF se le añadieron a 0°C 800 mg (3 mmol) del éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilico de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propiónico (de Aldrich). La solución de reacción se agitó durante 4 horas a la temperatura ambiente. La solución se añadió gota a gota a 120 ml de dietil-éter agitado enérgicamente. La suspensión se agitó durante 30 minutos y se filtró. El residuo se secó en una bomba de aceite. Una parte del residuo se purificó mediante una RP-HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento en fase inversa) semipreparativa.

EM-FAB: 664 ($M^+ + 1,24$)

Ejemplo 5

(S,S)-Ácido [(1-(4-isotiocianato-bencil)-2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-etil)-carboximetil-amino]-acético

A un sistema de dos fases agitado enérgicamente a base de 0,51 g (1 mmol) del compuesto 3, 3 ml de agua, 605 mg (6 mmol) de trietilamina y 3 ml de cloroformo se le añadieron gota a gota a 0°C 114 mg (1 mmol) de tiofosgeno en un poco de cloroformo. La solución se agitó durante 3 horas. La fase orgánica se separó. La fase orgánica se extrajo dos veces con agua. Las fases acuosas reunidas se lavaron con diclorometano, se diluyeron con agua y se liofilizaron. La sustancia se ensayó en cuanto a la pureza mediante una HPLC: HyPurity C18 (5 μ m, 150 x 3,0 mm) con un gradiente de acetonitrilo : agua : ácido trifluoroacético (3 : 96,9 : 0,1 $\rightarrow$ 99,9 : 0 : 0,1). Se obtuvo el producto 5 deseado con un rendimiento de 91 % (505 mg, 910 μ mol).

EM-FAB: 555 ($M^+ + 1,39$)

Ejemplo 6

(S,S)-Ácido [(2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-1-[4-(2-bromo-acetilamino)-bencil]-etil)-carboximetil-amino]-acético

A una solución de 0,51 g (1 mmol) del compuesto 3 y 606 mg (6 mmol) de trietilamina en 10 ml de DMF se le añadieron a -20°C 202 mg (1,1 mmol) de bromuro de ácido bromoacético. La solución de reacción se agitó durante una hora a la temperatura ambiente. La solución se vertió en dietil-éter agitado enérgicamente. El material precipitado se separó por filtración, se recogió en agua y se liofilizó inmediatamente. La sustancia se ensayó en cuanto a la pureza mediante una HPLC: HyPurity C18 (5 μ m, 150 x 3,0 mm) con un gradiente de acetonitrilo : agua : ácido trifluoroacético (3 : 96,9 : 0,1 $\rightarrow$ 99,9 : 0 : 0,1). Se obtuvo el producto 6 deseado con un rendimiento de 82 % (520 mg, 820 μ mol).

EM-FAB: 634 ($M^+ + 1,46$)

Ejemplo 7**(S,S)-Ácido {(2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-1-[4-(2-yodo-acetilamino)-bencil]-etil]-carboximetil-amino)-acético**

A una solución de 0,51 g (1 mmol) del compuesto 3 y 606 mg (6 mmol) de trietilamina en 10 ml de DMF se le añadieron a -20°C 274 mg (1,1 mmol) de bromuro de ácido yodoacético. La solución de reacción se agitó durante una hora a la temperatura ambiente. La solución se vertió en un dietil-éter agitado enérgicamente. El material precipitado se separó por filtración, se recogió en agua y se liofilizó inmediatamente. La sustancia se ensayó en cuanto a la pureza mediante una HPLC: HyPurity C18 (5 µm, 150 x 3,0 mm) con un gradiente de acetonitrilo : agua : ácido trifluoroacético (3 : 96,9 : 0,1 → 99,9 : 0 : 0,1). Se obtuvo el producto 7 deseado con un rendimiento de 88 % (600 mg, 880 µmol).
EM-FAB: 681 (M⁺ +1,32)

Ejemplo 8**(S,S)-Ácido {(2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-1-[4-(2-yodo-acetilamino)-bencil]-etil]-carboximetil-amino)-acético**

A una solución de 0,51 g (1 mmol) del compuesto 3 y 606 mg (6 mmol) de trietilamina en 10 ml de DMF se le añadieron a -20°C 125 mg (1,1 mmol) de cloruro de ácido cloroacético. La solución de reacción se agitó durante una hora a la temperatura ambiente. La solución se vertió en dietil-éter agitado enérgicamente. El material precipitado se separó por filtración, se recogió en agua y se liofilizó inmediatamente. La sustancia se ensayó en cuanto a la pureza mediante una HPLC: HyPurity C18 (5 µm, 150 x 3,0 mm) con un gradiente de acetonitrilo : agua : ácido trifluoroacético (3 : 96,9 : 0,1 → 99,9 : 0 : 0,1). Se obtuvo el producto 8 deseado con un rendimiento de 82 % (520 mg, 820 µmol).
EM-FAB: 590 (M⁺ +1,31)

Ejemplo 9**(S,S)-Ácido {(2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-1-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-bencil]-etil]-carboximetil-amino)-acético**

Apoyándose en la cita de *Tetrahedron Lett.*; 38; 46; 1997; 8089-8092:

Una mezcla de aproximadamente 1 g de gel de sílice secado, 100 mg (1,0 mmol) de anhídrido de ácido maleico, 512 mg (1,0 mmol) del compuesto 3 y 35,6 mg (0,1 mmol) de cloruro de tántalo(V) se calentaron en un horno de microondas (300 W) durante 5 min. El residuo se eluyó a través de una frita con metanol. El material filtrado se concentró por evaporación. El residuo se recogió en agua. La solución se liofilizó. Una parte del residuo se purificó mediante una RP-HPLC semipreparativa con una mezcla de acetonitrilo y agua (20:80). La sustancia se ensayó en cuanto a la pureza mediante una HPLC: HyPurity C18 (5 µm, 150 x 3,0 mm) con un gradiente de acetonitrilo : agua : ácido trifluoroacético (3 : 96,9 : 0,1 → 99,9 : 0 : 0,1). Se obtuvo el producto 9 deseado con 94 mg (0,16 mmol) en una pureza de 96 %
EM-FAB: 593 (M⁺ +1,42)

Ejemplo 10**Conjugado con un anticuerpo del producto del Ejemplo 4, a saber el (S,S)-ácido [(2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-1-[4-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-bencil]-etil]-carboximetil-amino)-acético**

200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 159 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 4, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37°C. Se purificó a través de una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

Ejemplo 11**(S,S)-Ácido {(2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-1-[4-[3-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-etil]-tioureido]-bencil]-etil]-carboximetil-amino)-acético**

A una solución agitada de 555 mg (1 mmol) del compuesto 5 en 5 ml de DMF se le añadió gota a gota una solución de 154 mg (1,1 mmol) de 1-(2-amino-etil)-pirrol-2,5-diona en 2 ml de dioxano. La solución de reacción se agitó durante una noche y se añadió gota a gota a 80 ml de dietil-éter agitado enérgicamente. El material precipitado se

separó por filtración y se recogió en agua. La solución se liofilizó. Una parte del residuo se purificó mediante una RP-HPLC semipreparativa con una mezcla de acetonitrilo y agua (20:80). La sustancia se ensayó en cuanto a la pureza mediante una HPLC: HyPurity C 18 (5 µm, 150 x 3,0 mm) con un gradiente de acetonitrilo: agua: ácido trifluoroacético (3:96,9:0,1 → 99,9:0:0,1). Se obtuvo el producto 11 deseado con 0,104 g (0,15 mmol) en una alta pureza.

EM-FAB: 696 (M⁺ +1,33)

Ejemplo 12

Compuesto complejo con indio del conjugado con un anticuerpo del producto del Ejemplo 4, a saber el (S,S)-ácido [(2-[(2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino)-1-{4-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-bencil}-etil)-carboximetil-amino]-acético

200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 159 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 11, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37 °C. La solución tamponadora de borato se intercambió por un tampón de acetato, dializando la solución de muestra tres veces durante 1 h en el Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (procedimiento de diálisis) en cada caso frente a 200 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). Finalmente se dializó durante una noche frente a 400 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). La solución se mezcló con 80 µl (0,05 M en HCl) de [¹¹¹In]InCl₃ (27,88 MBq) y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

Ejemplo 13

Compuesto complejo con itrio del conjugado con un anticuerpo del (1'R,2R,5S)-ácido 5-[[2-[(1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentil]-carboximetil-amino)-etil]-carboximetil-amino]-metil]-1-carboximetil-pirrolidina-2-carboxílico

200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 159 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 11, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37 °C. La solución tamponadora de borato se intercambió por un tampón de acetato dializando la solución de muestra tres veces durante 1 h en el Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (procedimiento de diálisis) en cada caso frente a 200 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). Finalmente, se dializó durante una noche frente a 400 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6). La solución se mezcló con 50 MBq de [⁹⁰Y]YCl₃ y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

Ejemplo 14

Compuesto complejo con escandio del conjugado con un anticuerpo del (1'R,2R,5S)-ácido 5-[[2-[(1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentil]-carboximetil-amino)-etil]-carboximetil-amino]-metil]-1-carboximetil-pirrolidina-2-carboxílico

200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 159 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 11, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37 °C. La solución tamponadora de borato se intercambió por un tampón de acetato dializando la solución de muestra tres veces durante 1 h en el Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (procedimiento de diálisis) en cada caso frente a 200 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). Finalmente se dializó durante una noche frente a 400 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6). La solución se mezcló con 50 MBq de [⁴⁷Sc]ScCl₃ y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

Ejemplo 15

Compuesto complejo con lutecio del conjugado con un anticuerpo del (1'R,2R,5S)-ácido 5-([2-([1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentil]-carboximetil-amino)-etil]-carboximetil-amino)-metil]-1-carboximetil-pirrolidina-2-carboxílico

200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 159 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 11, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37 °C. La solución tamponadora de borato se intercambió por un tampón de acetato dializando la solución de muestra tres veces durante 1 h en el Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (procedimiento de diálisis) en cada caso frente a 200 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). Finalmente se dializó durante una noche frente a 400 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6). La solución se mezcló con 50 MBq de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

Ejemplo 16

a) (S)-Éster bencílico de ácido 6-benciloxycarbonilamino-2-(2-terc.-butoxycarbonilamino-acetilamino)-hexanoico

A una solución agitada de 2,15 g (12,28 mmol) de Boc-Gly-OH y 4,08 ml (29,5 mmol) de trietilamina en 50 ml de diclorometano se le añadieron 1,55 g (13,5 mmol) de N-hidroxi-succinimida. Después de 20 min se añadieron 5 g (12,3 mmol) del hidrocloreto de H-Lys-(Z)-OBzl, que se disolvió en un poco de diclorometano, y 2,78 g (13,5 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida en un poco de diclorometano. La solución se agitó durante tres días y se vertió en 250 ml de una mezcla de agua y hielo. La fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo múltiples veces con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secaron mediante sulfato de sodio y se concentraron por evaporación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (en presencia de SiO₂ hexano: acetato de etilo 4:1 ⇌ hexano: acetato de etilo 1:1). Se obtuvo el producto 16a deseado con un rendimiento de 96 % (6,2 g; 11,7 mmol).
EM-FAB: 528 (M⁺ +1,75)

b) (S)-Éster bencílico de ácido 6-benciloxycarbonilamino-2-(2-[2-(2-terc.-butoxycarbonilamino-acetilamino)-acetilamino]-acetilamino)-acetilamino]-hexanoico

A una solución de 6,2 g (11,7 mmol) del compuesto 16a en 30 ml de diclorometano se le añadieron gota a gota a 0 °C 30 ml de ácido trifluoroacético. La solución se agitó durante 2 horas a la temperatura ambiente y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio. Se añadieron 50 ml de agua y 50 ml de tolueno y se concentró otra vez por evaporación en un evaporador rotatorio. La última etapa de trabajo se repitió tres veces. Finalmente se concentró por evaporación en una bomba de aceite.

Una solución agitada del residuo en 90 ml de diclorometano se mezcló a 0 °C con 2,37 g (18,3 mmol) de diisopropiletildiamina, 3,02 g (14,7 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida, disueltos en un poco de diclorometano, 1,69 g (14,7 mmol) de N-hidroxi-succinimida y 3,4 g (14,7 mmol) de Boc-Gly-Gly-OH. La suspensión se agitó durante tres días a la temperatura ambiente y se mezcló con 150 ml de una mezcla de agua y hielo. La fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo múltiples veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró por evaporación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (en presencia de SiO₂ acetato de etilo ⇌ metanol : acetato de etilo 15:85). Se obtuvo el producto 16b deseado con un rendimiento de 53 % (4,18 g; 6,5 mmol).
EM-FAB: 643 (M⁺ +1,56)

c) (S)-Ácido 2-[2-[2-(2-terc.-butoxycarbonilamino-acetilamino)-acetilamino]-acetilamino]-6-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-hexanoico

A una solución de 4,18 g (6,5 mmol) del compuesto 16b en 40 ml de isopropanol se le añadió 1 g de Pd/C (al 10 %). La atmósfera sobre la solución agitada se saturó con hidrógeno. La solución de reacción se agitó durante 90 min, se filtró y se concentró por evaporación.

El residuo se mezcló a 0 °C con 20 ml de DMF, 1,5 g (12 mmol) de diisopropiletildiamina y 2,4 mg (9 mmol) del éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ílico de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propiónico (de Aldrich). La solución de reacción se agitó durante 4 horas a la temperatura ambiente. La solución se añadió a una solución de HCl (de pH 4) y se extrajo múltiples veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron por evaporación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (en presencia de SiO₂ acetato de etilo ⇌ metanol : acetato de etilo 20:80). Se obtuvo el producto 16c deseado con un rendimiento de 67 % (2,5 g; 4,4 mmol).
EM-FAB: 570 (M⁺ +1,31)

d) (1S,1'S,4S)-1-[4-{3-[[[({1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentilcarbamoíl)-metil]-carbamoíl)-metil]carbamoíl)-metil]-tioureido}}]-bencil-4-metil-DTPA

5 A una solución agitada de 570 mg (1 mmol) del compuesto 16c en 5 ml de diclorometano se le añadieron gota a gota a 0°C 5 ml de ácido trifluoroacético. La solución se agitó durante 2 h a la temperatura ambiente y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio. El residuo se extrajo con di etil-éter. Finalmente se concentró por evaporación en una bomba de aceite.

10 El residuo se recogió en DMF y se mezcló con ~ 200 mg (~ 2 mmol) de trietilamina y 505 mg (0,9 mmol) del compuesto 5. La solución se agitó durante 3 horas a 40°C y se añadió gota a gota a dietil-éter agitado enérgicamente. El material precipitado se separó por filtración y se purificó por cromatografía en columna en RP (fase inversa).

EM-FAB: 1016 (M⁺ +1,31)

15 Ejemplo 17

Compuesto complejo con gadolinio del (S,S)-ácido [(1-(4-amino-bencil)-2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-etil)-carboximetil-amino]-acético

20 128,1 mg (0,25 mmol) del compuesto 3 se suspendieron en 4 ml de agua destilada, se calentaron a 80°C y se disolvieron. Se mezcló en porciones con 45,3 mg (0,125 mmol) de Gd₂O₃. La suspensión se calentó a 80°C y se agitó durante una hora. La solución se enfrió a la temperatura ambiente y se ajustó con una lejía de sosa (1M) a un pH = 7. Se eliminó el agua mediante liofilización. Se obtuvo el producto deseado con 166,6 mg (0,25 mmol, 99,8 %).

EM-FAB: (M⁺ +1,21): 668

25

Ejemplo 18

Conjugado con un anticuerpo de (1S,1'S,4S)-1-[4-{3-[[[({1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentilcarbamoíl)-metil]carbamoíl)-metil]-carbamoíl)-metil]-tioureido}}]-bencil-4-metil-DTPA

30 200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, entonces éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 243 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 16d, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37°C. Se purificó a través de una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

35

Ejemplo 19

Compuesto complejo con itrio del conjugado con un anticuerpo de (1S,1'S,4S)-1-[4-{3-[[[({1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentilcarbamoíl)-metil]-carbamoíl)-metil]-carbamoíl)-metil]-tioureido}}]-bencil-4-metil-DTPA

45 200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, entonces éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 243 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 16d, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37°C. La solución tamponadora de borato se intercambió por un tampón de acetato dializando la solución de muestra tres veces durante 1 h en el Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (procedimiento de diálisis) en cada caso frente a 200 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). Finalmente se dializó durante una noche frente a 400 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6). La solución se mezcló con 50 MBq de [⁹⁰Y]YCl₃ y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

55

Ejemplo 20

Compuesto complejo con escandio del conjugado con un anticuerpo de (1S,1'S,4S)-1-[4-{3-[[[({1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentilcarbamoíl)-metil]-carbamoíl)-metil]-carbamoíl)-metil]-tioureido}}]-bencil-4-metil-DTPA

60 200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, entonces éstos pueden ser producidos

65

mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 243 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 16d, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37°C. La solución tamponadora de borato se intercambió por un tampón de acetato dializando la solución de muestra tres veces durante 1 h en el Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (procedimiento de diálisis) en cada caso frente a 200 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). Finalmente se dializó durante una noche frente a 400 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). La solución se mezcló con 50 MBq de [⁴⁷Sc]ScCl₃ y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

Ejemplo 21

Complejo con lutecio del conjugado con un anticuerpo de (1S,1'S,4S)-1-[4-{3-[[[1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentilcarbamoil]-metil]-carbamoil]-metil]-carbamoil]-metil]-tioureido]]-bencil-4-metil-DTPA

200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, entonces éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 243 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 16d, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37°C. La solución tamponadora de borato se intercambió por un tampón de acetato dializando tres veces la solución de muestra durante 1 h en el Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (procedimiento de diálisis) en cada caso frente a 200 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). Finalmente se dializó durante una noche frente a 400 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6). La solución se mezcló con 50 MBq de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

Ejemplo 22

(R,R)-Ácido {[2-{2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino}-1-(4-nitro-bencil)-etil]-carboximetil-amino}-acético

La síntesis del Ejemplo 22 se llevó a cabo de una manera análoga a la del Ejemplo 1, con la diferencia de que no se empleó el (S)- sino el (R)-2-amino-1-propanol, y tampoco se empleó el (S)-ácido sino el (R)-ácido 2-terc.-butoxicarbonilamino-3-(4-nitro-fenil)-propiónico como eslabón. Se obtuvo el producto 22 deseado en una alta pureza (> 96 %, RP-HPLC).
EM-FAB: 513 (M⁺ +1,42)

Ejemplo 23

(R,R)-Ácido [(1-(4-amino-bencil)-2-{2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino}-etil)-carboximetil-amino]-acético

La síntesis del Ejemplo 23 se llevó a cabo de una manera análoga a la del Ejemplo 3 método A, con la diferencia de que como educto (producto de partida) no se empleó el compuesto 1h, sino el 22. Se obtuvo el producto 23 deseado con un rendimiento de 96 %.
EM-FAB: 513 (M⁺ +1,42)

Ejemplo 24

(R,R)-Éster terc.-butílico de ácido {[2-(4-amino-fenil)-1-([2-(bis-terc.-butoxicarbonilmetil-amino)-propil]-terc.-butoxicarbonilmetil-amino)-metil]-etil]-terc.-butoxicarbonilmetil-amino}-acético

La síntesis del Ejemplo 24 se llevó a cabo de una manera análoga a la del Ejemplo 2, con la diferencia de que como educto no se empleó el compuesto 1g, sino el correspondiente compuesto precursor procedente de la síntesis del compuesto 22. Se obtuvo el producto 24 deseado con un rendimiento de 86 %.
EM-FAB: 794 (M⁺ +1,53)

Ejemplo 25

(R,R)-Ácido [(1-(4-isotiocianato-bencil)-2-{2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino}-etil)-carboximetil-amino]-acético

La síntesis del Ejemplo 25 se llevó a cabo de una manera análoga a la del Ejemplo 5, con la diferencia de que como educto no se empleó el compuesto 3 sino el compuesto 23. Se obtuvo el producto 25 deseado con un rendimiento de 74 %.

EM-FAB: 555 ($M^+ + 1,33$)

Ejemplo 26

(R,R)-Ácido ({2-[[2-(bis-carboximetil-amino)-propil]-carboximetil-amino]-1[4-(2-bromo-acetilamino)-bencil]-etil]-carboximetil-amino)-acético

La síntesis del Ejemplo 26 se llevó a cabo de una manera análoga a la del Ejemplo 6, con la diferencia de que como educto no se empleó el compuesto 3 sino el compuesto 23. Se obtuvo el producto 23 deseado con un rendimiento de 71 %.

EM-FAB: 590 ($M^+ + 1,48$)

Ejemplo 27

a) Ácido N-[4-(2-(bis-carboximetil-amino)-3-[[2-(bis-carboximetil-amino)propil]-carboximetil-amino]-propil)-fenil]-succinámico

A una solución de 793 mg (1 mmol) del compuesto 24 y 0,28 ml (~ 2 mmol) de diisopropiletilamina en 20 ml de THF se le añadieron 200 mg (2 mmol) de anhídrido de ácido succínico. La solución se agitó durante 2 h a la temperatura ambiente. La solución se concentró por evaporación hasta un tercio del volumen, se diluyó con diclorometano, y se añadió a una solución acuosa (de pH = 4,5). La fase acuosa se separó y se extrajo múltiples veces con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una solución de cloruro de sodio. Se secó con sulfato de sodio y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio. El residuo se purificó por cromatografía en columna (en presencia de una mezcla de CH_2Cl_2 y MeOH). El producto 27a deseado se obtuvo con un rendimiento de 85 % (0,85 mmol).

EM-FAB: 613 ($M^+ + 1,58$)

b) (1R,1'S,4R)-1-[4-(3-[[[1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentilcarbamoil]-metil]-carbamoil]-metil]carbamoil]-metil]-carbamoil]-propionil]-bencil-4-metil-DTPA

A una solución agitada de 570 mg (1 mmol) del compuesto 16c en 5 ml de diclorometano se le añadieron gota a gota a 0°C 5 ml de ácido trifluoroacético. La solución se agitó durante 2 h a la temperatura ambiente y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio. El residuo se extrajo por agitación con dietil-éter. Finalmente, se concentró en una bomba de aceite. El residuo se suspendió en diclorometano, se mezcló con 0,25 g (~ 2 mmol) de la base de Hünig, 304 mg (2 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol - H_2O (HOBT) y 122 mg (2 mmol) del compuesto 27a. La solución se enfrió a 0°C y se mezcló con 419 mg (21 mmol) de 1-(dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida (EDCI). La solución se agitó durante 12 horas y se vertió en una mezcla de agua y hielo. La fase acuosa se separó y se extrajo múltiples veces con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una solución de cloruro de sodio. Se secó con sulfato de sodio y se concentró por evaporación en un evaporador rotatorio. El residuo se purificó por cromatografía en columna (en presencia de una mezcla de CH_2Cl_2 y acetonitrilo). Se obtuvo con un rendimiento de 85 % (0,85 mmol) el producto deseado, que se recogió luego en 5 ml de diclorometano y 3 ml de anisol, y se mezcló con 5 ml de ácido trifluoroacético a 0°C. La solución se agitó durante 8 horas, se concentró por evaporación y se extrajo por agitación con dietil-éter. El producto 27b deseado se obtuvo con un rendimiento de 90 % (813,9 mg).

EM-FAB: 1064 ($M^+ + 1,38$)

Ejemplo 28

Conjugado con un anticuerpo de (1R,1'S,4R)-1-[4-(3-[[[1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentilcarbamoil]-metil]-carbamoil]-metil]-carbamoil]-propionil]-bencil-4-metil-DTPA

200 μg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, entonces éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 255 μg (240 nmol) del producto del Ejemplo 27b, disueltos en 50 μl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37°C. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

Ejemplo 29

Complejo con itrio del conjugado con un anticuerpo de (1R,1'S,4R)-1-[4-(3-[[[1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentilcarbamoil]-metil]-carbamoil]-metil]-carbamoil]-metil]carbamoil]-propionil]-bencil-4-metil-DTPA

200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, entonces éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 255 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 27b, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37°C. La solución tamponadora de borato se intercambiò por un tampón de acetato dializando la solución de muestra tres veces durante 1 h en el Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (procedimiento de diálisis) en cada caso frente a 200 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). Finalmente, se dializó durante una noche frente a 400 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6). La solución se mezcló con 50 MBq de [⁹⁰Y]YCl₃ y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

Ejemplo 30

Complejo con lutecio del conjugado con un anticuerpo de (1R,1'S,4R)-1-[4-(3-[[[1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentilcarbamoíl]-metil]-carbamoíl]-metil]-carbamoíl)-metil]carbamoíl]-propionil)-bencil-4-metil-DTPA

200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, entonces éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 255 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 27b, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37°C. La solución tamponadora de borato se intercambiò por un tampón de acetato dializando la solución de muestra tres veces durante 1 h en el Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (procedimiento de diálisis) en cada caso frente a 200 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). Finalmente, se dializó durante una noche frente a 400 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6). La solución se mezcló con 50 MBq de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

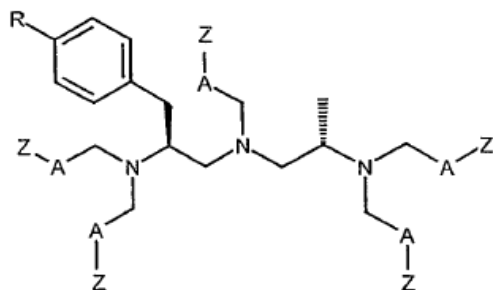
Ejemplo 31

Complejo con escandio del conjugado con un anticuerpo de (1R,1'S,4R)-1-[4-(3-[[[1-carboxi-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-pentilcarbamoíl]-metil]-carbamoíl]-metil]-carbamoíl)-metil]carbamoíl]-propionil)-bencil-4-metil-DTPA

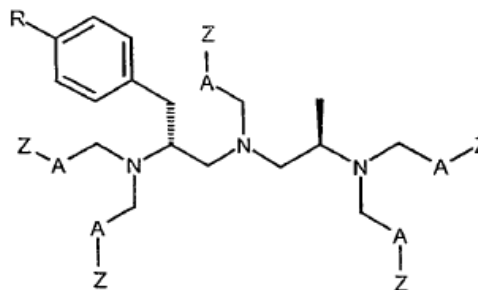
200 µg de un anticuerpo con grupos tiol libremente accesibles (p.ej. HuM195 (compárese la cita de Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; obtenible comercialmente de Protein Design Labs Inc., Mountainview CA, EE.UU.) - si el anticuerpo no posee grupos tiol libremente accesibles, entonces éstos pueden ser producidos mediante la utilización de 2-iminotiolano HCl (véase p.ej. el documento EP 0 607 222 B1)) se diluyeron en 1,2 ml de un tampón de borato (50 mM, de pH 8,5), se mezclaron con 255 µg (240 nmol) del producto del Ejemplo 27b, disueltos en 50 µl de un tampón de borato (véase más arriba), y se agitaron durante 3 horas a 37°C. La solución tamponadora de borato se intercambiò por un tampón de acetato dializando la solución de muestra tres veces durante 1 h en el Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (procedimiento de diálisis) en cada caso frente a 200 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6,0). Finalmente, se dializó durante una noche frente a 400 ml de un tampón de NaOAc 0,1 M (de pH 6). La solución se mezcló con 50 MBq de [⁴⁷Sc]ScCl₃ y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente. Se purificó sobre una columna NAP-5 (de Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, fase móvil: PBS).

REIVINDICACIONES

1. Conjugados de las fórmulas generales VIIa y VIIb



VII a



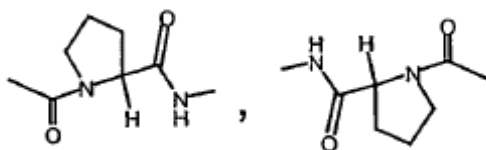
VII b

5 en las que

Z representa un átomo de hidrógeno o un equivalente de un ion metálico de un elemento con los números atómicos 21-29, 31, 32, 37-39, 42-44, 46, 47, 49, 58-71, 75, 77, 82 u 83,

A representa un grupo -COO,

10 **R** representa una biomolécula unida a través de un grupo funcional, o un radical alquilo de C₁-C₂₅ lineal o ramificado, saturado o insaturado y eventualmente interrumpido por uno hasta seis átomos de O, o respectivamente por grupos fenileno, -NHCO, -CONH-,

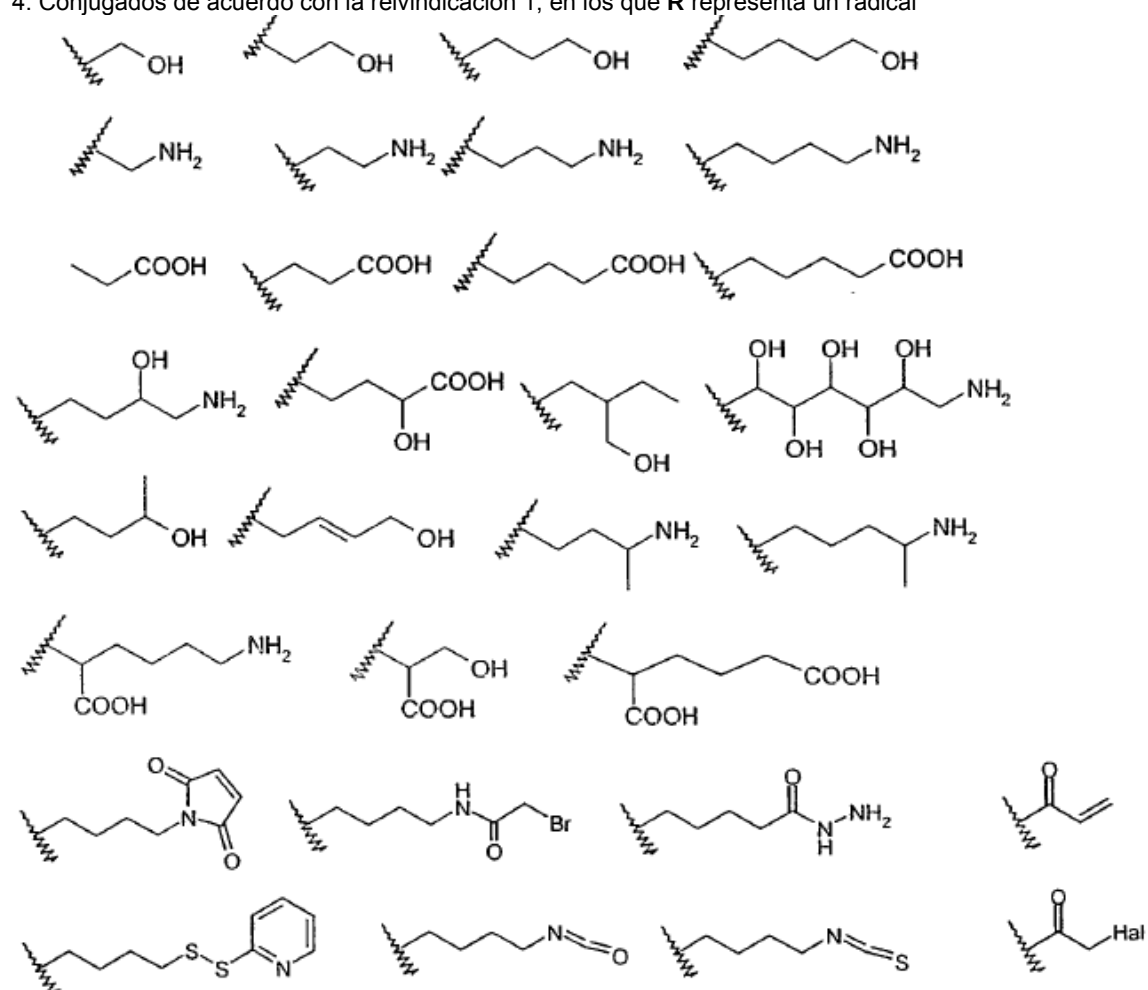


15 y/o -NH(C=S)-NH, que eventualmente está sustituido en un sitio arbitrario con uno hasta seis grupos carboxilo, grupos hidroxilo, grupos amino u otros grupos funcionales, a través de los cuales pueden estar unidas las biomoléculas, así como sus sales con bases orgánicas o inorgánicas, con las condiciones de que el radical alquilo ha de contener por lo menos una biomolécula unida a través de un grupo funcional y de que por lo menos dos **Z** han de representar un equivalente de un ion metálico.

20 2. Conjugados de acuerdo con la reivindicación 1, en los que por lo menos dos de los radicales **Z** representan un equivalente de un ion metálico de un elemento paramagnético con los números atómicos 21-29, 42, 44 y 58-70.

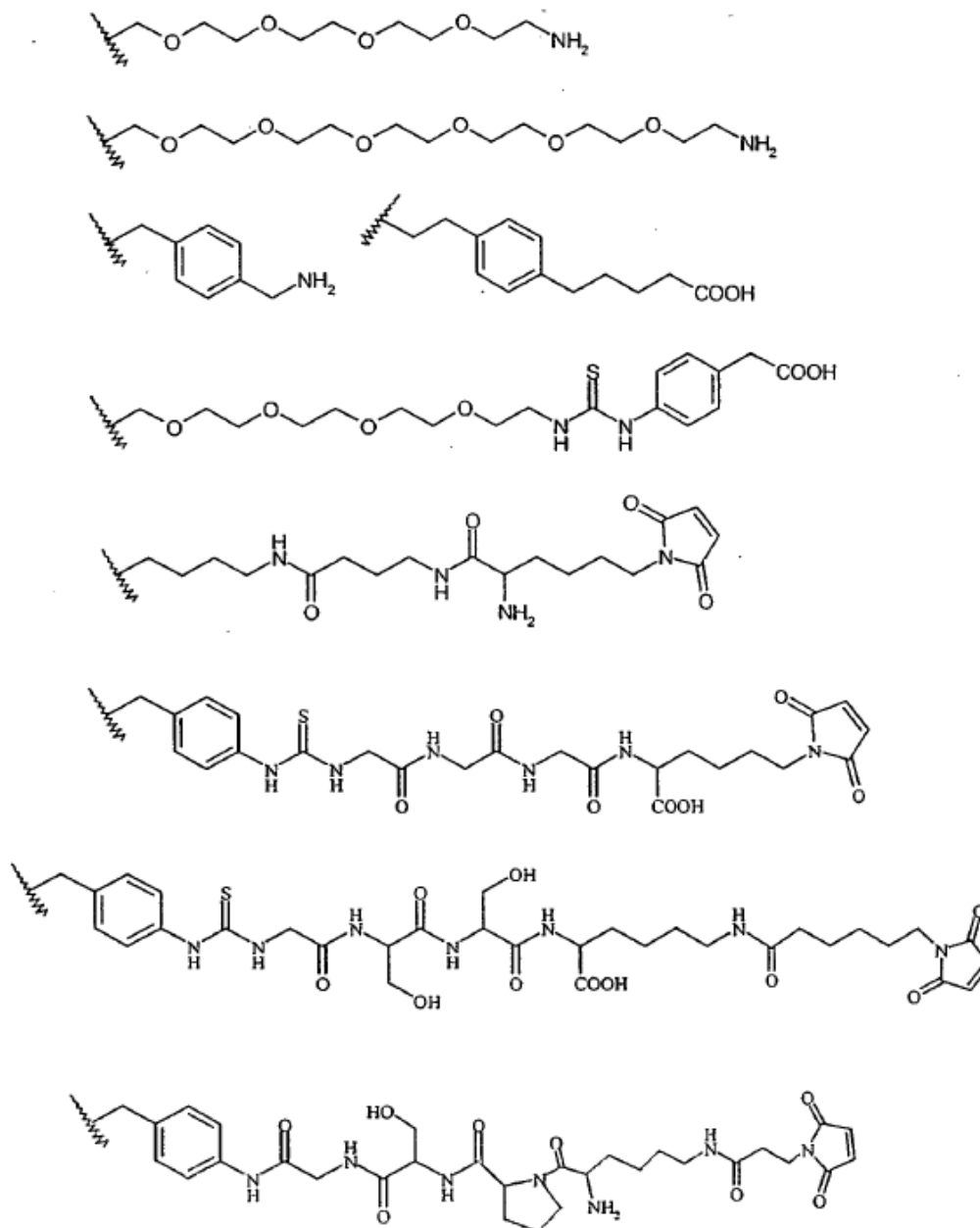
3. Conjugados de acuerdo con la reivindicación 1, en los que por lo menos dos de los radicales **Z** representan un
25 equivalente de un ion metálico de un elemento radiactivo con los números atómicos 26, 27, 29, 31, 32, 37-39, 43, 46, 47, 49, 61, 62, 64, 70, 71, 75, 77, 82 y 83.

4. Conjugados de acuerdo con la reivindicación 1, en los que **R** representa un radical



a través del cual está unida una biomolécula.

5. Conjugados de acuerdo con la reivindicación 1, en los que **R** representa un radical

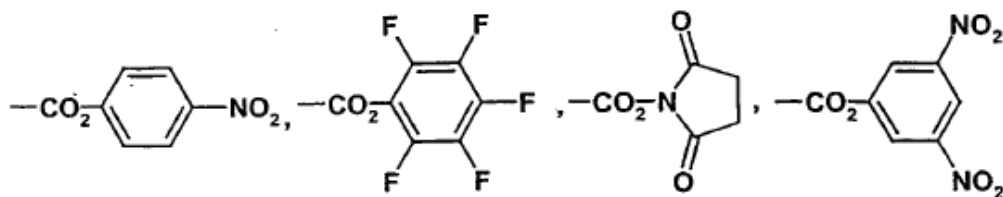


a través del cual está unida una biomolécula.

5

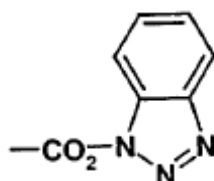
6. Conjugados de acuerdo con la reivindicación 1, en los que **R** representa un grupo carboxilo, carboxilo activado, amino, nitro, isocianato, isotiocianato, hidrazino, semicarbazido, tiosemicarbazido, cloroacetamido, bromoacetamido, yodoacetamido, acrílico, acilamino, de anhídridos mixtos, azido, de cloruro de ácido, de hidróxido, de cloruro de sulfonilo, vinilsulfono, carbodiimido, maleimido o diazo, a través del cual está unida una biomolécula.

7. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 6, en los que el grupo carboxilo activado se escoge entre el conjunto que se compone de



5

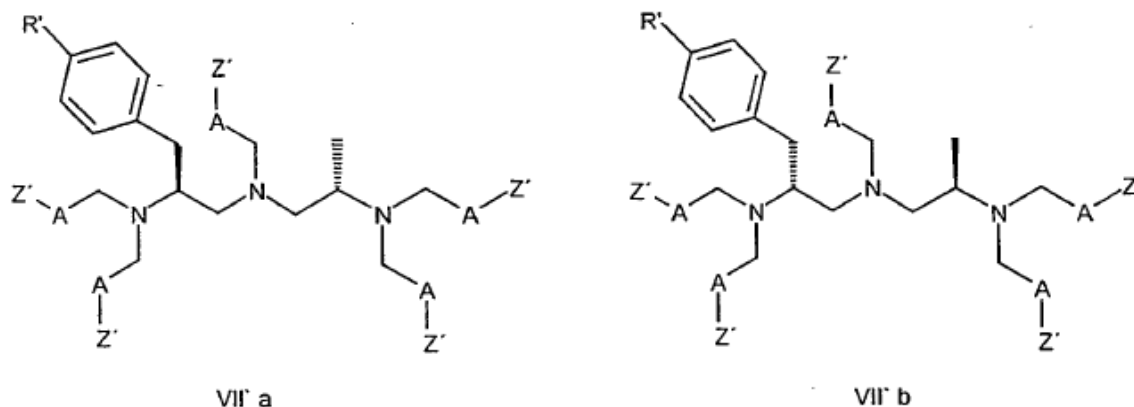
y



8. Conjugados de acuerdo con la reivindicación 1, en los que la biomolécula se escoge entre el conjunto que se compone de:

- 10 biopolímeros, proteínas, tales como las proteínas que tienen una función biológica, HSA, BSA, etc., proteínas y péptidos, que se enriquecen en determinados sitios en el organismo (p.ej. junto a receptores, membranas celulares, canales etc.), péptidos disociables por proteasas, péptidos con sitios sintéticos de rotura preestablecida (p.ej. ésteres y amidas lábiles, et c.), péptidos, que son disociados por metaloproteasas, péptidos con engarzadores fotodisociables, péptidos con grupos disociables con agentes oxidantes (oxidases), péptidos con aminoácidos naturales y no naturales, glicoproteínas (glicopéptidos), proteínas de señal, proteínas antivirales y apoptosis (de muerte celular programada), biopolímeros modificados sintéticamente, tales como unos biopolímeros derivatizados con engarzadores, metaloproteasas modificadas y oxidases derivatizadas, etc., hidratos de carbono (mono- hasta polisacáridos), tales como azúcares derivatizados, azúcares disociables en el organismo, ciclodextrinas y sus derivados, aminoazúcares, quitosano, polisulfatos y derivados de ácido acetilneuramínico, anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos policlonales, minicuerpos, cadenas únicas (también aquellas que están unidas con engarzadores para formar fragmentos múltiples), glóbulos rojos y otros componentes de la sangre, marcadores del cáncer (p.ej. CAA) y otras sustancias que median en la adhesión entre células (p.ej. Lewis X y derivados anti-Lewis X), fragmentos de ADN y ARN, tales como ADN's y ARN's derivatizados (p.ej. aquéllos que fueron encontrados por el procedimiento SELEX), ARN y ADN sintéticos (también con bases no naturales), PNAs (de Hoechst) y antisentido, β -aminoácidos (de Seebach), aminas vectoras para la infiltración en la célula, aminas biogénicas, compuestos farmacéuticos, preparados oncológicos, polímeros sintéticos, que están dirigidos hacia una diana biológica (p.ej. un receptor), esteroides (naturales y modificados), prostaglandinas, taxol y sus derivados, endotelinas, alcaloides, ácido fólico y sus derivados, lípidos bioactivos, grasas, ésteres de ácidos grasos, mono-, di- y triglicéridos modificados sintéticamente, liposomas, que están derivatizados en la superficie, micelas a base de ácidos grasos naturales o de compuestos de perfluoroalquilo, porfirinas, texafrinas, porfirinas ampliadas, citóchromos, inhibidores, neuraminidasas, neuropéptidos, inmunomoduladores, tales como FK 506, CAPE y gliotoxina, endoglicosidasas, sustratos que son activados por enzimas, tales como la calmodulina cinasa, la caseína cinasa II, la glutatión-S-transferasa, la heparinasa, metaloproteasas de la matriz, la cinasa del receptor β de insulina, la UDP-galactosa 4-epimerasa, fucosidasas, proteínas G, galactosidasas, glicosidasas, glicosil transferasas y la xilosidasa, antibióticos, vitaminas y compuestos análogos a vitaminas, hormonas, intercaladores de ADN, nucleósidos, nucleótidos, lectinas, vitamina B12, Lewis X y compuestos afines, psoralenos, antibióticos del tipo de dieno-trienos, carbacilinas, VEGF (acrónimo del inglés "vascular endothelial growth factor" (factor de crecimiento endotelial vascular)), somatostatina y sus derivados, derivados de biotina, antihormonas, proteínas específicas para tumores y compuestos sintéticos específicos para tumores, polímeros, que se enriquecen en zonas de carácter ácido o básico del cuerpo (distribución controlada por el valor del pH), mioglobinas, apomioglobinas, etc., péptidos de neurotransmisores, factores de necrosis tumoral, péptidos, que se enriquecen en tejidos inflamados, reactivos para agrupaciones de sangre, proteínas transportadoras de aniones y cationes, poliésteres (p.ej. del ácido láctico), poliamidas y polifosfatos.
- 40

9. Procedimiento para la reparación de unos conjugados de las fórmulas V IIa y V IIb de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque unos compuestos de las fórmulas generales VII'a y VII'b



En las que **Z'** tiene el significado de **Z** o de un grupo protector de carboxilo, **R'** representa un grupo funcional y **A** representa un grupo -COO, eventualmente después de la separación de los grupos protectores de carboxilo, se hacen reaccionar de un modo en sí conocido con una biomolécula, y a continuación (eventualmente después de la separación de los grupos protectores de carboxilo), los ácidos obtenidos de esta manera se hacen reaccionar de un modo en sí conocido con por lo menos un óxido metálico o una sal metálica de un elemento que tiene los números atómicos 21-29, 31, 32, 37-39, 42-44, 46, 47, 49, 58-71, 75, 77, 82 u 83, y a continuación, en caso deseado, los átomos de hidrógeno ácidos presentes, se transforman con compuestos orgánicos y/u orgánicos o con aminoácidos en sales fisiológicamente compatibles.

10. Estuche para la producción de radiofármacos, que comprende un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Z es un átomo de hidrógeno, y representa un compuesto de un elemento radiactivo con los números atómicos 26, 27, 29, 31, 32, 37-39, 43, 46, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 75, 77, 82 y 83.

11. Agentes farmacéuticos, que contienen por lo menos un compuesto fisiológicamente compatible de acuerdo con la reivindicación 2.

12. Agentes farmacéuticos, que contienen por lo menos un compuesto fisiológicamente compatible de acuerdo con la reivindicación 3.

13. U tilización de un c ompuesto de acuerdo c on l a reivindicación 2 par a l a pr eparación de a gentes par a e l diagnóstico por RMN.

14. U tilización de un c ompuesto de acuerdo c on l a r eivindicación 3 par a l a pr eparación de a gentes par a e l radiodiagnóstico o l a radioterapia.