

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 418**

51 Int. Cl.:

A61K 49/10 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

A61K 103/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2005 E 05786927 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1796738**

54 Título: **Conjugado de biciclamo para IRM y gammagrafía de enfermedades asociadas al receptor CXCR4**

30 Prioridad:

23.09.2004 FR 0410062

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

16.12.2013

73 Titular/es:

**GUERBET (100.0%)
15, RUE DES VANESSES
93420 VILLEPINTE, FR**

72 Inventor/es:

PORT, MARC

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 434 418 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugado de biciclamo para IRM y gammagrafía de enfermedades asociadas al receptor CXCR4

- 5 La invención se refiere a compuestos de diagnóstico destinados a orientarse a receptores de quimiocinas, especialmente receptores CXCR4, y al uso de estos compuestos en el campo de la imaginología médica.

10 Las quimiocinas son moléculas de la familia de las citocinas que presentan propiedades de activación, en particular de células de la familia de los leucocitos, que hacen intervenir especialmente propiedades quimioattractoras, propiedades de movilización del calcio por aumento del calcio intracelular y propiedades de liberación de enzimas (exocitosis). Estas quimiocinas son conocidas por su papel eventual como mediadores de la inflamación. Se han descrito varias quimiocinas por referencia a su estructura y su afinidad por uno o varios receptores, y por referencia a sus propiedades biológicas, en la publicación de Baggiolini M. *et al* ("Advances in Immunology" (1994), vol. 55, páginas 97-179). La publicación de Wells T.N.C. *et al*. (Journal of Leukocyte Biology, vol. 59, enero de 1996, 53-60) describe la estructura tridimensional de varias quimiocinas y sus receptores, específicos o no. De forma general, estas quimiocinas se caracterizan por la presencia en su estructura primaria de residuos de cisteína conservados (1 a 4 residuos, especialmente), basándose en los cuales se han distinguido varias subfamilias según la posición de las dos primeras cisteínas. Estas familias comprenden aquellas de las proteínas CXC o de las proteínas CC. La presencia de estos residuos de cisteína induce la formación de puentes disulfuro.

20 Se ha demostrado el papel determinante de las quimiocinas y de sus receptores en la proliferación cancerosa debida a metástasis, especialmente de carcinomas pulmonares (Muller *et al.*, Nature 410: 50-6 (2001), WO 99/47518). Las células malignas procedentes de tumores primarios van a colonizar otros tejidos pasando por la circulación sanguínea o linfática, interviniendo quimiocinas en este proceso. Los mecanismos moleculares implicados en la progresión y la metástasis tumoral (movilidad, migración, proliferación celular, adhesión de células cancerosas circulantes a las células endoteliales) no se han dilucidado totalmente. Sin embargo, se ha demostrado el papel de los receptores CXCR4 y se han descrito ligandos capaces de orientarse a receptores CXCR4 e inhibir así la progresión tumoral, especialmente en el documento US 2004/0132642.

- 30 La invención se refiere a la orientación a receptores CXCR4 no para el tratamiento, sino para el diagnóstico de una patología cancerosa, y en particular la evaluación de los riesgos y del estado de progresión de metástasis.

35 Mukai *et al.* (J. Label Compd. Radiopharm. 2003: 46: S1-S403, página S304) han descrito el uso del compuesto ¹¹¹In-DTPA-Ac-TZ14011 basado en el péptido TZ14011 orientado a CXCR4 para el radiodiagnóstico de tumores metastásicos.

40 El especialista en la materia conoce especialmente para IRM (imaginología por resonancia magnética) un gran número de productos de contraste, llamados no específicos, basados en quelatos de metal paramagnético tal como gadolinio, lineales o macrocíclicos, especialmente DTPA, DTPA BMA, DTPA BOPTA, DO3A, TETA, TRITA, HETA, DOTA-NHS, TETA-NHS, PCTA, DOTA, M4DOTA, M4DO3A, M4DOTMA, MPDO3A, HBED, EHPG, BFC. Pero estos compuestos no permiten sin embargo reconocer específicamente una zona patológica, y en particular metástasis tumorales.

45 En contraposición a un producto no específico de la técnica anterior (sin orientación a marcador biológico), los compuestos según la invención pretenden identificar específicamente las dianas biológicas (células, tejidos) que presentan una sobreexpresión de receptores CXCR4 con relación a una zona no patológica. En particular, los compuestos según la invención están destinados a orientarse a células tumorales que expresan los receptores CXCR4, y preferiblemente células metastásicas.

- 50 Así, según un primer aspecto, la invención se refiere a compuestos que comprenden por un lado una parte de biovector de orientación a CXCR4, y por otro lado una parte de detección (entidad señal) que puede identificarse por un procedimiento de imaginología médica.

55 La parte de detección es típicamente un agente de contraste detectable por imaginología de IRM, rayos X, gammagrafía, TAC, TEP, imaginología de CEST y especialmente Lipocest (nanopartículas lipídicas expuestas a una imaginología de CEST).

60 En el caso de IRM, se obtiene el contraste gracias a la administración de agentes de contraste que contienen metales paramagnéticos o superparamagnéticos que tienen efecto sobre la relajabilidad de los protones del agua. En el caso de la gammagrafía, se obtiene el contraste por la localización específica de un compuesto radiofarmacéutico emisor de rayos γ o β .

65 En el caso de TEP, se obtiene el contraste por la localización específica de un compuesto radiofarmacéutico emisor de positrones.

En el caso de imaginología de CEST, se usa típicamente un metal de desplazamiento apropiado (metal

desplazante).

La invención usará para la orientación a receptores CXCR4 biovectores elegidos entre los biciclamos.

- 5 La parte de señal comprende al menos un quelato, pudiendo usarse un gran número de quelatos.

Se podrá usar especialmente un quelato de un grupo quelante lineal entre: EDTA, DTPA ácido dietilentriaminopentaacético, *N*-[2-[bis(carboximetil)amino]-3-(4-etoxifenil)propil]-*N*-[2-[bis(carboximetil)amino]etil]-L-glicina (EOB-DTPA), ácido *N,N*-bis-[2-[bis(carboximetil)amino]etil]-L-glutámico (DTPA-GLU), *N,N*-bis-[2-[bis(carboximetil)amino]etil]-L-lisina (DTPA-LYS), derivados monoamida o bisamida de DTPA tales como *N,N*-bis-[2-[carboximetil[(metilcarbamoil)metil]amino]etil]glicina (DTPA-BMA), ácido 4-carboxi-5,8,11-tris(carboximetil)-1-fenil-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oico (BOPTA).

15 Se podrá usar especialmente un quelato de un grupo quelante macrocíclico entre ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (DO3A), ácido 10-(2-hidroxipropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (HPDO3A), ácido 2-metil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (MCTA), ácido ($\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$)-tetrametil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTMA), ácido 3,6,9,15-tetraazabiciclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien-3,6,9-triacético (PCTA) y NOTA.

20 Se podrán usar también derivados en los que uno o varios grupos carboxílicos están en forma de una sal, éster o amida correspondiente; o un compuesto correspondiente en el que uno o varios grupos carboxílicos se reemplazan por un grupo fosfónico y/o fosfínico tal como ácido 4-carboxi-5,11-bis(carboximetil)-1-fenil-12-[(fenilmetoxi)metil]-8-(fosfonometil)-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oico, *N,N*-[(fosfonometilimino)di-2,1-etanodii]bis[*N*-(carboximetil)glicina], *N,N*-[(fosfonometilimino)di-2,1-etanodii]bis[*N*-(fosfonometil)glicina], *N,N*-[(fosfonometilimino)di-2,1-etanodii]bis[*N*-(carboximetil)glicina], ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraquis[metilen(metilfosfónico)] o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraquis[metilen(metilfosfínico)].

30 Se puede usar también un quelato de un grupo quelante entre: DOTA, gadofluorinas, DO3A, HPDO3A, TETA, TRITA, HETA, DOTA-NHS, M4DOTA, M4DO3A, PCTA y sus derivados 2-bencil-DOTA, ácido α -(2-fenil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-acético-4,7,10-tris(metilacético), ácido 2-bencilciclohexildietilentriaminopentaacético, 2-bencil-6-metil-DTPA, 6,6"-bis-[*N,N,N',N'*-tetra(carboximetil)aminometil]-4'-(3-amino-4-metoxifenil)-2,2':6',2"-terpiridina, ácido *N,N*-bis(piridoxal-5-fosfato)etilendiamino-*N,N*-diacético (DPDP) y ácido etilendinitrilotetraquis(metilfosfónico) (EDTP).

35 De manera más amplia, el quelato o quelatos que forman la entidad de señal podrán responder a la fórmula del documento WO 01/60416.

40 El acoplamiento de quelatos con biovectores es conocido de la técnica anterior, y hace intervenir generalmente un enlace químico (ligador) tal como se describe en el documento WO 01/60416. La estructura y naturaleza química del ligador se definen para permitir el acoplamiento químico entre el biovector y el quelato o quelatos usados.

45 En el caso de IRM, la relajabilidad de estos quelatos en imaginología de T1 es típicamente del orden de 4 a 20 $\text{mmol}^{-1}\text{Gd}^{-1}\text{s}^{-1}$. Se recuerda que la relajabilidad longitudinal r_1 de un producto de contraste paramagnético da la medida de su eficacia magnética y permite apreciar su influencia sobre la señal registrada. En imaginología médica de IRM, los productos de contraste modifican el tiempo de relajación de los protones, y el aumento de relajabilidad obtenido permite obtener una señal más elevada. Los quelatos se eligen de manera que formen complejos estables con iones de metal paramagnético de número atómico 21-29, 42-44 o 58-70, especialmente Gd (III), Dy (III), Fe (III), Mn (III) y Mn (II), y Tm (III) para la imaginología de CEST.

50 En el caso de la gammagrafía, el metal es un radionucleido, especialmente ^{99}Tc , ^{117}Sn , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{89}Zr , ^{177}Lu , ^{47}Sc , ^{105}Rh ; ^{188}Re , ^{60}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{159}Gd , ^{149}Pr , ^{166}Ho . Según una realización, el metal es un radionucleido para imaginología de PET.

55 De manera más amplia, los biovectores de orientación a CXCR4 se pueden inyectar o encapsular en un sistema de transporte apropiado para un reconocimiento biológico eficaz en el campo del diagnóstico. Dichos sistemas pueden ser liposomas, micelas, vesículas, microgeles, partículas lipídicas multicapa, polímeros de sacáridos y/u óxido de etileno.

60 La invención se refiere al uso de una composición según las reivindicaciones para el diagnóstico de una patología asociada a una sobreexpresión o una subexpresión de receptores de quimiocinas.

65 La invención se refiere también al uso de los compuestos descritos anteriormente para el diagnóstico de enfermedades asociadas a una sobreexpresión o una subexpresión de CXCR4 con relación a un tejido sano, preferiblemente el diagnóstico de tumores, especialmente la detección de metástasis tumorales.

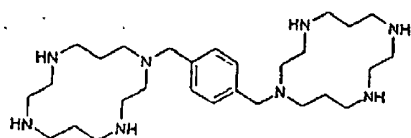
La invención se refiere también al uso de los compuestos descritos anteriormente para la preparación de una composición de diagnóstico destinada al diagnóstico de enfermedades asociadas a una sobreexpresión o subexpresión de CXCR4 con relación a un tejido sano, preferiblemente el diagnóstico de tumores, especialmente de metástasis tumorales.

5 Se describen en la técnica anterior ejemplos de administración de composiciones para imagenología médica, por ejemplo, en el documento WO 0226776. El agente de diagnóstico se administra en cantidad suficiente para una imagenología satisfactoria. En IRM, se usará, por ejemplo, una dosis de ión metálico de 0,02 a 1,5 mmol/kg de peso corporal.

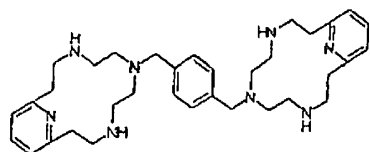
10 Son conocidos en la técnica anterior los vehículos farmacéutica y fisiológicamente aceptables que permiten formar composiciones de diagnóstico (productos de contraste) que comprenden los compuestos descritos anteriormente. Se usarán, por ejemplo, sales (de sodio, calcio, meglumina), agentes de control del pH (ácido acético, cítrico, fumárico) y antioxidantes.

15 El biovector de la presente invención es un biciclamo tal como el compuesto AMD3100 directamente bioacoplable o uno de sus derivados descritos en: Bioconjugate Chem., 2004, 15, 413-423; The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2003, vol. 278, n° 47, 47136-47144; J. Med. Chem, 1999, 42, 229-241; Chemical Reviews, 2003, vol 103, n° 9.

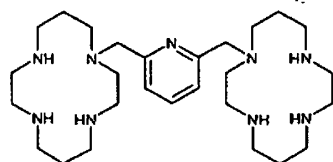
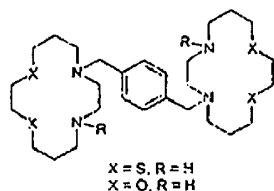
20 Se elegirán especialmente los compuestos capaces de orientarse a receptores CXCR4, elegidos entre los compuestos siguientes:



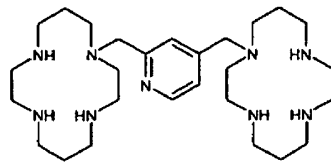
AMD3100



AMD 3329

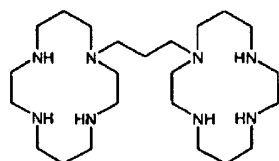


AMD3106

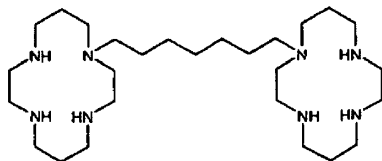


AMD3108

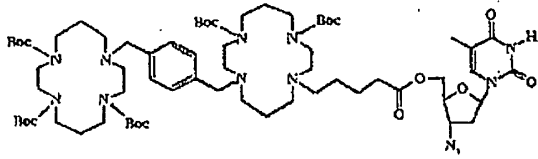
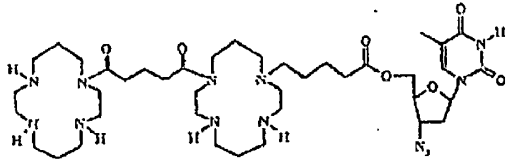
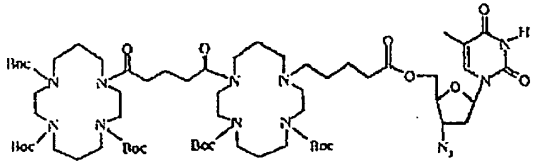
30



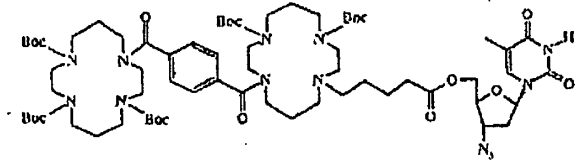
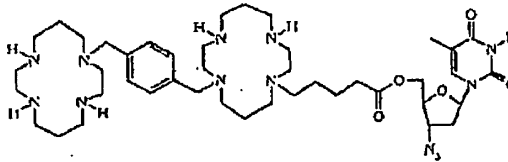
AMD2763



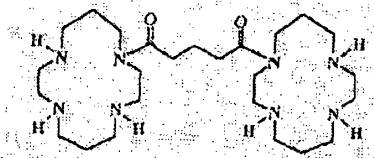
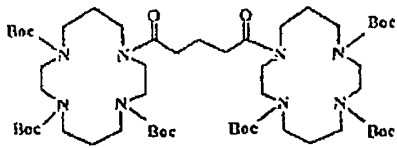
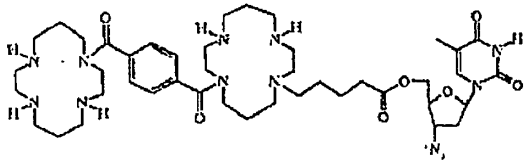
AMD2849



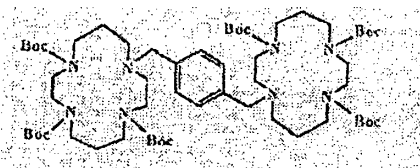
5

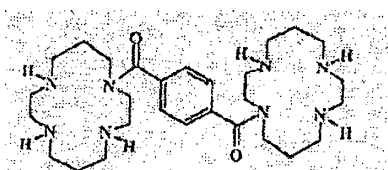
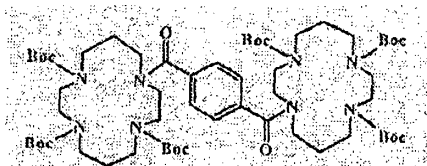
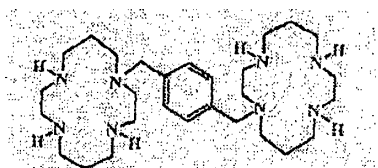


10



15





5

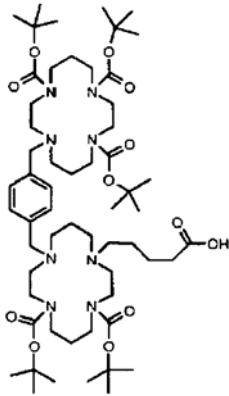
Se describen en la técnica anterior compuestos orientados a CXCR4: el péptido sintético TN14003 descrito en Cancer Research, 64, 4302-4308, 15 de junio de 2004; el compuesto no peptídico KRH-1636 descrito en PNAS, abril de 2003, vol. 100, n° 7, 4185-4190, los anticuerpos capaces de orientarse a receptores CXCR4 y los compuestos descritos en los documentos US 6.667.320, US 2004/0157818 (Yanaka *et al.*), US 2004/0134642 (gobierno de EE.UU.), US 2004/0102428, US 2004/0037825 (Bond *et al.*), US 2004/0019058, US 2003/0220482 (vMIP-II), US 2003/0091569 (Gerritsen *et al.*), US 2002/0039993 (SDF1), US 2002/0077339 (Bridger *et al.*), 2004/0009171 (Genentech).

15 La presente invención comprende un biovector de biciclamo.

El acoplamiento con el biovector se realiza de manera apropiada, típicamente con la ayuda de un enlace químico. Los compuestos bismacroclícos (AMD 3100 y análogos) pueden conjugarse con marcadores paramagnéticos o radiactivos. Para esto, es posible usar una de las funciones amina secundaria de los ciclos nitrogenados, estando protegidas las otras funciones amina por un agrupamiento adaptado previamente introducido en la síntesis de los heterociclos. Estos agrupamientos se eligen entre los grupos protectores apropiados de funciones amina como amidas y carbamatos. El compuesto macroclíco puede ligarse entonces al marcador mediante la función amina secundaria libre con la ayuda de una reacción de acoplamiento peptídico, típicamente mediante condensación con un isotiocianato, mediante reacción con un éster de ácido escuárico o mediante alquilación. Es igualmente posible introducir entre el nitrógeno heterocíclico y el marcador un segmento de enlace que permita alejar las dos partes activas de la molécula. Estos segmentos de enlace se obtienen mediante la reacción de motivos heterobifuncionales de tamaño y naturaleza química variable como cadenas polimetilénicas, oligoetilenglicoles, un aminoácido, un péptido o un núcleo aromático. Estos enlaces heterobifuncionales poseen una función reactiva con la función amina secundaria en uno de sus extremos, como una función ácido carboxílico eventualmente activada en forma de éster, un halogenuro de alquilo o un éster de ácido escuárico; y otra función reactiva disponible en el otro extremo para recibir el marcador. Entre las funciones posibles, se puede citar la función amina, la función ácido carboxílico, un tiol, un agrupamiento maleimida y un éster de ácido escuárico. Se pueden encontrar ejemplos de segmentos de enlace heterobifuncionales ("heterobifonctionnal cross-linkers") en "Bioconjugate Techniques" Greg. T. Hermanson, Academic Press, 1996, pág. 228-286. Cuando se realiza la conjugación de las dos entidades, se procede a la desprotección de las funciones bloqueadas según los protocolos apropiados de la química (véase "Protective Groups in Organic Synthesis", 2ª edición, T.W. Green, P.G.M. Wuts, JOHN WILEY SONS, 1991 y "Protecting Groups", 3ª edición, P.J. Kocienski, THIEME, 2004).

40 La solicitante ha estudiado especialmente los productos siguientes.

El éster butílico del ácido 11-{4-[4,8-bis-*tert*-butoxicarbonil-11-(4-carboxibutil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradec-1-ilmetil]bencil}-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8-tricarboxílico de fórmula (Boc-AMD-(CH₂)₄COOH)



Fórmula I

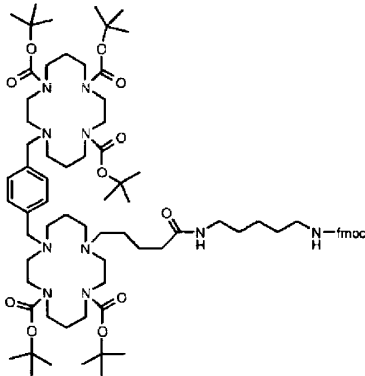
se ha preparado según los datos de la bibliografía (Bioconjugate Chemistry, vol. 15, n°2, 2004)

5 Se dan los ejemplos siguientes a modo de indicación.

Ejemplo 1:

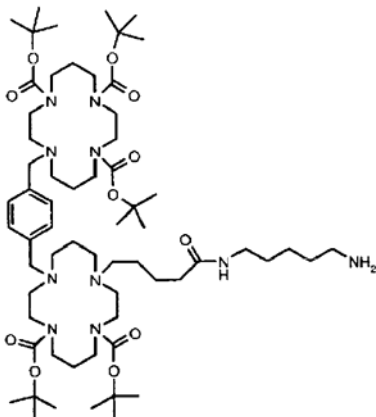
Etapa 1: Acoplamiento

10



Se añaden 44 mg de agente de acoplamiento BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio) a una solución de 36 mg de la amina mono-Fmoc-1,5-diaminopentano (en forma del clorhidrato de Novabiochem®), 100 mg del ácido Boc-AMD-(CH₂)₄COOH (0,09 mmol) y 32 mg de trietilamina en 5 ml de diclorometano. Se agita la solución a temperatura ambiente durante 4 h y se lava después sucesivamente con una solución de NaHCO₃ al 5%, KHSO₄ al 5% y finalmente agua. Se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ y evapora hasta sequedad. Se purifica el producto sobre gel de sílice (elución con CH₂Cl₂/MeOH). m/z : ES+ 1600.

20 Etapa 2: Desprotección de Fmoc



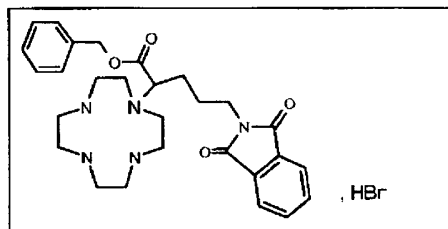
Fórmula II

Se disuelve el compuesto obtenido en la etapa 1 en una solución de piperidina en DMF (al 20%). Se agita la solución a temperatura ambiente 3 h y se evapora después a vacío elevado. Se lava el aceite obtenido con éter de petróleo y se somete a cromatografía después sobre gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$). m/z: ES+ 1189.

5

Ejemplo 2:

Etapa 1: Éster bencílico del ácido 5-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)-2-(1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)pentanoico



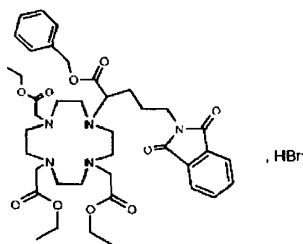
10

Se disuelven 55 g de cicleno básico (320 mmol) en 550 ml de CH_3CN , a los que se añaden gota a gota 119,8 g del derivado bromado éster bencílico del ácido (2-bromo-5-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)pentanoico, 288 mmol) disuelto en 550 ml de CH_3CN . Se agita el medio a temperatura ambiente durante 1 noche. Se filtra el precipitado y se lava abundantemente con acetonitrilo. Obtención de 138 g de producto en forma de un polvo. CCM: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ al 25% (80/40/3). Revelado UV y CuSO_4 , Rf: 0,3.

15

Etapa 2: Éster bencílico del ácido 5-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)-2-(4,7,10-trisetoxicarbonilmetil-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)pentanoico

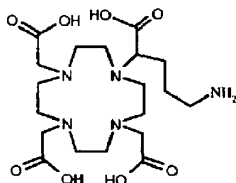
20



25

Se añaden 60 g del compuesto obtenido en la etapa 1 (102 mmol) y 50,1 g de Na_2CO_3 (464 mmol) a una solución de 59,1 g de bromoacetato de etilo (Aldrich®, 358 mmol) en CH_3CN (1,1 l). Se calienta el medio de reacción a 80°C bajo cobertura de argón durante una noche. Después de eliminar el precipitado, se concentra el filtrado y se lava abundantemente con CH_3CN . Se cristaliza el producto con CH_3CN mediante la adición gota a gota de Et_2O . Obtención de 89,8 g de producto en forma de un sólido blanco. CCM: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1). Revelado UV y KMnO_4 . Rf: 0,4.

30 Etapa 3 : Ácido 5-amino-2-(4,7,10-triscarboximetil-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)pentanoico

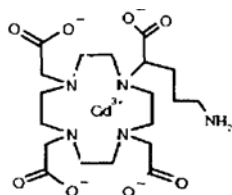


35

Se calienta a reflujo en reactor de 5 l una solución de 54 g del compuesto obtenido en la etapa 2 (64 mmol) en ácido clorhídrico al 37% (1,8 l) durante una noche. Después de enfriar y filtrar, se concentra el filtrado y se purifica sobre sílice silinizada (elución con agua). Después de evaporar a presión reducida, se lava el producto con éter. Obtención de 45 g de producto en forma de un sólido blanco. Se desala el producto por paso sobre resina de OH^- . Se aíslan 30 g de producto en forma de cristales blancos. HPLC: Hypercarb® 5 μ , 200 X 4,6, 250 Å.

40 Disolvente A: ácido sulfúrico 0,037 N; disolvente B: CH_3CN ; detección UV a 201 nm; Tr: 18 min.

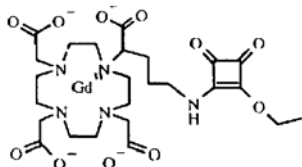
Etapa 4: Complejo de gadolinio del ácido 5-amino-2-(4,7,10-triscarboximetil-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)pentanoico



Fórmula III

Se disuelven 7,2 g del compuesto obtenido en la etapa 3 (16 mmol) en 70 ml de agua y se ajusta el pH a 5,5 mediante la adición de ácido clorhídrico 6 N. Se añaden 2,9 g de Gd₂O₃ (8 mmol) y se calienta a 80°C el medio de reacción. El pH de la solución aumenta regularmente y debe mantenerse entre 5,2 y 5,7 mediante la adición gota a gota de ácido clorhídrico 6 N. Después de 2 horas, se estabiliza el pH a 5,7. Se filtra la ligera turbidez por un filtro Whatman® y se concentra el filtrado. Obtención de 11,1 g de producto en forma de escamas blancas. HPLC: Hypercarb® 5 μ, 200 X 4,6, 250 Å. Disolvente A: ácido sulfúrico 0,037 N. Disolvente B: CH₃CN. Detección UV a 201 nm. Tr: 10 min.

Etapa 5: Complejo de gadolinio del ácido 5-(2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-enilamino)-2-(4,7,10-triscarboximetil-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)pentanoico

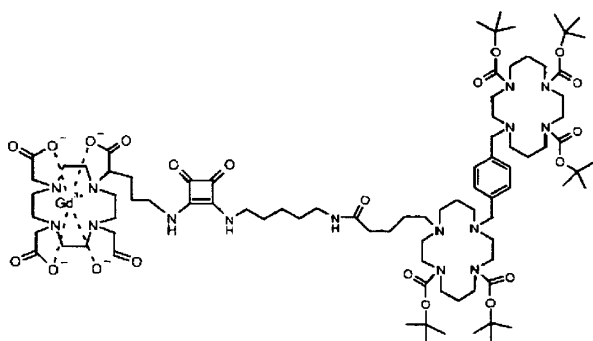


Fórmula IV

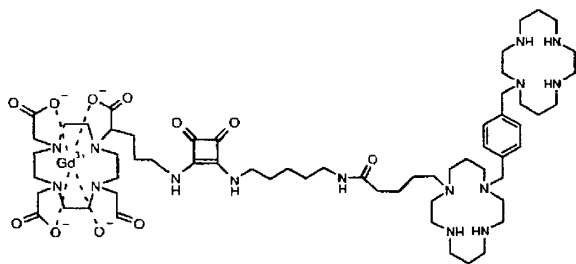
Se secan 8 g del compuesto obtenido en la etapa 4 por destilación azeotrópica con tolueno y se ponen después en suspensión en 90 ml de DMSO anhidro con cobertura de argón. Se añaden a continuación 2,8 ml de Et₃N secado sobre tamiz (1,7 eq.) y 5 g de escuarato de dietilo (Aldrich®, 2,5 eq.). Se agita el medio a temperatura ambiente con cobertura de argón durante 1 hora. Se precipita la mezcla con 600 ml de éter. Se filtra el sólido obtenido y se lava después con diclorometano. Después de filtrar y secar, se recuperan 7,5 g de un sólido blanco (rendimiento del 81,5%). HPLC: Symmetry C18, 5 μ, 250 X 4,6, 100 Å. A: agua con TFA, pH = 2,7. B: CH₃CN. Detección a 201 y 254 nm. Tr: 19,8 min.

Ejemplo 3:

Etapa 1: Acoplamiento

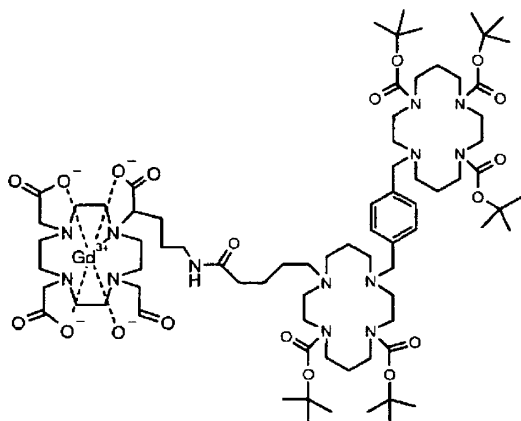


Se disuelve el compuesto obtenido en la etapa 5 del ejemplo 2 (100 mg, 1,35 x 10⁻⁴ mol) en 10 ml de solución acuosa de Na₂CO₃ a pH 9,4. Se introduce el compuesto obtenido en la etapa 2 del ejemplo 1 (176 mg) manteniendo el pH a 9,4 mediante la adición de Na₂CO₃. Se añaden varias gotas de DMF hasta la disolución completa. Después de 48 h de reacción a temperatura ambiente, se precipita el medio en una mezcla de etanol/éter etílico. Se filtra el precipitado y después se seca. m/z : ES+ 1882.

Etapa 2: Desprotección de *tert*-butilos

- 5 Se disuelve el compuesto obtenido en la etapa 1 en una mezcla de 10 cm³ de TFA/TIS/H₂O en proporciones 90/5/5. Se agita el medio durante 5 h a temperatura ambiente y después se evapora el disolvente a presión reducida. Se retoma el residuo en éter etílico, se filtra el precipitado y después se seca. Se purifica a continuación el producto por HPLC preparativa sobre columna Symmetry® con un eluyente constituido por agua/TFA a pH 3/CH₃CN. m/z: ES+ 1381.

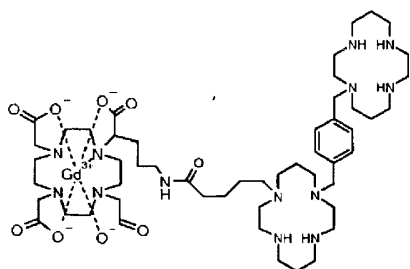
10

Ejemplo 4:Etapa 1: Acoplamiento

15

Se disuelven 0,1 g del complejo preparado en la etapa 4 del ejemplo 2 y 197 mg (o sea 1,1 eq.) de Boc-AMD-(CH₂)₄COOH en 25 ml de agua/DMF. Se añaden 405 mg de EDCI (o sea 1,3 eq.) y 0,01 g de HOBt. Se calienta el medio de reacción a 40°C durante 12 horas y se mantiene el pH aproximadamente a 6 mediante la adición de varias gotas de NaOH 2 N. Purificación: Se precipita el medio de reacción con 250 ml de acetona. Se filtra el producto y se seca el sólido blanco obtenido sobre P₂O₅. EM: ES+, M/Z= 1702 con z=1.

20

Etapa 2: Desprotección

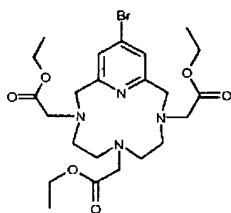
25

Según el modo de trabajo de la etapa 2 del ejemplo 3, partiendo del compuesto obtenido en la etapa 1. EM: ES+, M/Z= 1202 con z=1.

30

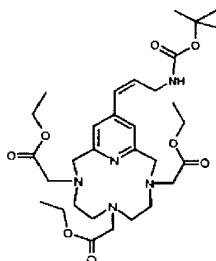
Ejemplo 5:

Etapa 1: Éster metílico del ácido (13-bromo-6,9-bisetoxicarbonilmetil-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-3-il)acético



5 Se introducen 22 g de 13-bromo-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trieno, obtenidos según J. Heterocyclic Chem. 27, 1990, páginas 167-169, en 440 ml de CH₃CN en presencia de 48 g de K₂CO₃ calcinado y se mantiene la mezcla a 80°C durante 1 h antes de la adición de una solución de 50 g de bromoacetato de etilo en 100 ml de CH₃CN; se agita entonces el medio de reacción durante 20 h a 80°C y después se enfría a temperatura ambiente, se filtra y se evapora el disolvente. Se retoma el residuo en 500 ml de una solución acuosa de HCl 1 N en presencia de un volumen de éter dietílico. Después de la separación de la fase orgánica, se neutraliza la fase acuosa con NaHCO₃ y después se extrae con CH₂Cl₂. Después de lavar con agua y después secar sobre sulfato de magnesio, se concentra la fase orgánica y se purifica el residuo sobre columna de sílice (Merck® 500 g, d= 10 cm) eluyendo con CH₃COOC₂H₅. m= 20,9 g; m/z: ES+ 544,6.

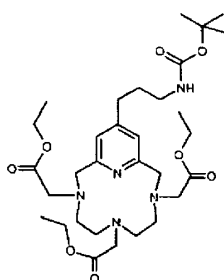
15 Etapa 2: Éster metílico del ácido [13-(3-*tert*-butoxicarbonilaminopropenil)-6,9-bisetoxicarbonilmetil-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-3-il]acético



20 Se añaden 6 g de 3-(*tert*-butoxicarbonilamino)propeno, 10 ml de trietilamina, después 800 mg de trifenilfosfina y por último 400 mg de acetato de paladio a una solución de 5 g del compuesto obtenido en la etapa a), disuelto en 100 ml de tolueno. Después de calentar a 80°C durante una noche en atmósfera inerte, se evapora el medio y se retoma el residuo con una solución acuosa de ácido clorhídrico (pH= 1). Se lava la fase acuosa con 1 volumen de éter dietílico y después de tolueno, antes de llevar a pH 6 por adición de NaOH (1 N).

25 Después de extraer la solución acuosa con CH₂Cl₂, se evapora la fase orgánica secada sobre sulfato de magnesio. Se obtiene un aceite marrón que se somete a cromatografía sobre gel de sílice. m= 2,8 g. m/z: ES+ 621.

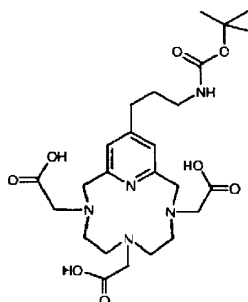
Etapa 3: Éster etílico del ácido [13-(3-*tert*-butoxicarbonilaminopropil)-6,9-bisetoxicarbonilmetil-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-3-il]acético



30 Se añaden 200 mg de catalizador de carbono sobre paladio al 10% a 2 g del compuesto obtenido en la etapa b), disuelto en 80 ml de CH₃OH, y se agita después el medio de reacción durante 2 h 30 min a 20°C a 4 x 10⁵ Pa de hidrógeno. Después de filtrar por Clarcel®, se evapora el disolvente y se obtienen 1,8 g de aceite después de cromatografía sobre gel de sílice. m/z: ES+ 623.

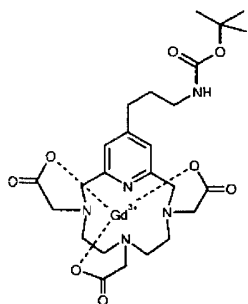
35

Etapa 4: Ácido [13-(3-*tert*-butoxicarbonilaminopropil)-6,9-biscarboximetil-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-3-il]acético



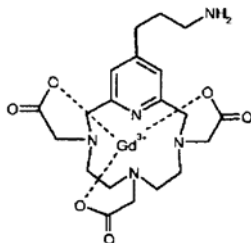
5 Se calientan a 70°C durante 18 h 1 g del compuesto obtenido en la etapa c) disuelto en 20 ml de una solución acuosa de NaOH 5 N y 20 ml de CH₃OH. Después de concentrar el medio de reacción, se retoma el residuo con agua y se concentra la solución, llevada a pH 5,5-6 por varias gotas de ácido acético, antes de purificarse por cromatografía sobre una columna (d= 15 cm) que contiene 50 g de sílice silanizada (Merck® 0,063 - 0,200 μm) eluyendo con agua. Después de concentrar hasta sequedad, se obtienen 480 mg de cristales blancos. m/z: ES-536,5.

Etapa 5: Complejo de gadolinio del ácido [13-(3-*tert*-butoxicarbonilaminopropil)-6,9-biscarboximetil-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-3-il]acético



15 Se disuelven 300 mg del compuesto obtenido en la etapa d) en 10 ml de agua y después se añaden de una vez 100 mg de Gd₂O₃ y se calienta el conjunto a 60°C durante 3 h 45 min, manteniendo el pH entre 5,5 y 6 por la adición de una solución acuosa de NaOH 1 N. Después de filtrar, se evapora el medio de reacción y se cristaliza el residuo con etanol. Después de tratar con una resina Chelex® 100 (Bio-Rad), se obtienen 320 mg de cristales blancos. m/z : ES-691.

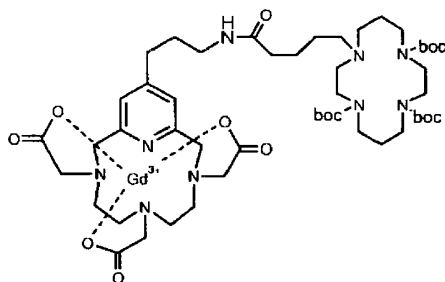
Etapa 6: Complejo de gadolinio del ácido [13-(3-aminopropil)-6,9-biscarboximetil-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-3-il]acético



Fórmula V

25 Se mantiene 3 horas con agitación una solución de 300 mg del complejo obtenido en la etapa e) en 18 ml de CF₃COOH a 25°C antes de eliminar el líquido a presión reducida. Se retoma el residuo en éter dietílico y se filtra la suspensión. Después de eliminar el disolvente, se introduce el residuo en porciones en una suspensión de al menos 1 ml de resina aniónica débil (OH⁻) en 5 ml de agua; al final de la adición, el pH debe ser de 8 a 8,5, estable. Se separa entonces la resina mediante filtración, se elimina el disolvente y se precipita el residuo por adición de éter etílico. m= 200 mg. m/z: ES+ 593.

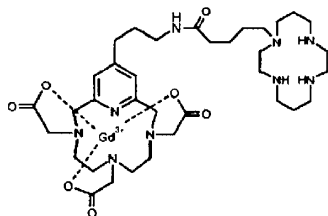
35

Ejemplo 6:Etapa 1: Acoplamiento

5

Según el modo de trabajo de la etapa 1 del ejemplo 4, partiendo de 100 mg del complejo de gadolinio preparado en la etapa 6 del ejemplo 5 y de 102 mg del éster *tert*-butílico del ácido 11-(4-carboxibutil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8-tricarboxílico preparado según los datos de la bibliografía (J. of Medicinal Chemistry, 1999, vol. 42, n° 2, p. 229-241). m/z: ES+1176.

10

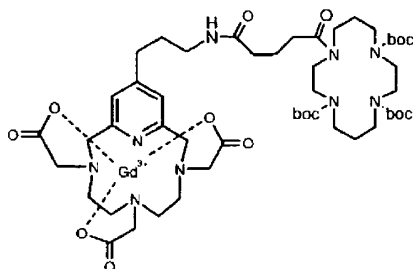
Etapa 2: Desprotección

15

Según el modo de trabajo de la etapa 2 del ejemplo 4, partiendo del compuesto obtenido en la etapa 1. m/z: ES+875.

Ejemplo 7:

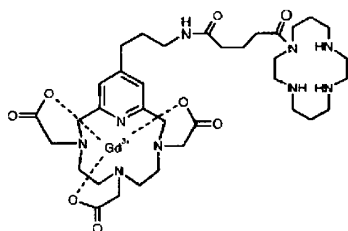
20

Etapa 1: Acoplamiento

25

Según el modo de trabajo de la etapa 1 del ejemplo 4, partiendo de 100 mg del complejo de gadolinio preparado en la etapa 6 del ejemplo 5 y 104 mg del éster *tert*-butílico del ácido 11-(4-carboxibutil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8-tricarboxílico preparado según los datos de la bibliografía (J. of Medicinal Chemistry, 1999, vol 42, n° 2, p. 229-241). m/z: ES+1190.

30

Etapa 2: Desprotección

Según el modo de trabajo de la etapa 2 del ejemplo 4, partiendo del compuesto obtenido en la etapa 1.

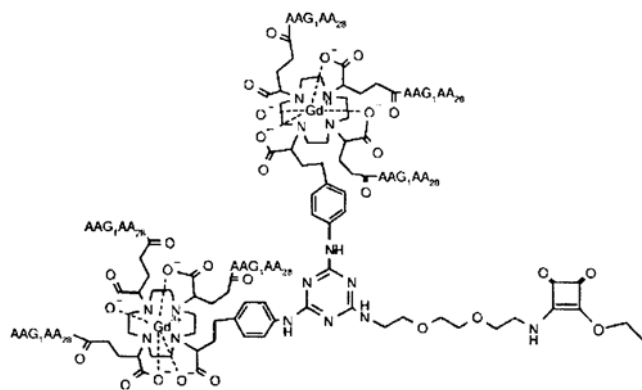
m/z: ES+ 889.

Ejemplo 8:

5 Acoplamiento del compuesto obtenido en la etapa 2 del ejemplo 1 con los complejos bimetálicos descritos en la patente WO 2004/112839:

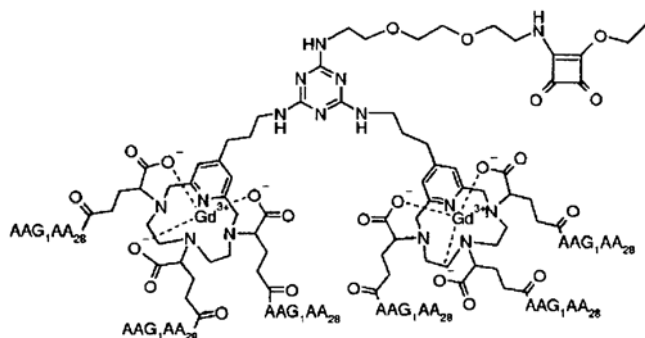
- ejemplo n°3, páginas 93-94 y 91 a 93 de fórmula VI:

10



Fórmula VI

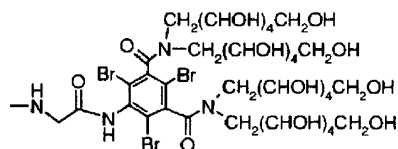
- ejemplo 6, pág. 98 a 101 y 96 a 98 de fórmula VII:



Fórmula VII

15

Con AAG1AA28=



20

Etapa 1: Acoplamiento

Compuesto	Peso mol.	Cantidad implicada	Nº de moles
Fórmula VI	8802,59	300 mg	3,41 x 10 ⁻⁵
Fórmula II	1187,67	47,5 mg	4 x 10 ⁻⁵
Fórmula VII	8632,43	300 mg	3,48 x 10 ⁻⁵
Fórmula II	1187,67	50 mg	4,18 x 10 ⁻⁵

25 Se disuelven 300 mg de un compuesto bimetálico descrito anteriormente (fórmula VI o VII) en 2 ml de agua. Se lleva el pH de 9,5 por la adición de Na₂CO₃. Se añaden 1,2 equivalentes del compuesto descrito en la etapa 2 del ejemplo 1 (fórmula II). Se agita el medio de reacción a temperatura ambiente durante 3 días y después se precipita con

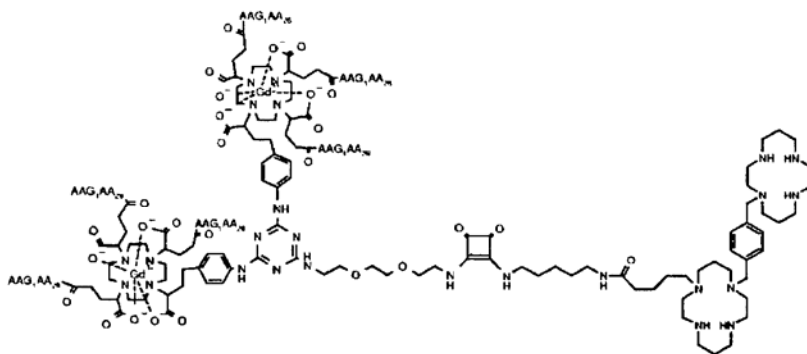
etanol.

Etapa 2: Desprotección

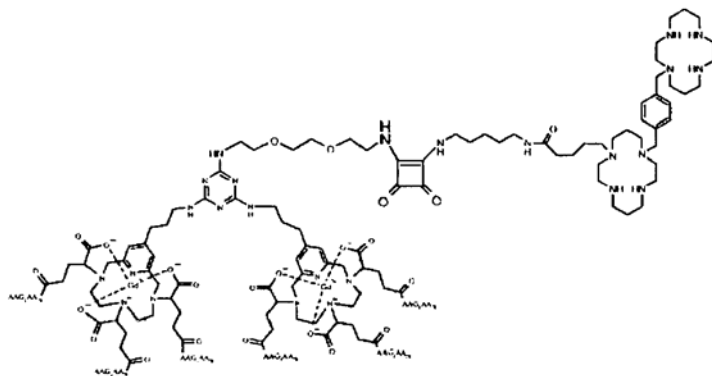
- 5 Se disuelve el compuesto obtenido según la etapa 1 en 10 ml de mezcla de ácido trifluoroacético/agua/triisopropilsilano (90/5/5). Después de 4 h a temperatura ambiente con agitación, se elimina el TFA por evaporación a vacío. Se precipita el medio de reacción con éter. Se purifica a continuación por HPLC preparativa el producto obtenido mediante filtración. HPLC: Columna Superpher Select B ®; agua-TFA a pH 3/CH₃CN.

10

Compuesto	Peso mol.	Cantidad obtenida	M/Z ES +.
VIII	9443,61	110 mg	9445
IX	9273,44	90 mg	9276



Fórmula VIII

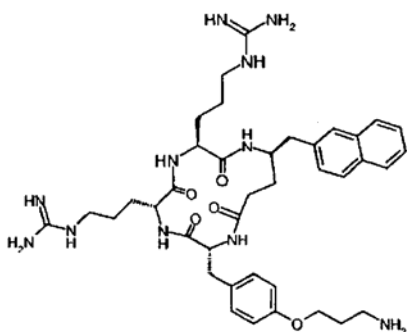


Fórmula IX

15

Ejemplo 9: Comparativo

Síntesis de ciclopéptidos de fórmula X

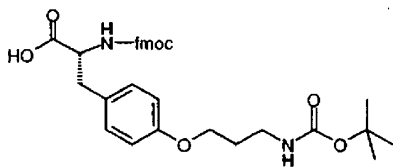


Fórmula X

20

Se preparó el péptido según el procedimiento descrito en J. Of Medicinal Chemistry, 2005, vol. 48, N° 9, p. 3280-3289. Se realizó la síntesis en fase sólida sobre resina de clorotritilo usando aminoácidos protegidos por el agrupamiento Fmoc.

5 La tirosina usada en la publicación original se reemplazó por un análogo sustituido de fórmula:



10 Se preparó este compuesto según el procedimiento descrito en Tetrahedron Letters vol. 36, N° 35, p. 6193-6196, 1995.

Ejemplo 10: Comparativo

Acoplamiento del ciclopéptido de fórmula X con nanopartículas de óxido de hierro.

15 Se prepararon las nanopartículas según los procedimientos descritos en la patente WO 2004/058.275 (US 2004/253181), ejemplos 8 y 9, para la preparación de soluciones coloidales de partículas magnéticas y ejemplos 10 a 12 para la complejación de partículas magnéticas mediante un recubrimiento de gem-bisfosfonato del ejemplo 1 del documento WO 2004/058 275.

20 El acoplamiento se realiza análogamente al descrito para los ejemplos 13 a 15 del documento WO 2004/058.275. Se añade progresivamente manteniendo el pH aproximadamente a 7 una solución de 100 mg de péptido de fórmula X y 110 mg de EDCI (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) a 50 cm³ de solución de nanopartículas de óxido de hierro. Se lleva el pH de la solución a 6,5 con NaOH (0,1 N). Se agita después la solución. Se filtra por una membrana de 0,22 μm de porosidad (STERICUP Millipore®). Se ultrafiltra a continuación por membrana de 30 KDa. [Fe] = 0,250 mg/l.

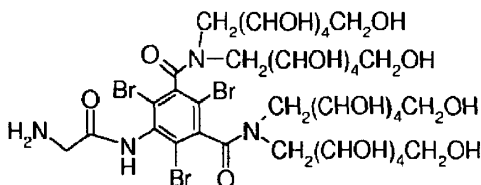
Tamaño de PCS= 28 nm

30 Índice de injerto [compuesto A/Fe]= 1,65% en mol/mol

Índice de injerto [péptido/compuesto A]= 31%.

Ejemplo 11: Comparativo

35 Acoplamiento de la amina R-NH₂ N,N-[bis-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)]-2,4,6-tribromo-5-(glicilamino)isofalimida de fórmula:



40 Puede prepararse según el modo de trabajo descrito en la patente EP 0.922.700 A1.

45 Se añade una solución constituida por 2,5 g de la amina R-NH₂ en 10 cm³ de agua a 50 cm³ de la solución obtenida en el ejemplo 10 a temperatura ambiente. Se ajusta el pH a 7 por adición de NaOH 0,1 M. Se añade 1 g de EDCI y se agita la solución durante 3 h a temperatura ambiente. Se ajusta el pH a 7 y se agita la mezcla durante 1 noche a temperatura ambiente. Después de filtrar por una membrana de 0,22 μm de porosidad, se ultrafiltra la solución por una membrana de 30 kDa de umbral de corte.

[Fe]= 0,228 mg/l, tamaño de PCS = 28,3 nm

50 Índice de injerto [compuesto A/Fe]= 1,62% en mol/mol

Índice de injerto [péptido/compuesto A]= 32%

55 Índice de injerto [R-NH₂/compuesto A]= 62%.

Ejemplo 12: Comparativo

Acoplamiento de aminoPEG 750 (O-(2-aminoetil)-O'-metilpolietilenglicol 750 FLUKA®)

5 Se añade una solución constituida por 2 g de aminoPEG 750 en 10 cm³ de agua a 50 cm³ de la solución obtenida en el ejemplo 10 a temperatura ambiente. Se ajusta el pH a 7 por adición de NaOH 0,1 M. Se añade 1 g de EDCI y se agita la solución durante 3 h a temperatura ambiente. Después de filtrar por una membrana de 0,22 μm de porosidad, se ultrafiltra la solución por una membrana de 30 kDa de umbral de corte.

10 [Fe]= 0,212 mg/l, tamaño de PCS= 27,8 nm

Índice de injerto [compuesto A/Fe]= 1,70% en mol/mol

15 Índice de injerto [péptido/compuesto A]= 30%

Índice de injerto [R-NH₂/compuesto A]= 62%.

La solicitante ha puesto a punto los protocolos biológicos siguientes para medir la eficacia de los productos.

20 Afinidad/especificidad *in vitro* por CXCR-4: Ensayo biológico nº 1: Ensayo de fijación basado en el reconocimiento, por la entidad señal vectorizada, de una célula que expresa la proteína diana (HL-60). La especificidad de reconocimiento se evalúa gracias a experimentos de competición que muestran el papel inhibitorio directo de un exceso de vector libre sobre la fijación del prototipo ensayado. Se valida igualmente la especificidad por comparación con las titulaciones obtenidas con la molécula de referencia no vectorizada. La diana celular elegida es la célula promielocita humana HL-60, descrita en la bibliografía como fuertemente positiva de CXCR-4 [R. Möhle *et al.*: "The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitor and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1", Blood 12: 4523-4530 (1998)].

30 Modelo de fijación sobre células HL-60:

Células: HL-60

Plazos: Tiempo de incubación en presencia del producto de ensayo: cinética de 0,5 h a 4 h a 37°C.

35 Controles: Verificación del índice de expresión en CXCR-4 de HL-60 por citometría de flujo.

Incubación de las células en presencia de la molécula de referencia no vectorizada.

40 Especificidad: Inhibición de la fijación de prototipos por un exceso de vector libre o comparación con los resultados obtenidos con la molécula de referencia no vectorizada.

Resultados: Cantidades de Fe o Gd presentes en los sedimentos celulares después de titulación por ICP-AES o ICP-MS respectivamente (cantidades referidas en millones de células o en mg de proteínas).

45 El análisis de los resultados tiene en cuenta la cantidad de Fe o Gd encontrada con las partículas vectorizadas respecto a la detectada:

1/ en presencia del contrastóforo no vectorizado

50 2/ en presencia del prototipo vectorizado y un exceso de ligando (x100).

Estos resultados permiten determinar el aporte del vector al mecanismo de reconocimiento y se estudia la especificidad de reconocimiento por experimentos de competición con exceso de vector libre.

55 Afinidad/especificidad *in vitro* por CXCR-4: Ensayo biológico nº 2: Ensayo de fijación basado en el reconocimiento, por la entidad señal vectorizada, de una célula que expresa la proteína diana con la misma célula, pero negativa para el receptor, como control. Se evalúa la especificidad de reconocimiento gracias a experimentos que comparan los resultados obtenidos con células positivas con los obtenidos con células negativas. La diana celular elegida es la célula de CHO (ovario de hámster chino) negativa para la expresión de CXCR-4.

60

Modelo de fijación/internalización en células de CHO:

Células: CHO positivas y negativas para el receptor humano CXCR-4

65 Plazos: Tiempo de incubación en presencia del producto de ensayo: cinética de 0,5 h a 2 h a 37°C.

ES 2 434 418 T3

Controles: Incubación de células en presencia de la molécula de referencia no vectorizada.

5 Especificidad: Comparación de diferentes grupos (células CHO positivas y negativas/producto vectorizado y producto de referencia)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuesto que comprende, por un lado, una parte de orientación a receptores CXCR4 y, por otro lado, una parte de detección que puede identificarse por un procedimiento de imagenología médica, en el que la parte de detección comprende un quelato lineal o macrocíclico de ión de metal paramagnético o de radionucleido o de metal desplazante y la parte de orientación es un biciclamo.
- 10 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que la parte de detección es un quelato lineal o macrocíclico de ión de metal paramagnético o de metal desplazante.
- 10 3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que el grupo quelante se elige entre los compuestos DTPA, DTPA BMA, DTPA BOPTA, DO3A, TETA, TRITA, HETA, DOTA, TETA, NOTA, PCTA y sus derivados, preferiblemente PCTA.
- 15 4. Composición de diagnóstico que comprende un compuesto según una de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. Uso de un compuesto según las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de una composición destinada al diagnóstico de una patología asociada a una sobreexpresión o una subexpresión de receptores CXCR4, preferiblemente el diagnóstico de tumores, especialmente de metástasis tumorales.
6. Uso según la reivindicación 5, caracterizado porque la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.