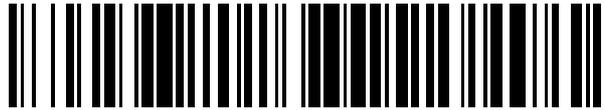


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 990**

51 Int. Cl.:

**C07D 255/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012 E 12808605 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2788334**

54 Título: **Conjugados de alginato marcados para aplicaciones de formación de imagen molecular**

30 Prioridad:

**09.12.2011 US 201161568796 P**

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

**12.07.2016**

73 Titular/es:

**BELLEROPHON BCM LLC (100.0%)  
184 Liberty Corner Rd., Suite 302  
Warren NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**RUAN, FUQIANG;  
DECKWERTH, THOMAS L. y  
MEGLASSON, MARTIN D.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 576 990 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

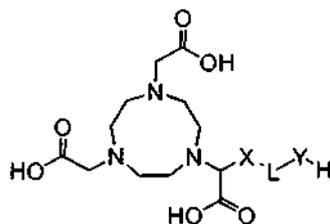
Conjugados de alginato marcados para aplicaciones de formación de imagen molecular

5 La presente invención se refiere generalmente al campo de los conjugados de alginato y a su uso como reactivos de formación de imagen.

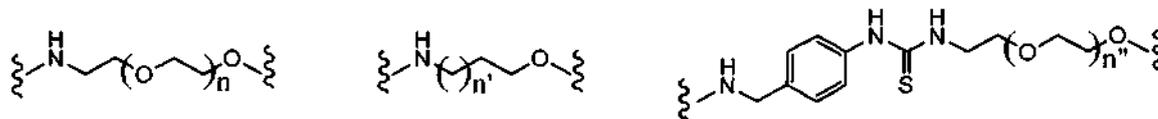
Los materiales poliméricos reticulados de hidrogel se utilizan ampliamente en la industria biomédica. Se usan en lentes de contacto, materiales en contacto con sangre, formulaciones de liberación controlada, vendajes para  
 10 heridas, bioadhesivos, membranas, superabsorbentes, encapsulación celular y materiales de inmunoaislamiento, y soportes para ingeniería tisular. Entre los diferentes polímeros, el polisacárido de origen natural ácido alginico ha encontrado aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, inercia biológica relativa, y la capacidad de someter a ingeniería sus propiedades mecánicas mediante introducción de diversos tipos de reticulaciones químicas y físicas. El ácido alginico se distingue de otros polisacáridos de origen biológico por su capacidad para formar  
 15 hidrogel rígidos cuando se expone a iones de calcio de reticulación en concentraciones suprafsiológicas. Esta propiedad se ha utilizado para elaborar un tratamiento para el tejido cardiaco dañado en pacientes con riesgo por remodelación adversa del ventrículo izquierdo del corazón después de infarto agudo del miocardio (AMI). Se inyecta una formulación acuosa soluble de alginato sódico y D-gluconato de calcio, eligiéndose cuidadosamente la concentración de cada componente para conseguir una reticulación parcial de las moléculas de alginato, que proporcione aún un líquido de flujo libre estable, en la arteria coronaria de pacientes de AMI después de  
 20 revascularización. La formulación experimenta una transición de líquido a gel cuando entra en contacto con el tejido cardiaco infartado como resultado de la elevada concentración de calcio extracelular en el tejido cardiaco reperfundido. A continuación el hidrogel se deposita en el tejido intersticial y ejerce un efecto terapéutico beneficioso al reducir la remodelación adversa y la insuficiencia cardiaca, debido potencialmente a su soporte mecánico de la pared cardiaca debilitada.

Se desconoce la deposición de este hidrogel de alginato en el miocardio reperfundido lesionado de pacientes de AMI dado que no se puede llevar a cabo una toma de muestra de tejido cardiaco invasiva exhaustiva en pacientes  
 30 humanos. Además, la utilidad de las técnicas invasivas de toma de muestra de tejidos en un escenario preclínico es limitada debido a que la intervención quirúrgica a menudo constituye un procedimiento terminal que evita la evaluación longitudinal en el mismo sujeto de investigación. Las técnicas no invasivas de formación de imagen pueden ofrecer una solución al proporcionar esta información sin intervención quirúrgica ni procedimientos terminales. Las modalidades de formación de imagen tales como ecocardiografía, tomografía computarizada, formación de imagen por resonancia magnética, y formación de imagen nuclear tal como tomografía por emisión de  
 35 positrones (PET) y tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT) usan reactivos y/o instrumentación de formación de imagen especializados para evaluar la estructura, función, perfusión y remodelación cardiacas en pacientes con AMI o insuficiencia cardiaca así como en modelos animales de estas enfermedades. La invención se define mediante las reivindicaciones.

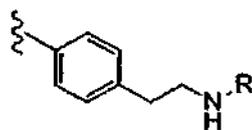
40 Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula:



45 en la que X es  $-(CH_2)_mC(O)-$ , siendo m 1, 2, o 3;  
 L es un conector seleccionado del grupo que consiste en:



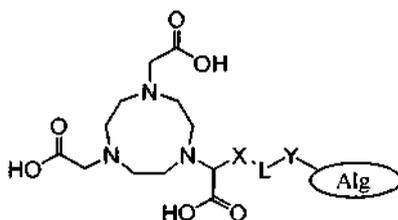
50 en los que n, n' y n'' son cada uno independientemente un número de 0 a 10; e  
 Y-H tiene la siguiente estructura:



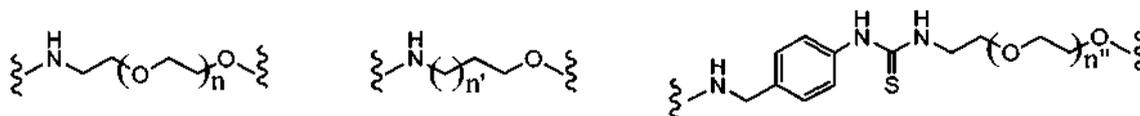
en la que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En ciertas realizaciones de este aspecto, el compuesto comprende además un ión metálico estable o radiactivo quelado con el resto ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético. De acuerdo con una o más realizaciones, el ión metálico estable o radiactivo comprende un ión de galio. En algunas realizaciones, el ión de galio es uno adecuado para formación de imagen, tal como  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  o  $^{68}\text{Ga}$ . En otras realizaciones, el ión metálico radiactivo es uno adecuado para formación de imagen, tal como  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ , o  $^{111}\text{In}$ .

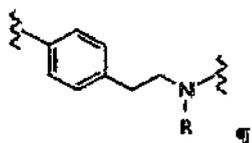
Otro aspecto de la invención se refiere a un conjugado de alginato que tiene la fórmula:



15 en la que X es  $-(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})-$ , siendo m 1, 2, o 3; L es un conector seleccionado del grupo que consiste en:



20 en los que n, n' y n" son cada uno independientemente un número de 0 a 10; Alg es ácido algínico o una sal de alginato; e Y es un espaciador unido directamente a la unidad del extremo reductor del alginato o a los grupos carboxilo de la cadena de polímero de alginato a través del nitrógeno activo, y tiene la siguiente estructura:



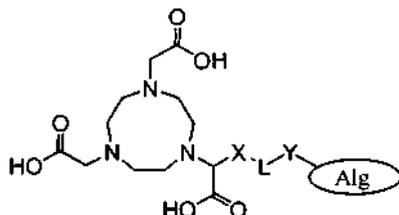
30 en la que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 En una o más realizaciones, la sal de alginato comprende una sal de catión monovalente y/o una sal de catión multivalente. El catión monovalente y/o multivalente puede comprender uno o más de sodio, potasio, litio, rubidio, cesio, amonio, calcio, estroncio, bario y magnesio. En algunas realizaciones, la sal de alginato es alginato sódico, alginato de calcio, o una mezcla de alginato sódico y alginato de calcio.

40 De acuerdo con una o más realizaciones de este aspecto, el conjugado comprende además un ión metálico estable o radiactivo quelado con el resto ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético del conjugado. En ciertas realizaciones, el ión metálico estable o radiactivo comprende ión de galio. Algunas realizaciones proporcionan que el ión de galio es uno adecuado para formación de imagen, tal como  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  o  $^{68}\text{Ga}$ . En otras realizaciones, el ión metálico radiactivo comprende uno adecuado para formación de imagen, tal como  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ , o  $^{111}\text{In}$ .

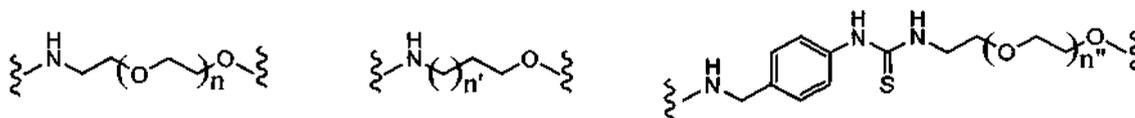
En una o más realizaciones, el ión metálico estable o radiactivo está quelado con el resto ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1,4,7-triacético del conjugado a una temperatura entre 20 °C y 100 °C.

5 También se describe un método de formación de imagen en un mamífero que comprende administrar un conjugado de alginato radiomarcado a un mamífero, y formar la imagen de la distribución temporal y espacial del conjugado de alginato radiomarcado. De acuerdo con una o más realizaciones de este aspecto, el conjugado de alginato tiene la fórmula:



10

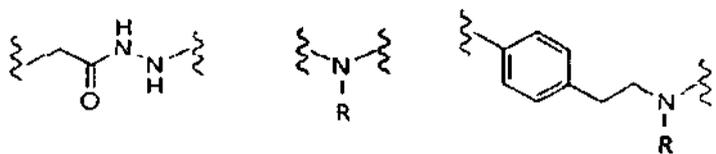
en la que X es  $-(CH_2)_mC(O)-$ , siendo m 1, 2, o 3;  
L es un conector seleccionado del grupo que consiste en:



15

en los que n, n' y n'' son cada uno independientemente un número de 0 a 10;  
Alg es ácido alginico o una sal de alginato; e  
Y es un espaciador unido directamente a la unidad del extremo reductor del alginato o a los grupos carboxilo de la cadena de polímero de alginato a través del nitrógeno activo, y se selecciona del grupo que consiste en:

20



25

en los que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el conjugado de alginato comprende además un ión metálico estable o radiactivo quelado con el resto ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1,4,7-triacético del conjugado.

30

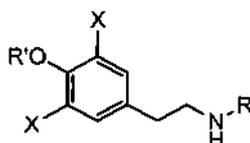
La sal de alginato puede comprender una sal de catión monovalente y/o una sal de catión multivalente. El catión monovalente y/o multivalente puede comprender uno o más de sodio, potasio, litio, rubidio, cesio, amonio, calcio, estroncio, bario y magnesio. La sal de alginato puede ser alginato sódico, alginato de calcio, o una mezcla de alginato sódico y alginato de calcio.

35

El ión metálico estable o radiactivo puede comprender un ión de galio. Algunas realizaciones proporcionan que el ión de galio es uno adecuado para formación de imagen, tal como  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  o  $^{68}\text{Ga}$ . El ión metálico radiactivo puede comprender uno adecuado para formación de imagen, tal como  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ , o  $^{111}\text{In}$ .

40

El alginato puede estar conjugado a una tiramina yodada o un derivado de tiramina. La tiramina yodada o el derivado de tiramina pueden tener la siguiente fórmula:



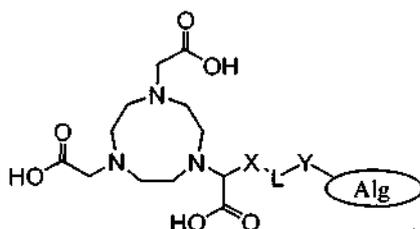
40

en la que cada X es independientemente hidrógeno o yodo y R y R' son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático. El yodo se puede seleccionar entre los isótopos de  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$ .

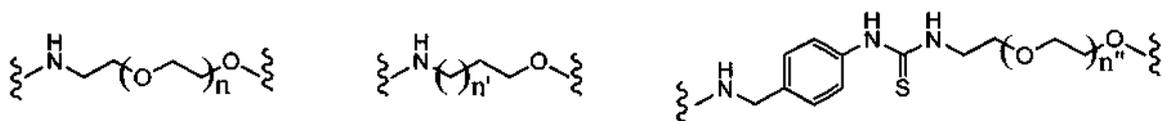
El mamífero puede ser un ser humano.

- 5 Se describe un método de formación de imagen de la deposición de alginato en un mamífero que comprende administrar un conjugado de alginato radiomarcado a un mamífero y formar la imagen del conjugado de alginato radiomarcado. En ciertas realizaciones, el conjugado de alginato radiomarcado está parcialmente reticulado.

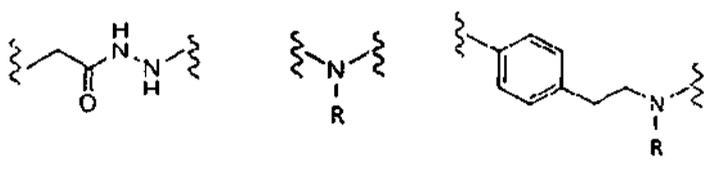
- 10 El conjugado de alginato descrito puede tener la fórmula:



- 15 en la que X es  $-(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})-$ , siendo m 1, 2, o 3;  
L es un conector seleccionado del grupo que consiste en:



- 20 en los que n, n' y n" son cada uno independientemente un número de 0 a 10;  
Alg es ácido alginico o una sal de alginato; e  
Y es un espaciador unido directamente a la unidad del extremo reductor del alginato o a los grupos carboxilo de la cadena de polímero de alginato a través del nitrógeno activo, y se selecciona del grupo que consiste en:

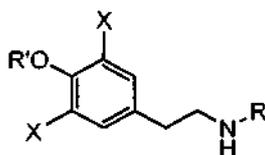


- 25 en los que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático;  
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el conjugado de alginato comprende además un ión metálico estable o radiactivo quelado con el resto ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético del conjugado.

- 30 La sal de alginato puede comprender una sal de catión monovalente y/o una sal de catión multivalente. El catión monovalente y/o multivalente puede comprender uno o más de sodio, potasio, litio, rubidio, cesio, amonio, calcio, estroncio, bario y magnesio. La sal de alginato puede ser alginato sódico, alginato de calcio, o una mezcla de alginato sódico y alginato de calcio.

- 35 El ión metálico estable o radiactivo puede comprender un ión de galio. Algunas realizaciones proporcionan que el ión de galio es uno adecuado para formación de imagen, tal como  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  o  $^{68}\text{Ga}$ . El ión metálico radiactivo puede comprender uno adecuado para formación de imagen, tal como  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ , o  $^{111}\text{In}$ .

- 40 El alginato puede estar conjugado a una tiramina yodada o a un derivado de tiramina. La tiramina yodada o el derivado de tiramina pueden tener la siguiente fórmula:

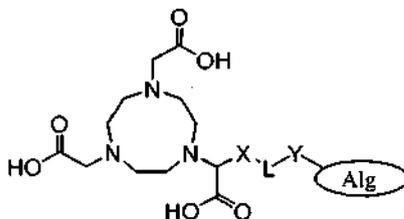


5 en la que cada X es independientemente hidrógeno o yodo y R y R' son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático. En algunas realizaciones, el yodo se selecciona entre los isótopos de  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$ .

El mamífero puede ser un ser humano.

10 Se describe además un método de formación de imagen de la deposición de alginato en un mamífero que comprende administrar un conjugado de alginato radiomarcado y alginato parcialmente reticulado con calcio a un mamífero y formar la imagen del conjugado de alginato radiomarcado. En ciertas realizaciones, el conjugado de alginato radiomarcado está parcialmente reticulado.

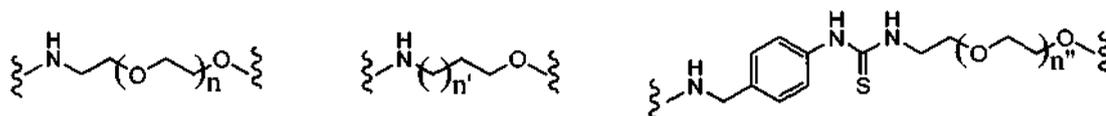
15 El conjugado de alginato descrito puede tener la fórmula:



20 en la que X es  $-(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})-$ , siendo m 1, 2, o 3;

L es un conector seleccionado del grupo que consiste en:

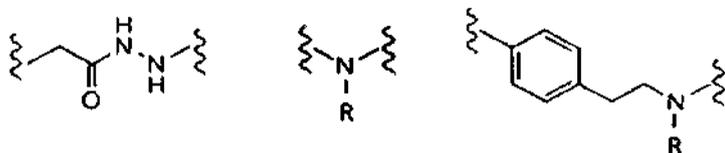
20



en los que n, n' y n'' son cada uno independientemente un número de 0 a 10;

Alg es ácido alginico o una sal de alginato; e

25 Y es un espaciador unido directamente a la unidad del extremo reductor del alginato o a los grupos carboxilo de la cadena de polímero de alginato a través del nitrógeno activo, y se selecciona entre el grupo que consiste en:

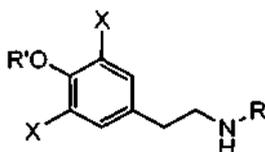


30 en los que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el conjugado de alginato comprende además un ión metálico estable o radiactivo quelado con el resto ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético del conjugado.

35 La sal de alginato puede comprender una sal de catión monovalente y/o una sal de catión multivalente. El catión monovalente y/o multivalente puede comprender uno o más de sodio, potasio, litio, rubidio, cesio, amonio, calcio, estroncio, bario y magnesio. La sal de alginato puede ser alginato sódico, alginato de calcio, o una mezcla de alginato sódico y alginato de calcio.

El ión metálico estable o radiactivo puede comprender un ión de galio. Algunas realizaciones proporcionan que el ión de galio es uno adecuado para formación de imagen, tal como  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  o  $^{68}\text{Ga}$ . El ión metálico radiactivo puede comprender uno adecuado para formación de imagen tal como  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ , o  $^{111}\text{In}$ .

- 5 El alginato puede estar conjugado a una tiramina yodada o a un derivado de tiramina. La tiramina yodada o el derivado de tiramina pueden tener la siguiente fórmula:



- 10 en la que cada X es independientemente hidrógeno o yodo y R y R' son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático. En algunas realizaciones, el yodo se selecciona entre los isótopos de  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$ .

15 El mamífero puede ser un ser humano.

- 15 Se describen nuevos reactivos de formación de imagen nuclear basados en conjugados de alginato para la formación de imagen clínica y preclínica no invasiva del corazón y otros órganos y tejidos. Tales reactivos de formación de imagen son útiles en la medición de la cinética de la deposición de alginato en el miocardio lesionado y otros órganos y tejidos corporales, y también pueden ser útiles para identificar tejidos u órganos con una  
20 concentración de calcio suprafisiológica.

- El alginato sódico es el polisacárido estructural que proporciona a las algas marinas su flexibilidad y resistencia. Es un copolímero en bloque binario lineal que consiste en restos de ácido  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico unidos (1 $\rightarrow$ 4) en diversas proporciones y disposiciones de secuencia. La unión del calcio está mediada por secuencias guluronato homopoliméricas rígidas (bloques G); los bloques de manuronato (bloques M) no se unen al calcio pero proporcionan conectores flexibles que conectan los bloques G unidos al calcio. De acuerdo con el modelo de caja de huevos de la unión de calcio, un ión calcio está unido mediante dos dímeros de guluronato ubicados en dos moléculas de alginato cercanas, formándose cada dímero por dos restos de guluronato adyacentes. La unión de calcio mediante los bloques G en las moléculas de alginato es cooperativa, conduciendo a la formación de una  
25 estructura de tipo cremallera que reticula diferentes moléculas de alginato en una red tridimensional. La reticulación de las moléculas de alginato con iones de calcio en solución acuosa induce la formación de un hidrogel mecánicamente resiliente que se puede desensamblar por retirada o quelación del calcio.

- Para seguir la formación y la deposición del hidrogel de alginato en mamíferos después de inyección intracoronaria, se desarrolló una estrategia de marcaje para el alginato que permite la formación de imagen de la formación y la deposición del hidrogel de alginato mediante PET o SPECT. Se eligió un enfoque de radiometal sobre otras metodologías de radioligando dado que (1) se puede preparar un precursor de conjugado de alginato sin marcar con antelación al marcaje radioactivo; (2) las propiedades de gelificación del conjugado se pueden ajustar por elección de la extensión y el tipo de sustitución de modo que imiten las del alginato nativo; (3) se puede marcar un conjugado diseñado de forma apropiada con un ión metálico radiactivo en una reacción de unión rápida y suave que es químicamente compatible con el alginato; (4) el conjugado marcado con radiometal se puede separar rápida y cuantitativamente del radiometal sin marcar libre; (5) el tiempo requerido para preparar el alginato marcado con radiometal es corto con respecto al período de semidesintegración del radiometal. Sin embargo, en algunas realizaciones, el alginato se radiomarca con otros radioligandos posibles, tales como tiramina yodada o derivados de tiramina.  
45

- Además del agente de reticulación fisiológico calcio, se pueden unir al alginato muchos otros cationes di y trivalentes de metales de transición y pesados. Algunos ejemplos de tales metales incluyen Mg, Sr, Ba, Mn, Cu, Zn, Co, Cr, Al, Fe, Ga, In, Re, Pb, Hg y U. La unión directa de metal a alginato ha encontrado numerosas aplicaciones que varían de la retirada de contaminantes metálicos tóxicos y radiactivos del agua para consumo y el agua residual a aplicaciones de formación de imagen con el radiometal  $^{111}\text{In}$  o aplicaciones de formación de imagen/radioterapia para  $^{188}\text{Re}$ . Sin embargo, la unión directa de un radiometal al alginato tiene diversas desventajas. Por ejemplo, el calcio tisular patológicamente elevado puede competir con el radiometal por la unión al alginato y puede inducir la liberación del ión metálico del polímero de alginato, haciendo esto que el radiometal sea inútil para rastrear la deposición de alginato. Además, la unión del radiometal a los sitios de unión del calcio puede alterar las propiedades de gelificación del alginato que son deseables para un reactivo de formación de imagen que se supone que imita la deposición del alginato en un infarto de miocardio.  
55

- La ligadura del radiometal al polímero de alginato a través de una molécula conectora difuncional tiene varias ventajas potenciales sobre la unión del radiometal a los sitios de unión de calcio del alginato: (1) la unión del  
60

radiometal a un conector difuncional modificado por ingeniería de forma adecuada se puede modificar por ingeniería para que sea de alta afinidad mientras que la afinidad de la unión directa del metal al polímero de alginato es baja y se da mediante la estructura del alginato; (2) la unión de calcio al alginato para inducir la gelificación no compite con la unión de radiometal al conjugado de alginato, dado que el calcio solo tiene baja afinidad por un conector difuncional diseñado de forma apropiada; (3) la concentración radiactiva del alginato marcado con radiometal se puede controlar mediante la proporción del quelante unido al alginato; y (4) la unión de metales multivalentes al alginato a través de un quelante difuncional no causa la formación de hidrogel por reticulación de las moléculas de alginato.

El alginato sódico se puede modificar químicamente mediante la unión de restos químicos al polímero. Algunos ejemplos incluyen la derivatización con agentes de reticulación difuncionales para reticular covalentemente las cadenas de alginato en un hidrogel tridimensional que es independiente de la concentración de calcio. Se han unido o enlazado covalentemente reactivos monofuncionales a marcas radiactivas o histoquímicas que permiten medir la deposición y degradación del alginato. Tales restos químicos se pueden unir a grupos reactivos presentes en el polímero de alginato. Cada resto de ácido hexurónico del polímero de alginato tiene un grupo carboxilo y dos grupos hidroxilo que se pueden modificar químicamente. Además, cada molécula completa de alginato sódico tiene un extremo reductor individual al que se puede conjugar una molécula. Además, se pueden generar aldehídos reactivos a lo largo del polímero por oxidación suave del enlace carbono-carbono C2-C3. Las químicas de derivatización para la modificación estable del alginato en estos sitios incluyen formación de enlace amida a través de éster activado, formación de base de Schiff y aminación reductora, entre otras.

Se han desarrollado numerosos tipos diferentes de quelantes metálicos para unir radiometales a moléculas biológicas. Algunos ejemplos de tales quelantes se pueden encontrar en la revisión de Wadas *et al.* 2010 (Chem. Rev. 110: 2858-2902). Los quelantes difieren en su estructura química y su afinidad y cinética de unión por diferentes iones metálicos y poseen diferentes condiciones óptimas de unión requeridas para la formación de los complejos metálicos. Numerosos quelantes usados habitualmente con una alta estabilidad del complejo metal-quelante *in vivo* requieren una temperatura elevada, por ejemplo 100 °C, para la formación eficaz del complejo metálico. Tales temperaturas elevadas pueden ser indeseables ya que pueden dañar la macromolécula, conduciendo a su degradación o desnaturalización. Dado que el enlace glicosídico del alginato puede experimentar hidrólisis a temperaturas elevadas, es preferente un quelante que evite el uso de temperaturas elevadas para la formación del complejo. Los complejos de ión metálico-quelante formados varían en su estabilidad en los fluidos biológicos. Los quelantes biológicos de metales presentes en el plasma tales como albúmina y transferrina pueden unir radiometales libres y facilitarán la disgregación del complejo metal-quelante.

Se pueden usar varios radiometales diferentes usados en formación de imagen nuclear para marcar el alginato a través de un quelante de metales adecuado unido al alginato. En algunas realizaciones, el radiometal es un ión de galio. Entre los diferentes radiometales, el galio en forma de catión trivalente  $Ga^{III}$  se puede ver favorecido en algunas realizaciones debido a que (1) se puede preparar un único conjugado para su uso con ambas modalidades de formación de imagen, formación de imagen por PET y SPECT, modalidades con suficiente sensibilidad y resolución espacial y temporal ya que existen isótopos de galio adecuados para ambas modalidades de formación de imagen; (2) el quelante de ión de galio macrocíclico ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1,4,7-triacético (NOTA) forma un complejo  $Ga^{III}$ -NOTA de alta afinidad con el galio en minutos a las temperaturas fisiológicas (20 °C a 37 °C); este complejo es estable en la sangre; (3) la afinidad del NOTA por el ión de galio es lo suficientemente alta para evitar una unión significativa de galio a los sitios de unión de calcio del polímero de alginato durante la reacción de marcaje; y (4) el quelante NOTA se puede modificar químicamente con una molécula espaciadora para formar un conector difuncional que une el NOTA a uno de los sitios reactivos del alginato sin alterar significativamente la afinidad de unión del quelante por el ión de galio. Sin embargo, también se pueden usar otros radiometales o radioligandos adecuados que se describen en el presente documento para el radiomarcaje del alginato.

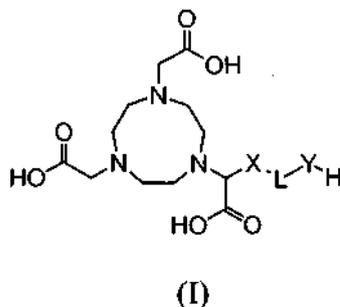
Los estudios publicados documentan la unión de galio a un biomaterial de biovidrio de alginato con el fin de proporcionar un biomaterial antibacteriano compatible con tejidos ya existentes propicio para la regeneración ósea. Este material difiere del conjugado de alginato con galio-NOTA descrito en el presente documento en que no emplea un conector difuncional para permitir una unión estable y de alta afinidad del galio al polímero de alginato, sino que utiliza una unión débil y reversible del ión de galio al polímero de alginato para crear un soporte antibacteriano de liberación de ión de galio para la modificación por ingeniería de tejido óseo.

De ese modo, el marcaje de alginato con ión metálico de galio a través de un conector difuncional que une el ión de galio y se une covalentemente al alginato, la síntesis química de un conjugado de alginato que contiene NOTA, la preparación de un conjugado de alginato con NOTA y galio y el uso de tal conjugado NOTA-alginato marcado con galio en aplicaciones de formación de imagen preclínicas y clínicas son nuevos y no se han informado anteriormente.

Aunque se hace referencia específica al alginato sódico, son compatibles otros alginatos con las realizaciones de todos los aspectos que se describen en el presente documento. Los alginatos de diferentes algas y cepas bacterianas varían en su peso molecular, polidispersidad, contenido en ácido gulurónico, disposición de secuencia de los bloques G, bloques M y bloques GM, y modificación química. Estas diferencias no alteran su idoneidad para la

aplicación de formación de imagen descrita. Los alginatos se pueden fraccionar por peso molecular y composición química, derivatizar o funcionalizar químicamente con reticuladores u otros reactivos y preparar en diferentes formas de sal incluyendo el ácido libre, ninguna de las cuales haría que la estrategia de formación de imagen descrita fuera imposible de aplicar.

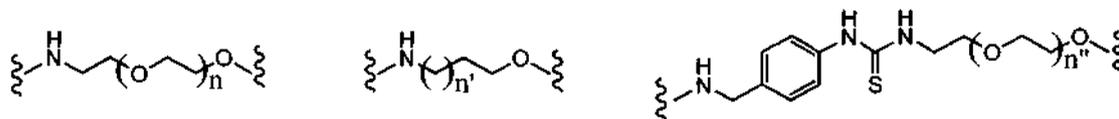
5 Se describen conectores difuncionales derivados de la estructura de NOTA que tienen la estructura general de la Fórmula (I):



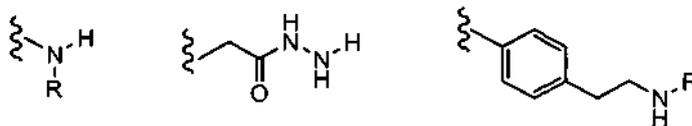
10 en la que X es  $-(CH_2)_mC(O)-$ ; m es 1, 2, o 3; L es un conector; H es hidrógeno; e Y-H es un grupo funcional capaz de conjugarse con alginato a través de unión directa o aminación reductora en el extremo reductor, o a través de formación de enlace amida con los grupos carboxilo de la cadena de alginato. El compuesto puede ser una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del compuesto de Fórmula (I).

15 Estos conectores derivados de NOTA son moléculas difuncionales que después de su conjugación al alginato permiten el marcaje del alginato con iones metálicos. Los iones metálicos pueden ser estables o experimentar un decaimiento radiactivo. El conector derivado de NOTA se puede marcar con un ión metálico radiactivo. El conector derivado de NOTA se puede marcar con  $^{66}Ga$ ,  $^{67}Ga$  o  $^{68}Ga$ . El ión metálico radiactivo puede ser el isótopo emisor de rayos gamma  $^{67}Ga$ . El ión metálico radiactivo puede ser un isótopo emisor de positrones  $^{66}Ga$  o  $^{68}Ga$ .

El conector L descrito puede tener una de las siguientes estructuras:



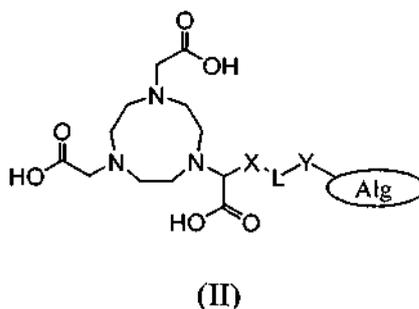
25 en las que n, n' y n'' son cada uno independientemente un número de 0 a 10. Y-H se puede seleccionar del grupo que consiste en:



30 en las que R se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático.

También se describe un conjugado de alginato que contiene metal-quelante. En una realización a modo de ejemplo, este conjugado es un conjugado de NOTA-alginato que tiene la estructura general de la Fórmula (II):

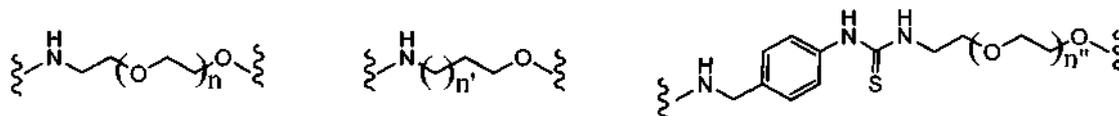
35



5 en la que X es  $-(CH_2)_mC(O)-$ ; m es 1, 2, o 3; L es un conector; Alg es ácido algínico o una sal de alginato; Y es un espaciador unido directamente por aminación reductora al extremo reductor, o a través de formación de enlace amida a los grupos carboxilo del polímero de alginato. La proporción molar de NOTA-conector con respecto al alginato se puede controlar mediante las condiciones de la reacción de conjugación para que se ajuste a las necesidades particulares de la aplicación de formación de imagen. El compuesto puede ser una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto de Fórmula (II).

10 Estos conjugados NOTA-alginato se pueden marcar con iones metálicos. El conjugado NOTA-alginato se puede marcar con un ión metálico radiactivo. El conjugado NOTA-alginato se puede marcar con isótopos de galio adecuados para aplicaciones de formación de imagen tales como  $^{66}Ga$ ,  $^{67}Ga$  o  $^{68}Ga$ . El ión metálico radiactivo puede ser el isótopo emisor de rayos gamma  $^{67}Ga$ . El ión metálico radiactivo puede ser el isótopo emisor de positrones  $^{66}Ga$  o  $^{68}Ga$ .

15 L puede tener una de las siguientes estructuras:

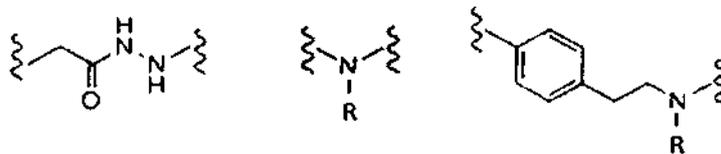


20 en las que n, n' y n'' son cada uno independientemente un número de 0 a 10.

La sal de alginato puede comprender una sal de catión monovalente y/o una sal de catión multivalente. El catión monovalente y/o multivalente puede comprender uno o más de sodio, potasio, litio, rubidio, cesio, amonio, calcio, estroncio, bario y magnesio. La sal de alginato puede ser alginato sódico, alginato de calcio, o una mezcla de alginato sódico y alginato de calcio.

25 El alginato puede tener un peso molecular entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 kDa. El alginato puede tener un peso molecular de aproximadamente 30 kDa.

30 El Y descrito puede tener una de las siguientes estructuras:



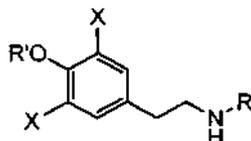
35 en las que R se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático.

Se describe el uso de estos conjugados en la formación de imagen clínica. Algunos ejemplos de tales modalidades de formación de imagen incluyen, pero no se limitan a PET o SPECT. Se pueden usar otros tipos de formación de imagen con estos conjugados de alginato marcados con radiometal. Por ejemplo, se pueden emplear conjugados de alginato marcados con radiometal en formación de imagen mediante autorradiografía de cuerpo completo en escenarios preclínicos o con una cámara gamma (cámara de Anger) en escenarios clínicos o preclínicos. Tal formación de imagen puede proporcionar monitorización no invasiva de una solución de alginato acuosa reticulada en los cuerpos de mamíferos, así como la visualización de su deposición cardiaca. El mamífero puede ser un ser humano.

45

Los conjugados NOTA-conector o NOTA-alginato se pueden marcar con iones metálicos distintos del galio. Algunos iones metálicos con aplicaciones en formación de imagen nuclear y alta afinidad por NOTA incluyen cobre e indio, en particular los isótopos de cobre  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ , y  $^{67}\text{Cu}$  o el isótopo de indio  $^{111}\text{In}$ .

- 5 También se pueden usar otros conjugados de alginato radiomarcados. Por ejemplo, el alginato puede estar conjugado a una tiramina yodada o un derivado de tiramina. La tiramina yodada o el derivado de tiramina pueden tener la siguiente fórmula:



- 10 en la que cada X es independientemente hidrógeno o yodo y R y R' son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático. El yodo se puede seleccionar entre los isótopos de  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$ .

- 15 El  $^{68}\text{Ga}$  presenta numerosas ventajas potenciales para la formación de imagen por PET clínica. A diferencia de otros emisores de positrones (por ejemplo  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ , y  $^{124}\text{I}$ ), se puede producir  $^{68}\text{Ga}$  ( $T_{1/2} = 68$  min,  $\beta^+ = 89\%$  y EC = 11 %) mediante el uso de un generador de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  disponible en el mercado. Del mismo modo,  $^{67}\text{Ga}$  presenta ventajas significativas para la formación de imagen por SPECT ya que está aprobado y se encuentra disponible en el mercado para uso clínico en forma de la sal de citrato. La alta actividad específica de cualquiera de los dos isótopos permite la producción de conjugado NOTA-alginato marcado con galio con alta actividad específica adecuado para formación de imagen por SPECT cuando se usa en forma de un conjugado de alginato con NOTA y galio parcialmente reticulado o en forma de un trazador diluido en una solución de alginato parcialmente reticulada.

- 20 Una ventaja del galio sobre otros iones metálicos es que el ión de galio forma un complejo muy estable con los derivados del ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1,4,7-triacético (NOTA) a temperatura ambiente o a la temperatura corporal de un mamífero. Aunque el alginato sódico puede unirse al ión de galio, el galio se une a NOTA con mayor afinidad y el complejo  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -NOTA es estable incluso en presencia de un exceso molar 100x de alginato sódico a 37 °C. De ese modo, se puede marcar con éxito un conjugado NOTA-alginato con isótopos de galio estable o galio radiactivo tales como  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{68}\text{Ga}$ .

- 30 El conjugado NOTA-alginato marcado con galio se puede formular por reticulación parcial con iones de calcio para uso preclínico y clínico de dos formas diferentes.

- (1) El conjugado NOTA-alginato marcado con galio se puede formular en forma de una solución homogénea parcialmente reticulada con calcio en la que la mayoría o la totalidad de las moléculas de alginato se derivatiza con NOTA-conector y al menos una parte de todos los restos NOTA-conector está quelada con radiogalio. Debido a la gran abundancia de sitios de NOTA en esta preparación, el marcaje de NOTA con ión de galio puede ser altamente subestequiométrico, uniéndose el galio solo a una pequeña fracción de los sitios de NOTA mientras que deja la mayoría de todos los sitios de NOTA libres de ión de galio. Para usar este material para la formación de imagen de la deposición de alginato reticulado, se administra una cantidad del conjugado NOTA-alginato marcado con galio formulado similar a la de alginato parcialmente reticulado con calcio formulado mediante inyección intracoronaria. De ese modo, en este formato, el NOTA-alginato marcado con galio parcialmente reticulado con calcio se usa en lugar de y reemplaza el alginato parcialmente reticulado con calcio.

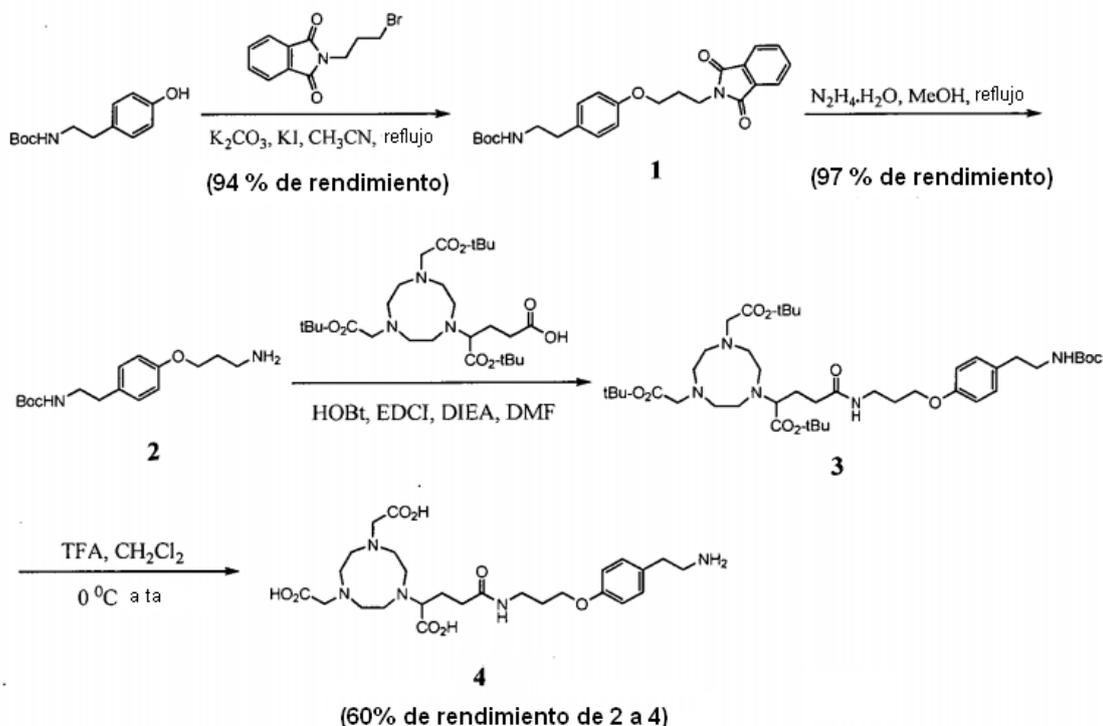
- (2) Alternativamente, se puede sintetizar NOTA-alginato marcado con galio que contiene una alta proporción de sitios de NOTA marcados con ión de galio. Este material tiene una actividad específica suficientemente alta de modo que tal conjugado NOTA-alginato marcado con galio se puede usar como trazador por mezcla de pequeñas cantidades del conjugado NOTA-alginato marcado con galio con solución de alginato parcialmente reticulada con calcio para inyección intracoronaria. Cuando se usa de este modo, la deposición de conjugado NOTA-alginato marcado con galio traza la deposición de alginato parcialmente reticulado con calcio en el tejido cardíaco mediante su incorporación al hidrogel de alginato reticulado con calcio.

## 50 Ejemplos

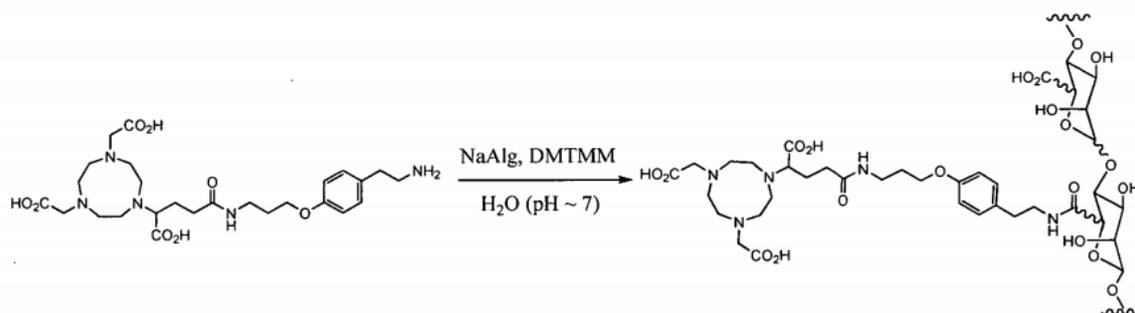
Se sintetizaron ejemplos no limitantes de los compuestos de la presente invención (**Ejemplos 1 - 5**), y todos los compuestos intermedios y los productos finales se caracterizaron por RMN  $^1\text{H}$ , CL-EM y/o análisis elemental. Las condiciones para el marcaje del conjugado NOTA-alginato con radiogalio se muestran en el **Esquema 6**.

### 55 Ejemplo 1: síntesis de derivado de tiramina de NOTA

Se sintetizó un derivado de tiramina de NOTA de acuerdo con el **Esquema 1**:

**Esquema 1: derivado de tiramina de NOTA****Ejemplo 2: síntesis de conjugado NOTA-alginato a partir de derivado de tiramina de NOTA**

- 5 El derivado de tiramina de NOTA del **Ejemplo 1** se hizo reaccionar con alginato sódico en presencia de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) y agua. El **Esquema 2** muestra la formación de un enlace amida entre el grupo amino del derivado de tiramina de NOTA y el grupo carboxilo del alginato:

**Esquema 2: formación de enlace amida en medio acuoso mediante DMTMM**

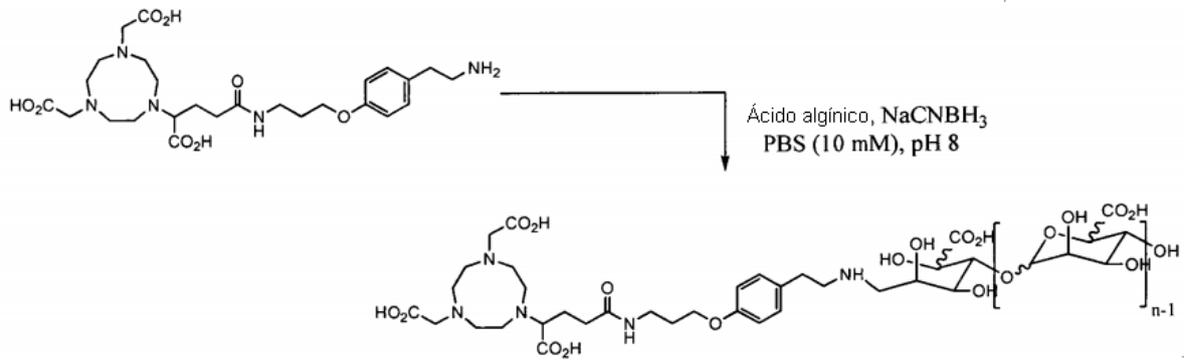
10

**Ejemplo 3: síntesis alternativa de conjugado NOTA-alginato a partir de derivado de tiramina de NOTA**

- Una alternativa a la reacción mostrada en el **Esquema 2** se muestra en el **Esquema 3**. El derivado de tiramina de NOTA del **Ejemplo 1** se hizo reaccionar con ácido algínico en las condiciones que se muestran en el **Esquema 3**. En lugar de formar un enlace amida como en el **Ejemplo 2**, tiene lugar la aminación reductora entre la amina del derivado de tiramina de NOTA y la unidad del extremo reductor del alginato.

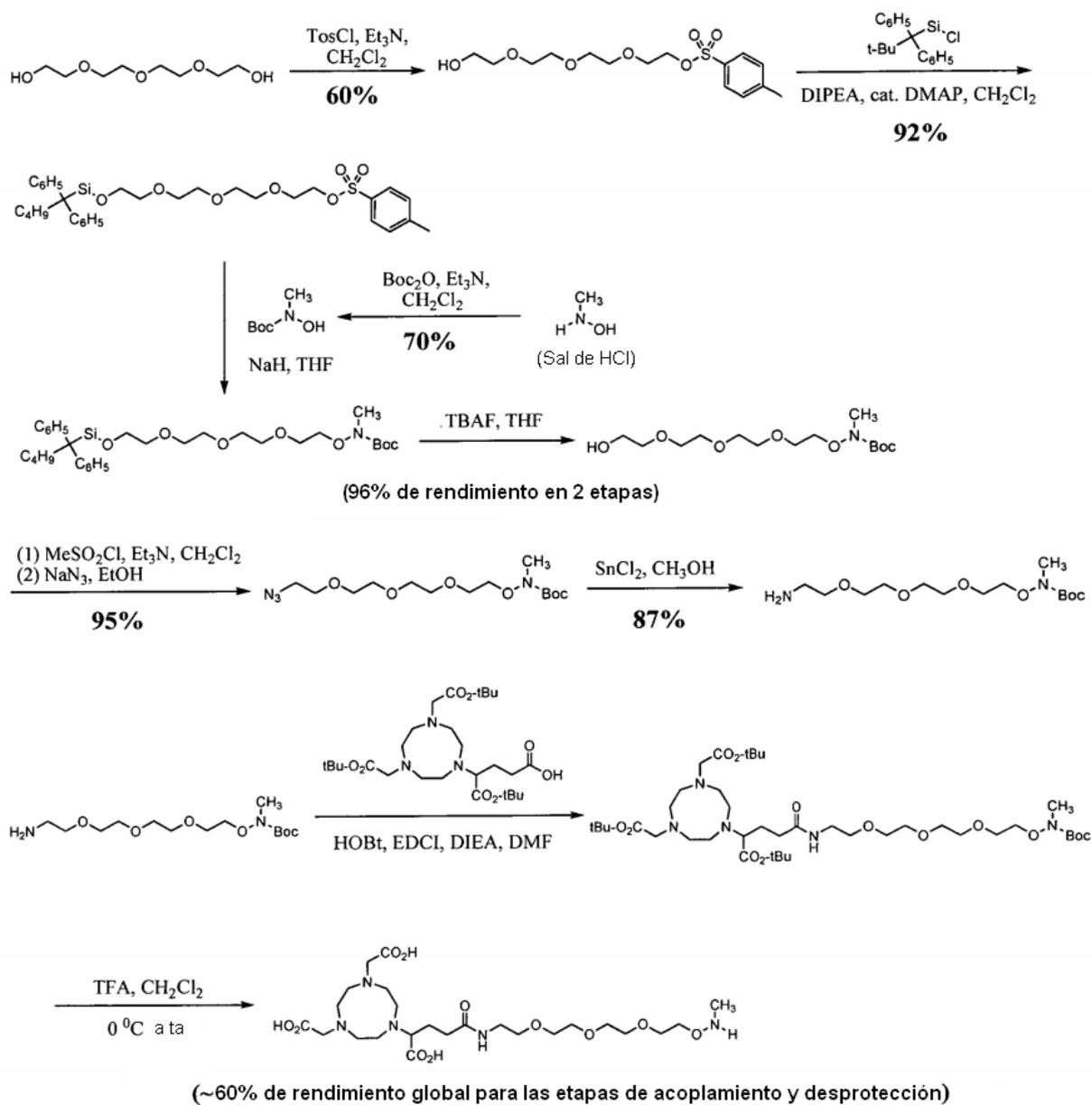
15

**Esquema 3:** aminación reductora con la unida del extremo reductor del alginato



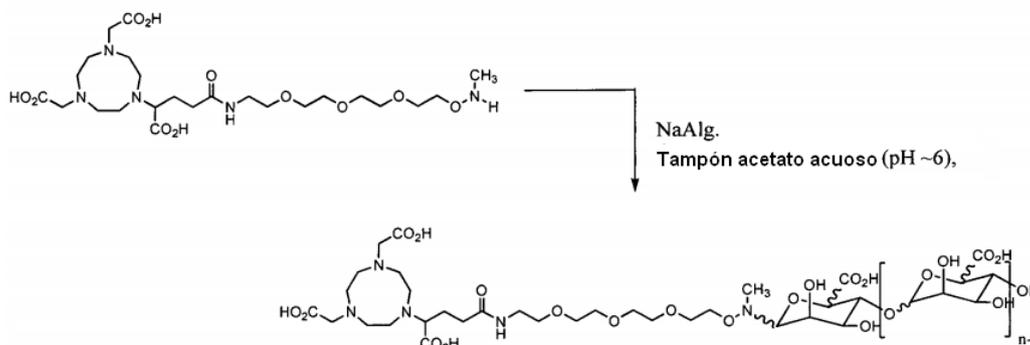
**Ejemplo 4: síntesis de NOTA que contiene N-metilhidroxilamina**

- 5 Se sintetizó un conector de NOTA que contiene N-metilhidroxilamina de acuerdo con el **Esquema 4**:

**Esquema 4:** síntesis de un conector de NOTA que contiene N-metilhidroxilamina**Ejemplo 5:** síntesis de conjugado NOTA-alginato a partir de NOTA que contiene N-metilhidroxilamina

- 5 Como se muestra en el **Esquema 5**, se produjo un conjugado NOTA-alginato por unión directa del conector de NOTA que contiene N-metilhidroxilamina del **Ejemplo 4** a la unidad del extremo reductor del alginato:

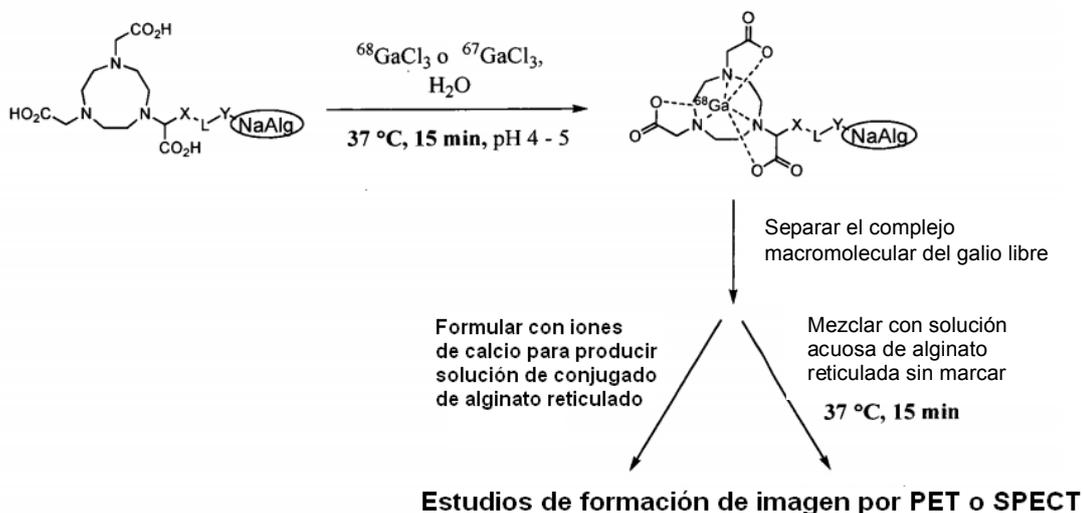
Esquema 5: Enlace directo a la unidad del extremo reductor del alginato



**Ejemplo 6: marcaje del conjugado NOTA-alginato**

- 5 El **Esquema 6** muestra las condiciones de marcaje para el conjugado NOTA-alginato: (1) incubación durante 15 min a 37 °C de conjugado NOTA-alginato con <sup>68</sup>GaCl<sub>3</sub> eluido de un generador, o <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> de un ciclotrón, (2) separación rápida por filtración en gel o filtración por corte de peso molecular del conjugado radiomarcado del ión de galio libre sin marcar, y (3) mezcla del conjugado de alginato con conector de NOTA marcado con galio con solución de alginato de calcio parcialmente reticulada para inyección o formulación con iones de calcio para producir un
- 10 conjugado NOTA-alginato marcado con galio parcialmente reticulado.

**Esquema 6: marcaje con galio de conjugado NOTA-alginato**

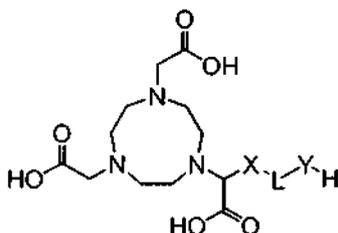


15 La referencia en la presente memoria descriptiva a "una realización", "ciertas realizaciones", "una o más realizaciones" o "una realización" significa que un rasgo, estructura, material, o característica particular que se describe junto con la realización se incluye en al menos una realización de la invención. De ese modo, la aparición de expresiones tales como "en una o más realizaciones", "en ciertas realizaciones", "en una realización" o "en una

20 realización" en diversos lugares en la presente memoria descriptiva no se refiere necesariamente a la misma realización de la invención. Además, los rasgos, estructuras, materiales, o características particulares se pueden combinar de cualquier forma adecuada en una o más realizaciones.

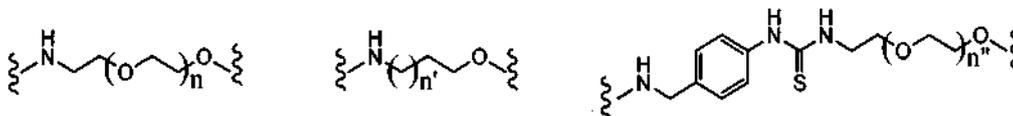
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



5

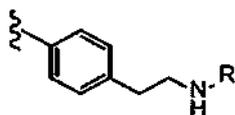
en la que X es  $-(CH_2)_mC(O)-$ , siendo m 1, 2, o 3;  
L es un conector seleccionado del grupo que consiste en:



10

en los que n, n' y n'' son cada uno independientemente un número de 0 a 10;  
H es hidrógeno; e  
Y-H tiene la siguiente estructura:

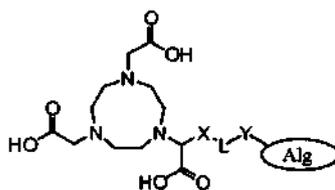
15



en la que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático;  
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

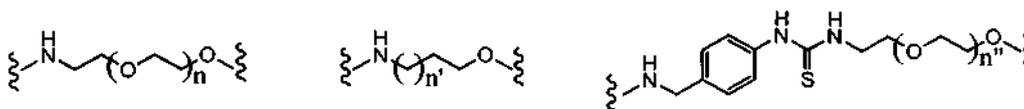
20

2. Un conjugado de alginato que tiene la fórmula:



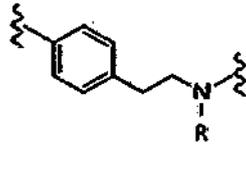
25

en la que X es  $-(CH_2)_mC(O)-$ , siendo m 1, 2, o 3;  
L es un conector seleccionado del grupo que consiste en:



30

en los que n, n' y n'' son cada uno independientemente un número de 0 a 10;  
Alg es ácido alginico o una sal de alginato; e  
Y es un espaciador unido directamente a la unidad del extremo reductor del alginato o a los grupos carboxilo de la cadena de polímero de alginato a través del nitrógeno activo, y tiene la siguiente estructura:



en la que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, bencilo o un grupo aromático; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5
3. El compuesto de la reivindicación 1 o el conjugado de alginato de la reivindicación 2, en el que el compuesto o el conjugado comprende además un ión metálico estable o radiactivo quelado con el resto ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético del compuesto o conjugado, respectivamente.
- 10
4. El compuesto o el conjugado de alginato de la reivindicación 3, en el que el ión metálico estable o radiactivo comprende un ión de galio.
5. El compuesto o el conjugado de alginato de la reivindicación 3, en el que el ión metálico radiactivo comprende  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ , o  $^{111}\text{In}$ .
- 15
6. Un conjugado de alginato tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para su uso en un método de formación de imagen clínica.
- 20
7. Una mezcla de un conjugado de alginato radiomarcado y alginato parcialmente reticulado con calcio para su uso en un método de formación de imagen de la deposición de alginato en un mamífero, comprendiendo dicho método la formación de imagen de la distribución temporal y espacial del conjugado de alginato radiomarcado, en la que dicho conjugado de alginato es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
- 25
8. El conjugado de alginato para el uso de la reivindicación 6 o 7, en la medida que la reivindicación 6 vuelve a remitir a cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el conjugado de alginato radiomarcado está parcialmente reticulado.