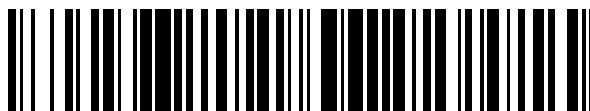


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 935**

51 Int. Cl.:

A61K 51/04 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

A61K 103/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2005** **PCT/GB2005/002807**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2006** **WO06008496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2005** **E 05763654 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017** **EP 1768708**

54 Título: **N4 quelantes conjugados**

30 Prioridad:

19.07.2004 GB 0416062

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

04.08.2017

73 Titular/es:

GE HEALTHCARE LIMITED (100.0%)

Amersham Place

Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA , GB

72 Inventor/es:

**STOREY, ANTHONY E;
WADSWORTH, HARRY;
POWELL, NIGEL A y
DUNCANSON, PHILIP**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 628 935 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

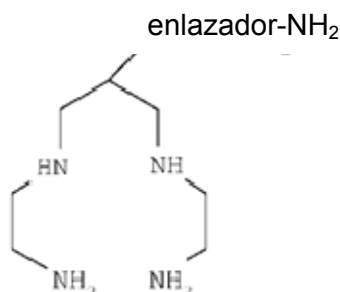
N4 quelantes conjugados

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a quelantes mejorados de tetraamina conjugados con moléculas de direccionamiento biológico, adecuados para formar complejos metálicos con el compuesto radiometálico ^{99m}Tc . Los complejos de compuestos radiometálicos son útiles como radiofármacos de ^{99m}Tc .

Antecedentes de la invención

- 10 El documento de patente de los Estados Unidos US 5489425 (Dow Chemical) describe una gama de quelantes de tetraamina funcionalizados de cadena abierta y macrocíclica útiles para la complejación de metales, en particular complejos de rodio radiactivos y no radiactivos, especialmente complejos radiometálicos de ^{105}Rh o ^{101m}Rh . Las tetraaminas específicas descritas incluyen:



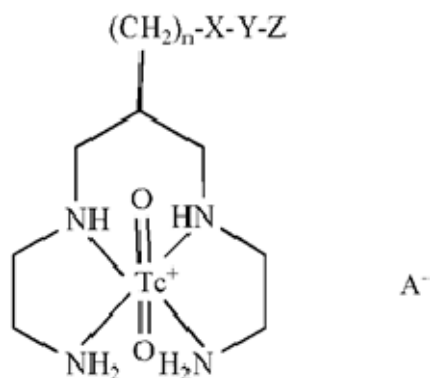
- 15
- | [Enlazador] | Compuesto |
|---|--------------|
| -CH ₂ [<i>p</i> -fenileno]- | BA-2,3,2-tet |
| -[<i>p</i> -fenileno]- | AN-2,3,2-tet |
| -(CH ₂) ₃ - | PA-2,3,2-tet |
- 20 Los quelantes bifuncionales se describen como útiles para la conjugación con anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, con fines terapéuticos o diagnósticos. El documento de patente de los Estados Unidos US 5489425 describe (Ejemplos 21, 22a y 23) que el conjugado quelante del complejo anticuerpo-compuesto radiometálico se prepara formando primero el complejo metálico ^{105}Rh , y después haciendo reaccionar con el anticuerpo seguido por la purificación. El documento de patente de los Estados Unidos US 5489425 no menciona los
- 25 conjugados anticuerpo-quelante que no están complejos, es decir sin compuesto radiometálico coordinado. El documento de patente de los Estados Unidos US 5489425 no muestra cómo diferenciar la amina colgante de las cuatro aminas del quelante en dichas reacciones de conjugación de anticuerpos. El documento de patente de los Estados Unidos US 5489425 afirma que los quelantes bifuncionales "también serían útiles en la complejación de tecnecio y renio", pero no revela cómo se lograría esto ni ningún complejo de tecnecio real.
- 30 El documento de patente de los Estados Unidos US 5650134 describe un conjugado de quelante-péptido de somatostatina de una gama de quelantes. El Ejemplo 1 describe la conjugación de un 6-(*p*-isotiocianatobencil)-1,4,8,11-tetraazaundecano a un péptido octreótido.
- 35 El documento de patente europea EP 1181936 A1 describe conjugados de bombesina (es decir, de tetradecapéptido) de quelantes de tetraamina, preparados usando los quelantes bifuncionales BBN-1 y BBN-2, y los complejos de ^{99m}Tc de los mismos.

Los complejos de ^{99m}Tc se dice que exhiben un rápido aclaramiento del cuerpo murino vía los riñones y el sistema urinario. El documento de patente europea EP 1181936 A1 no proporciona, sin embargo, ninguna descripción o referencia de la síntesis de BBN-1 o BBN-2, solamente para la etapa en la que se conjugan con el extremo N de la bombesina. La conjugación de BBN-2 con bombesina y marcado de ^{99m}Tc para dar un compuesto radiofarmacéutico potencial para la formación de imágenes de un tumor también ha sido descrito por Nock et al [Eur.J.Nucl.Med., 30(2), 247-258 (2003)]. Se dice que los complejos de ^{99m}Tc imparten hidrofiliidad mejorada en comparación con la técnica anterior de conjugados bombesina-quelato, y por lo tanto se esperaría que favorecieran la excreción vía los riñones y el sistema urinario.

La presente invención

Se describen composiciones radiofarmacéuticas que comprenden los complejos metálicos de tecnecio de la invención, junto con kits no radiactivos para la preparación de tales productos radiofarmacéuticos.

En una primera forma de realización, la presente invención proporciona un complejo de tecnecio ^{99m}Tc catiónico de la fórmula (I):



(I)

donde:

X es -NR(C=O)-, -CONR-

o un grupo Q;

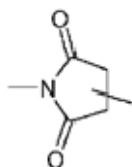
- 5 Y es independientemente aminoácidos 1-10 *D*- o *L*-, o un grupo PEG de fórmula $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_w$, donde *w* es un número entero de valor 3-25;

Z es un resto de direccionamiento biológico sintético elegido entre un péptido 3-30 mer;

n es un número entero de valor 1 a 8;

R es H, alquilo C₁₋₄, alcoialquilo C₂₋₄, hidroxialquilo C₁₋₄, o fluoroalquilo C₁₋₄;

- 10 Q es



A es un contraión;

con la condición de que los átomos de la cadena X¹-(Y)- carezcan de enlaces en los que un heteroátomo está unido directamente a otro.

- 15 El radioisótopo de tecnecio puede ser un γ emisor y, tal como el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o un emisor de positrones adecuado para la formación de imágenes PET, tal como $^{94\text{m}}\text{Tc}$. Preferiblemente, el radioisótopo de tecnecio es $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o $^{94\text{m}}\text{Tc}$, más preferiblemente es $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

X es -CONR-, -NR(C=O)- o un grupo Q. X es lo más preferiblemente -CONR- o -NR(C=O)-, con CONH- y -NH(C=O)-, siendo especialmente preferidos.

- 20 El grupo enlazador $-(\text{CH}_2)_n\text{-X-(Y)-}$ de la fórmula I se elige de modo que la cadena de átomos X¹-(Y)- carece de enlaces en los que un heteroátomo está unido directamente a otro, donde el término "heteroátomo" significa un átomo no de carbono tal como nitrógeno, oxígeno o azufre. Esto significa que la cadena carece de enlaces tales como O-O, N-N u O-N.

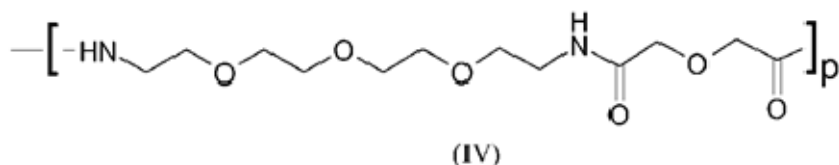
- 25 Se anticipa que el papel del grupo enlazador $-(\text{CH}_2)_n\text{-X-(Y)-}$ de la fórmula I es distanciar el complejo de tecnecio del sitio de unión activo del resto de direccionamiento biológico (Z) *in vivo*. Esto ayuda a asegurar que el complejo de tecnecio relativamente voluminoso no inhiba estéricamente la unión a sitios activos *in vivo*. El grupo alquilo- $(\text{CH}_2)_n$ - tiene la ventaja de que no hay interacciones significativas de enlace de hidrógeno con el resto de direccionamiento biológico conjugado (Z), de modo que el enlazador no arropa a Z. Se prefieren grupos alquilo que tienen *n* = 1 a 6, lo más preferiblemente 2 a 4, siendo 2 especialmente preferible.

- 30 Los grupos enlazadores de la presente invención carecen de anillos arilo. Esto ayuda a minimizar la lipofilidad del complejo de tecnecio más el grupo enlazador que está unido a la porción de direccionamiento biológico (Z) del conjugado. El volumen estérico y el peso molecular del grupo enlazador (y por lo tanto el complejo de tecnecio) también se minimiza, mientras que se mantiene la flexibilidad del enlace.

La naturaleza del grupo enlazador también se puede usar para modificar la biodistribución del agente de formación de imágenes. Así, por ejemplo, la introducción de grupos éter en-(Y)- ayudará a minimizar la unión a las proteínas plasmáticas. Cuando -(Y)- comprende un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG) o una cadena peptídica de 1 a 10 residuos de aminoácidos, el grupo enlazador puede funcionar para modificar las tasas farmacocinéticas y de eliminación de la sangre del agente de formación de imágenes *in vivo*. Tales grupos enlazadores "biomodificadores" pueden acelerar el aclaramiento del agente de formación de imágenes de tecnecio de los tejidos circundantes, tales como los músculos o el hígado, y/o de la sangre, proporcionando así una mejor imagen de diagnóstico debido a una menor interferencia de fondo. También se puede usar un grupo enlazador biomodificador para favorecer una ruta particular de excreción, por ejemplo, *vía* los riñones en lugar de *vía* el hígado. Alternativamente, pueden prolongar el tiempo de residencia de la sangre, permitiendo que más agente se acumule en el sitio diana *in vivo*.

Cuando -(Y)- comprende una cadena peptídica de residuos de aminoácidos, los residuos de aminoácidos se eligen preferiblemente entre la glicina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico o serina. El número de aminoácidos en la cadena peptídica es preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 3.

Cuando -(Y)- comprende un resto PEG, comprende preferiblemente un grupo de fórmula $(-OCH_2CH_2O)_w$ donde w es un número entero de valor 3 a 25. El número entero w es preferiblemente de 6 a 22. Un grupo -(Y)- que contiene PEG especialmente preferido es una unidad derivada de la polimerización de la estructura tipo PEG monodispersa, el ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de fórmula IV:



En donde p es un número entero de 1 a 10.

Por el término fluoroalquilo se entiende un grupo alquilo con al menos un sustituyente de flúor, es decir, el término abarca grupos desde monofluoroalquilo (por ejemplo $-CH_2F$) a perfluoroalquilo (por ejemplo CF_3).

El grupo-(Y)- comprende preferiblemente un resto de ácido diglicólico, un resto de maleimida, un ácido glutárico, un ácido succínico, una unidad basada en polietilenglicol o una unidad similar a PEG de la fórmula IV.

Por el término "sintético" se entiende el significado convencional del término es decir hecho por el hombre en lugar de ser aislado de fuentes naturales, por ejemplo del cuerpo de un mamífero. Tales compuestos tienen la ventaja de que su fabricación y su perfil de impurezas pueden controlarse completamente. Los anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos están por lo tanto fuera del alcance de las presentes reivindicaciones.

Por el término "grupo de direccionamiento biológico" se entiende: péptidos o análogos de péptidos 3-30 mer que pueden ser péptidos lineales o péptidos cíclicos o combinaciones de los mismos; o sustratos, antagonistas o inhibidores enzimáticos; compuestos de unión a receptores sintéticos; oligonucleótidos o fragmentos de oligo-ADN o oligo-ARN.

Por el término péptido cíclico se entiende una secuencia de 5 a 15 aminoácidos en la que los dos aminoácidos terminales están unidos entre sí por un enlace covalente que puede ser un enlace peptídico o disulfuro o un enlace sintético no peptídico tal como un enlace tioéter, fosfodiéster, disiloxano o uretano. Por el término "aminoácido" se entiende un aminoácido, análogo de aminoácido o mimético de aminoácido *L*- o *D*- que puede ser ópticamente puro, es decir un enantiómero único y por lo tanto quiral, o una mezcla de enantiómeros. Preferiblemente, los aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros. Por el término miméticos de aminoácido se entienden análogos sintéticos de aminoácidos naturales que son isómeros, es decir, han sido diseñados para imitar la estructura estérica y electrónica del compuesto natural. Tales isómeros son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, depsipéptidos, péptidos retro-inversos, tioamidas, cicloalcanos o tetrazoles 1,5-disustituidos [véase M. Goodman, Biopolymers, 24, 137, (1985)].

Péptidos adecuados para uso en la presente invención incluyen:

- Somatostatina, octreótido y análogos,
- Péptidos que se unen al receptor ST, donde ST se refiere a la toxina termoestable producida por *E coli* y otros microorganismos;
- Fragmentos de laminina, por ejemplo YIGSR, PDSGR, IKVAV, LRE y KCQAGTFALRGDPQG,
- Péptidos de N-formilo para dirigir a sitios de acumulación de leucocitos,
- Factor plaquetario 4 (PF4) y sus fragmentos,

• Péptidos que contienen RGD (Arg-Gly-Asp), que pueden, por ejemplo, dirigirse a la angiogénesis [R.Pasqualini *et al.*, Nat Biotechnol. 1997 Junio; 15(6): 542-6]; [E. Ruoslahti, Kidney Int. 1997 Mayo; 51(5): 1413-7].

• Fragmentos de péptidos de α_2 -antiplasmina, fibronectina o beta-caseína, fibrinógeno o trombospondina. Las secuencias de aminoácidos de α_2 -antiplasmina, fibronectina, beta-caseína, fibrinógeno y trombospondina pueden encontrarse en las siguientes referencias: precursor de α_2 -antiplasmina [M.Tone *et al.*, J. Biochem, 102, 1033, (1987)]; beta-caseína [L.Hansson *et al.*, Gene, 139, 193, (1994)]; fibronectina [A.Gutman *et al.*, FEBS Lett, 207, 145, (1996)]; precursor de trombospondina-1 [V.Dixit *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 83, 5449, (1986)]; R.F.Doolittle, Ann. Rev. Biochem, 53, 195, (1984);

• Péptidos que son sustratos o inhibidores de la angiotensina, tales como: angiotensina II Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (EC Jorgensen *et al.*, J. Med Chem, 1979, Vol 22, 9, 1038-1044)

• [Sar, Ile] angiotensina II: Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile (RK Turker *et al.*, Science, 1972, 177, 1203).

• Angiotensina I: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu.

Preferiblemente, los péptidos de la presente invención comprenden péptidos antiplasmina o angiotensina II. Los péptidos de antiplasmina comprenden una secuencia de aminoácidos tomada del extremo N de:

(i) α_2 -antiplasmina,

es decir, NH₂-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys-OH o variantes de esto en las que uno o más aminoácidos han sido intercambiados, añadidos o eliminado como:

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

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

NH₂ Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Gly-OH; o

(ii) caseína

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

Los péptidos sintéticos de la presente invención pueden obtenerse mediante síntesis en fase sólida convencional, como se describe en P. Lloyd-Williams, F. Albericio y E. Girald; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, 1997.

Los sustratos, antagonistas o inhibidores enzimáticos adecuados incluyen la glucosa y análogos de glucosa tales como la fluorodesoxiglucosa; ácidos grasos o elastasa, inhibidores de la angiotensina II o metaloproteinasas. Un antagonista de la angiotensina II no peptídico preferido es el losartán.

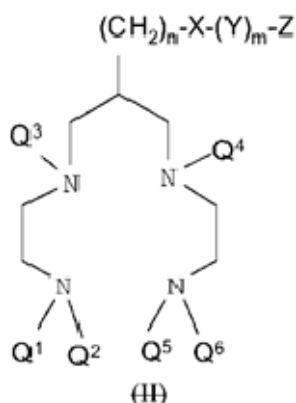
Los compuestos adecuados de unión al receptor sintéticos incluyen el estradiol, estrógeno, progestina, progesterona y otras hormonas esteroideas; ligandos para el receptor D-1 o D-2 de dopamina, o transportadores de dopamina tales como tropanos; y ligandos para el receptor de serotonina.

El resto de direccionamiento biológico (Z) tiene preferiblemente un peso molecular inferior a 5000, lo más preferiblemente menor que 4000, idealmente menor que 3000. Esto tiene la ventaja de que las características biológicas mejoradas de los complejos de tecnecio de tetraamina de la invención pueden tener un influencia en la biodistribución general, en particular el aclaramiento, del complejo de tecnecio del conjugado de fórmula I. Cuando n es 3, y X comprende un átomo de nitrógeno directamente unido al grupo (CH₂)_n, entonces Z se elige para ser tanto sintético como de un peso molecular de menos de 4000. Los restos de direccionamiento biológico preferidos son péptidos o sustratos enzimáticos de 3 a 20 mer, antagonistas de enzimas o inhibidores enzimáticos.

El contraión (A⁻) representa un anión que está presente en una cantidad equivalente molar, equilibrando así la carga positiva en el complejo de tecnecio dioxo Tc(V) de la Fórmula I. El anión (A) es adecuadamente de carga simple o múltiple, siempre y cuando esté presente como una cantidad de carga balanceada. El anión se deriva adecuadamente de un ácido inorgánico u orgánico. Ejemplos de aniones adecuados incluyen: iones haluro tales como cloruro o bromuro, sulfato, nitrato, citrato, acetato, fosfato y borato. Los aniones preferidos son cloruro.

Los complejos de tecnecio de fórmula I tienen la ventaja de que son estables después de la formación del complejo, y comprenden un quelante ávido que se une al tecnecio con preferencia al resto de direccionamiento biológico. Por consiguiente, es improbable que el complejo de tecnecio experimente reacciones de transquelación con macromoléculas biológicas o ligandos competidores *in vivo*. Los complejos de tecnecio son pequeños y compactos lo que es útil para tener un impacto estérico mínimo sobre el resto de direccionamiento biológico conjugado (Z). El cambio catiónico permanente y el núcleo Tc(V) dioxo significa que los complejos son también hidrófilos y, por tanto, es poco probable que se distribuyan intracelularmente en otros compartimentos, con un aclaramiento consecuentemente más rápido de los órganos y tejidos circundantes *in vivo*, por ejemplo desde el torrente sanguíneo.

Los complejos de tecnecio de fórmula I se pueden preparar por reacción de una fuente adecuada de tecnecio con un conjugado quelante de Fórmula II.



donde: X, Y, Z, n y m son como se han definido anteriormente;

- 5 Q¹ a Q⁶ son independientemente grupos Q, donde Q es H o un grupo protector de amina.

Los conjugados quelantes son útiles en la preparación de los complejos de tecnecio de fórmula I de la primera forma de realización.

- 10 Por el término "grupo protector" se entiende un grupo que inhibe o suprime reacciones químicas indeseables, pero que está diseñado para ser suficientemente reactivo para que pueda escindirse del grupo funcional en cuestión en condiciones suficientemente suaves que no modifiquen el resto de la molécula. Después de la desprotección se obtiene el producto deseado. Los grupos protectores de amina son bien conocidos por los expertos en la técnica y se seleccionan adecuadamente entre: Boc (donde Boc es terc-butiloxycarbonilo), Fmoc (donde Fmoc es fluorenilmetoxycarbonilo), trifluoroacetilo, aliloxycarbonilo, Dde [es decir 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etilo] o Npys (es decir 3-nitro-2-piridin sulfenilo). En algunos casos, la naturaleza del grupo protector puede ser tal que
15 ambos grupos Q¹/Q² o Q⁵/Q⁶, es decir, no hay enlace NH sobre el átomo de nitrógeno de amina asociado. El uso de otros grupos protectores se describe en 'Protective Groups in Organic Synthesis', Theodor W. Greene y Peter GM Wuts, (John Wiley & Sons, 1991). Los grupos protectores de amina preferidos son Boc y Fmoc, más preferiblemente Boc. Cuando se utiliza Boc, Q¹ y Q⁶ son ambos H, y Q², Q³, Q⁴ y Q⁵ son cada uno terc-butoxycarbonilo.

- 20 En la Fórmula II, los grupos protectores de amina se emplean principalmente para proteger los grupos funcionales amina del quelante tetraamina durante la química sintética antes de la complejación con el tecnecio. Sin embargo, cuando el grupo de direccionamiento biológico (Z) es susceptible de reacción con aminas primarias y/o secundarias, estos grupos protectores también pueden ser útiles para prevenir reacciones químicas indeseables entre las aminas quelantes y Z antes de la complejación con tecnecio.

- 25 Conjugados preferidos de Fórmula II tienen al menos uno de los nitrógenos de amina no protegido (es decir, uno de Q³ o Q⁴ es H, o ambos Q¹/Q² o Q⁵/Q⁶ son H). Uno o más grupos amino libres significa que el conjugado es más fácilmente soluble en medio acuoso, que es el disolvente preferido para la preparación del complejo de tecnecio de fórmula I. Un grupo amino libre también significa que la complejación con tecnecio es más rápida, ya que la complejación no depende de la eliminación previa de un grupo protector, lo que también evitaría la formación de
30 complejos metálicos. Cuando el grupo de direccionamiento biológico conjugado (Z) no es susceptible a una reacción adicional con aminas, es conveniente utilizar el conjugado de fórmula II en forma completamente desprotegida (es decir, cada uno de Q¹ a Q⁶ es H), y éste es un conjugado quelante especialmente preferido de Fórmula II. Se prefiere la forma totalmente desprotegida para la reacción de complejación para dar el complejo de tecnecio de fórmula I.

- 35 Los complejos de tecnecio de fórmula I de la presente invención pueden prepararse por reacción de una solución del compuesto radiometálico en el estado de oxidación apropiado con el conjugado quelante de fórmula II en el pH apropiado. La solución puede contener opcionalmente un ligando que se acompleja débilmente al tecnecio (tal como gluconato o citrato), es decir, el complejo de tecnecio se prepara por intercambio de ligandos o transqueación. Tales condiciones son a menudo útiles para suprimir reacciones secundarias indeseables tales como la hidrólisis del ion de tecnecio, pero son menos importantes con los quelantes de la presente invención, ya que se complejan
40 rápidamente con tecnecio. Cuando el radioisótopo es ^{99m}Tc, el material de partida habitual es pertecnetato de sodio a partir de un generador de ⁹⁹Mo. El tecnecio está presente en ^{99m}Tc-pertecnetato en el estado de oxidación Tc(VII), que es relativamente no reactivo. La preparación de complejos de tecnecio de estado de oxidación más bajo Tc(I) a Tc(V) por lo tanto usualmente requiere la adición de un agente reductor farmacéuticamente aceptable tal como ditionito de sodio, bisulfito de sodio, ácido ascórbico, ácido sulfinico de formamidina, ion estannoso, Fe(II) o Cu
45 (I), para facilitar la complejación. El agente reductor farmacéuticamente aceptable es preferiblemente una sal estannosa, más preferiblemente cloruro estannoso, fluoruro estannoso o tartrato estannoso.

Los conjugados quelantes de Fórmula II pueden prepararse por conjugación de la molécula de direccionamiento biológico (Z) con un quelante bifuncional de Fórmula III, como se describe en la quinta forma de realización a continuación.

- 5 En una segunda forma de realización, la presente invención proporciona un producto radiofarmacéutico que comprende el complejo de tecnecio de la primera forma de realización, en donde A es un contraión farmacéuticamente aceptable, junto con un vehículo biocompatible en una forma adecuada para la administración humana.

10 Por la frase "en una forma adecuada para la administración humana" se entiende una composición que es estéril, exenta de pirógenos, carece de compuestos que producen efectos tóxicos o adversos, y se formula a un pH biocompatible (aproximadamente pH 4,0 a 10,5). Dichas composiciones carecen de partículas que puedan correr el riesgo de causar embolia *in vivo*, y se formulan de manera que no se produce precipitación en contacto con fluidos biológicos (por ejemplo, sangre). Dichas composiciones también contienen sólo excipientes biológicamente compatibles, y son preferiblemente isotónicas.

15 El "vehículo biocompatible" es un fluido, especialmente un líquido, en el cual el producto radiofarmacéutico se suspende o preferiblemente se disuelve, de manera que la composición es fisiológicamente tolerable, es decir, puede administrarse al cuerpo de mamíferos sin toxicidad ni molestia indebida. El vehículo biocompatible es adecuadamente un vehículo líquido inyectable tal como agua estéril, libre de pirógenos para inyección; una solución acuosa tal como una solución salina (que puede equilibrarse ventajosamente de manera que el producto final para inyección sea isotónico o no hipotónico); una solución acuosa de una o más sustancias ajustadoras de la tonicidad (por ejemplo, sales de cationes de plasma con contraiones biocompatibles), azúcares (por ejemplo, glucosa o sacarosa), alcoholes de azúcar (por ejemplo, sorbitol o manitol), glicoles (por ejemplo, glicerol) u otros materiales de poliol no iónicos (por ejemplo, polietilenglicoles, propilenglicoles y similares).

25 Por el término "contraión farmacéuticamente aceptable" se entiende un anión (es decir, un ion negativo) que no produce efectos tóxicos o adversos cuando se administra al cuerpo de un mamífero "*in vivo*" y es compatible químicamente y/o toxicológicamente con los otros ingredientes de la composición farmacéutica. La compatibilidad química para los radiofármacos de tecnecio de la presente invención significa que el anión no compite eficazmente con el quelante de tetraamina para el tecnecio. Estos aniones adecuados incluyen, pero no se limitan a: haluros (por ejemplo, cloruro, yoduro y bromuro); alquil C₁₋₂ sulfonatos (por ejemplo, mesilato o etilsulfonato); arilsulfonatos (por ejemplo fenilsulfonato o tosilato); alquil C₁₋₂ fosfonatos; dialquil C₁₋₂ fosfatos (por ejemplo, dimetilfosfato, dietilfosfato, o diglicerolfosfato); arilfosfonatos; arilfosfatos; alquilarilfosfonatos; alquilarilfosfatos; alquil C₁₋₂ carboxilatos (por ejemplo acetatos, propionatos, glutamatos o gliceratos); arilcarboxilatos (por ejemplo, benzoatos), y similares. Los contraiones farmacéuticamente aceptables preferidos son: cloruro, fluoruro, acetato, tartrato, hidróxido y fosfato. Dichos productos radiofarmacéuticos se suministran adecuadamente en un recipiente que está provisto de un sello que es adecuado para perforación única o múltiple con una aguja hipodérmica (por ejemplo, un cierre hermético de sellado de tabique) mientras se mantiene la integridad estéril. Dichos recipientes pueden contener dosis únicas o múltiples de pacientes. Recipientes de dosis múltiples preferidos comprenden un único vial a granel (por ejemplo de 10 a 30 cm³ de volumen) que contiene múltiples dosis del paciente, con lo que se pueden retirar las dosis individuales de un paciente en jeringas de grado clínico a diversos intervalos de tiempo durante la vida útil viable de la preparación para adaptarse a la situación clínica. Las jeringas precargadas están diseñadas para contener una única dosis humana y, por lo tanto, son preferiblemente una jeringa desechable u otra adecuada para uso clínico. La jeringa precargada puede estar opcionalmente provista de un protector de jeringa para proteger al operador de la dosis radiactiva. Se conocen en la técnica protectores de jeringa radiofarmacéuticos adecuados y comprenden preferiblemente plomo o tungsteno.

45 Los productos radiofarmacéuticos preferidos de la presente invención comprenden los radioisótopos de tecnecio ^{99m}Tc o ^{94m}Tc, más preferiblemente ^{99m}Tc. Cuando el isótopo del tecnecio es ^{99m}Tc, un contenido de radiactividad adecuado para un producto radiofarmacéutico de diagnóstico por imagen está en el intervalo de 180 a 1500 MBq de ^{99m}Tc, dependiendo del lugar para obtener las imágenes *in vivo*, la captación y la relación de objetivo a fondo.

Los radiofármacos de tecnecio de la presente invención se pueden preparar por diversos métodos:

- 50 (i) técnicas de fabricación aséptica en las que la formación del complejo de tecnecio descrita anteriormente para la segunda forma de realización se lleva a cabo en un ambiente de sala limpia;
- (ii) esterilización terminal, en la que la formación del complejo de tecnecio se lleva a cabo sin utilizar fabricación aséptica y luego se esteriliza en la última etapa (por ejemplo por irradiación gamma o autoclave);
- (iii) una metodología de kit en la que se hace reaccionar una formulación estéril, liofilizada, no radiactiva, que comprende el conjugado quelante de Fórmula II y un reductor farmacéuticamente aceptable con otros más excipientes opcionales, que se hacen reaccionar con una alícuota de material estéril ^{99m}Tc pertecnetato de un generador ^{99m}Tc.
- 55

Se prefiere el método (iii), y los kits para usar en este método se describen en la cuarta forma de realización (a continuación).

Se puede usar un kit no radiactivo para la preparación de la composición radiofarmacéutica descrita anteriormente, que comprende el conjugado de Fórmula (II), junto con un reductor biocompatible. Tales kits están diseñados para proporcionar productos radiofarmacéuticos estériles adecuados para la administración humana, por ejemplo vía inyección directa en el torrente sanguíneo. Los conjugados de ligandos, y sus aspectos preferidos, se describen en la segunda forma de realización anterior

Para el ^{99m}Tc , el kit está preferiblemente liofilizado y está diseñado para ser reconstituido con ^{99m}Tc pertechnetato estéril (TcO_4^-) estéril a partir de un generador de radioisótopos ^{99m}Tc para dar una solución adecuada para la administración humana sin manipulación adicional. Los kits adecuados comprenden un recipiente (por ejemplo, un vial sellado en septo) que contiene el conjugado quelante en forma de base libre o de sal de ácido, junto con un reductor biocompatible tal como ditionito de sodio, bisulfito de sodio, ácido ascórbico, ácido sulfínico de formamidina, ión estannoso, Fe (II) o Cu (I) . El reductor biocompatible es preferiblemente una sal estannosa tal como cloruro estannoso o tartrato estannoso. Alternativamente, el kit puede contener opcionalmente un complejo metálico no radiactivo que, tras la adición del tecnecio, experimenta transmetalación (es decir, intercambio de metales) dando el producto deseado.

Los kits no radiactivos opcionalmente pueden comprender adicionalmente componentes adicionales tales como un transquelante, un radioprotector, un conservante antimicrobiano, un agente de ajuste del pH o un relleno. El "transquelante" es un compuesto que reacciona rápidamente para formar un complejo débil con tecnecio, después es desplazado por el quelante. Esto minimiza el riesgo de formación de tecnecio hidrolizado reducido (RHT) debido a la reducción rápida del pertechnetato que compite con la complejación del tecnecio. Tales transquelantes adecuados son sales de un ácido orgánico débil, es decir, un ácido orgánico que tiene un pKa en el intervalo de 3 a 7, con un catión biocompatible. Por el término "catión biocompatible" se entiende un contraión cargado positivamente que forma una sal con un grupo aniónico ionizado, cargado negativamente, donde dicho contraión cargado positivamente es también no tóxico y por lo tanto adecuado para administración al cuerpo de un mamífero, especialmente al cuerpo humano. Ejemplos de cationes biocompatibles adecuados incluyen: los metales alcalinos sodio o potasio; los metales alcalinotérreos calcio y magnesio; y el ion amonio. Los cationes biocompatibles preferidos son sodio y potasio, más preferiblemente sodio. Ácidos orgánicos débiles adecuados son el ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido glucoheptónico, ácido benzoico, fenoles o ácidos fosfónicos. Por lo tanto, las sales adecuadas son los acetatos, citratos, tartratos, gluconatos, glucoheptonatos, benzoatos, fenolatos o fosfonatos. Las sales preferidas son los tartratos, gluconatos, glucoheptonatos, benzoatos o fosfonatos, más preferiblemente los fosfonatos, especialmente los difosfonatos. Un tal transquelante preferido es una sal de MDP, es decir, ácido metilenodifosfónico, con un catión biocompatible.

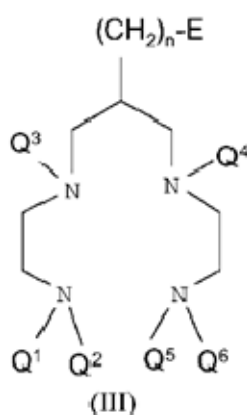
Por el término "radioprotector" se entiende un compuesto que inhibe reacciones de degradación, tales como procesos redox, atrapando radicales libres altamente reactivos, tales como radicales libres que contienen oxígeno que surgen de la radiolisis del agua. Los radioprotectores de la presente invención se eligen adecuadamente de: ácido ascórbico, ácido *para*-aminobenzoico (es decir, ácido 4-aminobenzoico), ácido gentísico (es decir, ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y sales de los mismos con un catión biocompatible como se describió anteriormente.

Por el término "conservante antimicrobiano" se entiende un agente que inhibe el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos tales como bacterias, levaduras o mohos. El conservante antimicrobiano también puede presentar algunas propiedades bactericidas, dependiendo de la dosis. El papel principal del(los) conservante(s) antimicrobiano(s) de presente invención es inhibir el crecimiento de cualquier microorganismo de este tipo en la composición radiofarmacéutica después de la reconstitución, es decir, en el propio producto radioactivo de diagnóstico. Sin embargo, el conservante antimicrobiano también puede utilizarse opcionalmente para inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos en uno o más componentes del kit no radiactivo de la presente invención antes de la reconstitución. Los conservantes antimicrobianos adecuados incluyen: los parabenos, es decir, metil, etil, propil o butil parabeno o mezclas de los mismos; alcohol bencílico; fenol; cresol; cetrimida y tiomersal. Los conservantes antimicrobianos preferidos son los parabenos.

El término "agente de ajuste del pH" significa un compuesto o mezcla de compuestos útiles para asegurar que el pH del kit reconstituido está dentro de límites aceptables (aproximadamente de pH 4,0 a 10,5) para la administración humana o de mamífero. Los agentes de ajuste del pH adecuados incluyen tampones farmacéuticamente aceptables, tales como tricina, fosfato o TRIS [es decir, *tris*(hidroximetil)aminometano], y bases farmacéuticamente aceptables tales como el carbonato de sodio, bicarbonato de sodio o mezclas de los mismos. Cuando el conjugado se emplea en forma de sal ácida, el agente de ajuste del pH puede proporcionarse opcionalmente en un vial o recipiente separado, de manera que el usuario del kit puede ajustar el pH como parte de un procedimiento de múltiples etapas.

Por el término "carga" se entiende un agente de relleno farmacéuticamente aceptable que puede facilitar el manejo del material durante la producción y la liofilización. Estos materiales de relleno adecuados incluyen sales inorgánicas tales como cloruro sódico, y azúcares solubles en agua o alcoholes de azúcar tales como la sacarosa, maltosa, manitol o trehalosa.

En una tercera forma de realización, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula III:



donde: Q^1 a Q^6 y n son como se definieron para las fórmulas I y II anteriores;

E es un grupo funcional adecuado para la conjugación con el resto de direccionamiento biológico (Z) de la primera forma de realización; con las condiciones de que:

- 5 (i) cuando $n=3$, entonces al menos uno de Q^1 a Q^6 es un grupo protector de amina;
- (ii) cuando $n=3$ o 5, E no es OH.

El compuesto de Fórmula III es un "quelante bifuncional", es decir un agente quelante con uno o más grupos funcionales (E) unidos. El grupo funcional E es adecuado para la conjugación con el resto de direccionamiento biológico (Z). Estos grupos funcionales (E) adecuados incluyen: amina, tiocianato, maleimida y ésteres activos. E preferiblemente no comprende un grupo hidroxilo (-OH) no activado. Por el término "éster activo" se quiere decir un derivado éster del ácido carboxílico que está diseñado para ser un mejor grupo saliente, y por lo tanto permitir una reacción más fácil con nucleófilos presentes en el resto de direccionamiento biológico tales como aminas. Los ejemplos de ésteres activos adecuados son: N-hidroxisuccinimida (NHS), pentafluorofenol, pentafluorotiofenol, para-nitrofenol, hidroxibenzotriazol y PyBOP (es decir, benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato). Ésteres activos preferidos son ésteres de N-hidroxisuccinimida o pentafluorofenol

E es preferiblemente una amina primaria (-NH₂), -CO₂M, -NCS, -NCO, maleimida o acrilamida, donde M es H, un catión, un grupo protector o un éster activo. E es más preferiblemente -NH₂, -CO₂M o maleimida, idealmente -NH₂ o -CO₂M.

El compuesto de fórmula III se hace reaccionar con grupos funcionales homólogos adecuado en la molécula de direccionamiento biológico (Z) para formar el conjugado deseado de Fórmula II. Dichos grupos funcionales adecuados en la molécula de direccionamiento biológico incluyen:

carboxilos (para la formación del enlace amida con un quelante bifuncional funcionalizado con amina);

aminas (para la formación del enlace amida con un carboxilo o quelante bifuncional éster funcionalizado de éster activo);

halógenos, mesilatos y tosilatos (para la N-alquilación de un quelante bifuncional funcionalizado de amina) y

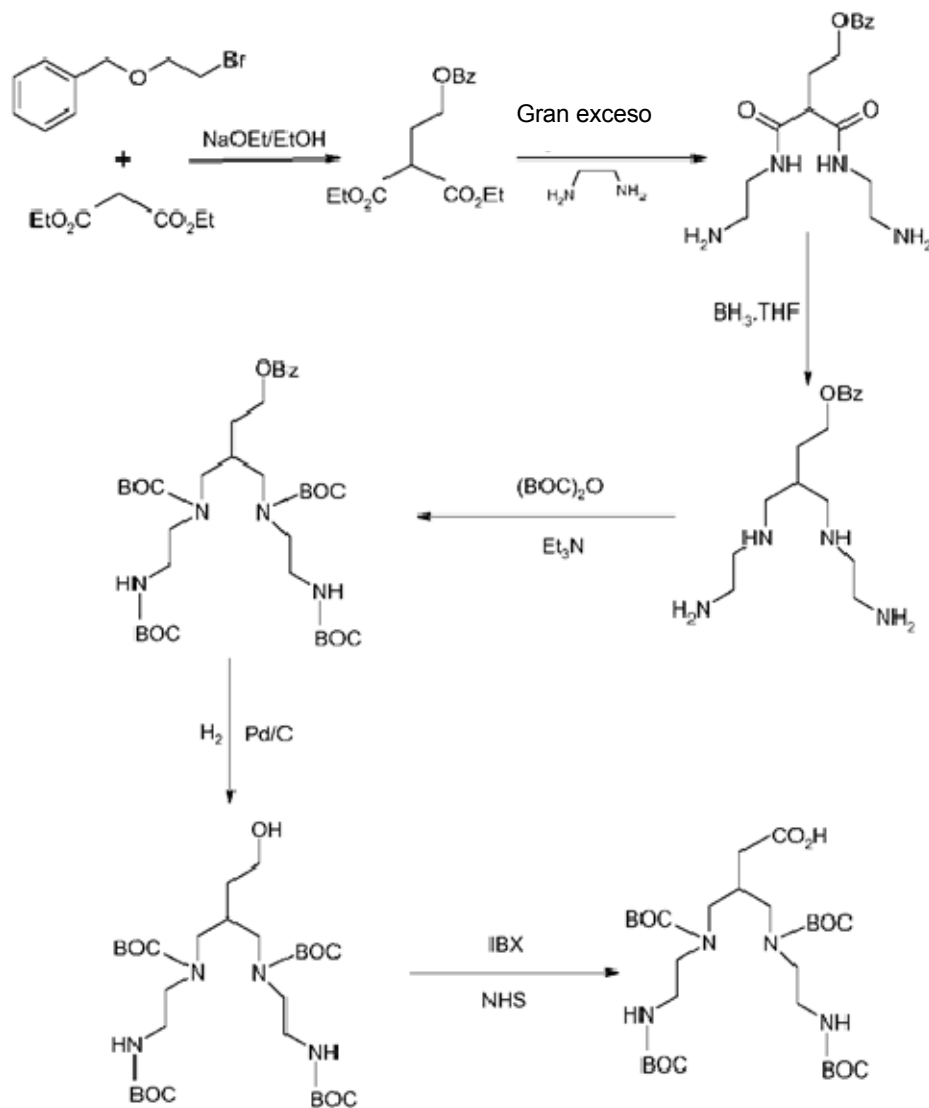
tioles (para la reacción con un quelante bifuncional funcionalizado de maleimida).

Cuando E es un grupo (por ejemplo un éster activo) que está diseñado para reaccionar con un grupo amina de la molécula de direccionamiento biológico (Z), claramente hay un potencial para reacciones secundarias no deseadas con las aminas del quelante. Para tales grupos E, Q^1 a Q^6 en la Fórmula III se eligen preferiblemente para ser grupos protectores de nitrógeno de forma tal que cada uno de los cuatro átomos de nitrógeno del quelante de tetra-amina están protegidos. Cuando E es un grupo amina, es claramente importante que la reacción con la molécula de direccionamiento biológico (Z) ocurra solamente en la amina E, y no con los átomos de nitrógeno de la amina del quelante de tetra-amina. En esa situación también, por lo tanto, Q^1 a Q^6 en la Fórmula III son preferiblemente grupos protectores de nitrógeno. Grupos protectores de nitrógeno, y los ejemplos preferentes de los mismos, se describen en la segunda forma de realización (anteriormente).

Los compuestos de Fórmula III pueden prepararse como se describe en los Esquemas 1 y 2. El esquema 1 proporciona una ruta sintética flexible para quelantes de tetra-amina N-protectidos funcionalizados de carboxi, que pueden ser adaptados a una variedad de valores de n en la Fórmula III. La síntesis del análogo de tetra-amina protegida con Boc con un grupo -(CH₂)₅OH sustituyente de cabeza de puente ha sido descrito por Turpin *et al* [J.Lab.Comp.Radiopharm, **45**, 379-393 (2002.)]. El esquema 2 proporciona una ruta sintética flexible para quelantes de tetra-amina N-protectidos funcionalizados con amina, que se pueden adaptar a una variedad de valores de n . La conjugación de los péptidos de direccionamiento biológico se puede llevar a cabo de una manera análoga a las

descritas por Nock *et al* [Eur.J.Nucl.Med., 30 (2), 247-258 (2003)], y Maina *et al* [Eur. J.Nucl.Med., 30 (9), 1211-1219 (2003)].

Esquema 1: Síntesis del compuesto 1



5

Compuesto 1

Donde:

BOC = grupo protector terc-butoxicarbonilo.

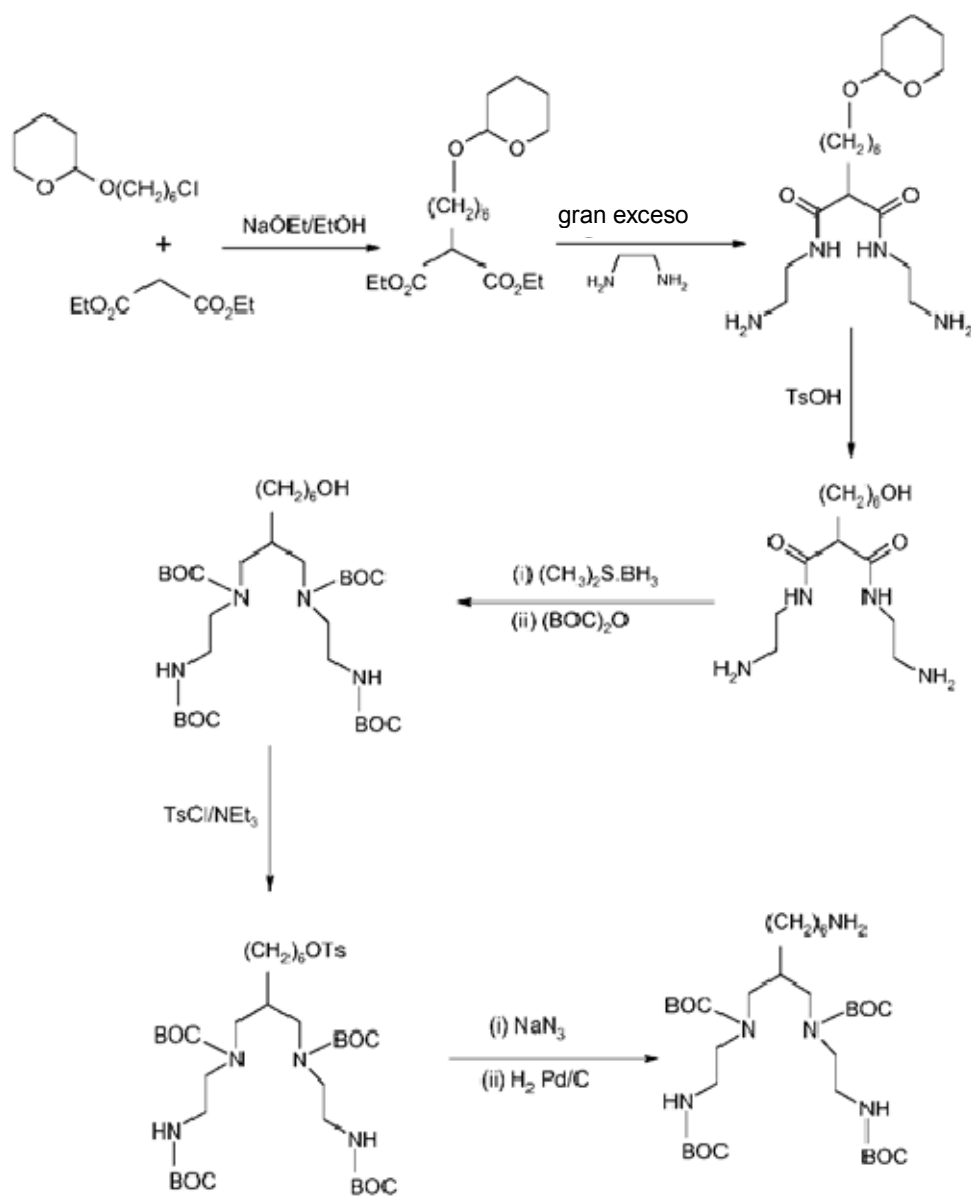
IBX = 1-hidroxi-1,2-benzoyodoxol-3(1H)-ona-1-óxido.

NHS = N-hidroxisuccinimida.

10

Bz = bencilo.

Esquema 2: Síntesis del compuesto 2



Compuesto 2

donde:

5 Ts = p-toluenosulfonilo

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos. El ejemplo 1 proporciona la síntesis del Compuesto 1, un quelante de tetraamina N-protégido funcionalizado con carboxi de la presente invención. El ejemplo 2 proporciona la síntesis del Compuesto 2, un quelante de tetraamina N-protégido funcionalizado con amina de la presente invención. El ejemplo 3 proporciona la síntesis del Compuesto 3, un compuesto que muestra la conjugación del Compuesto 1 con una amina (bencilamina). El ejemplo 4 describe la síntesis del Compuesto 6, que ilustra la conjugación del compuesto 2 con un éster activo de un ácido carboxílico. El ejemplo 5 describe la síntesis del Compuesto 4, un conjugado de un quelante de la invención con un derivado de losartán. El ejemplo 6 proporciona la síntesis de un conjugado quelante de losartán incluyendo un grupo de unión PEG. El ejemplo 7 describe la síntesis del compuesto 8, un conjugado del péptido de angiotensina de un quelante de la invención. El ejemplo 8 describe el radiomarcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de varios quelantes de la invención. El ejemplo 9 muestra la medición de los valores de lipofilia ($\log P$) para diversos complejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de la invención, y muestra que los complejos son relativamente hidrófilos. El ejemplo 10 muestra los resultados de biodistribución para varios complejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de la invención, que muestran un modesto fondo en el hígado, y alto aclaramiento urinario. El ejemplo 11 proporciona una síntesis de mayor rendimiento del Compuesto 1. El ejemplo 12 proporciona la síntesis de un quelante de tetraamina protegido de la presente invención que tiene conjugado a un éster activado (Compuesto 9).

Ejemplo 1 Síntesis del Compuesto 1.

Etapas (a) [2-(benciloxi)etil] malonato de dietilo.

El compuesto se preparó por una modificación del método de Ramalingam *et al Tetrahedron*, 51, 2875-2894 (1995)]. Por lo tanto, se disolvió sodio (1,20 g) en etanol absoluto (25 ml) en atmósfera de argón. Se añadió malonato de dietilo (14,00 g) y la mezcla se sometió a reflujo durante 30 minutos. Se añadió bencil bromoetil éter (10 g) y la mezcla se agitó a reflujo durante 16 horas. El etanol se eliminó por evaporación rotatoria y el residuo se repartió entre éter (100 ml) y agua (50 ml). La capa de éter se lavó con agua (3x50 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. El éter se eliminó por evaporación rotatoria y el residuo se destiló *in vacuo*. Se desechó la fracción que destiló a 40-55° C (malonato de dietilo sin reaccionar). El producto se destiló a 140-150° C (1 mm), [bibliografía punto de ebullición 138-140° C (1 mm)]. El rendimiento fue de 12,60 g de un aceite incoloro.

¹H RMN (270 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 7,28 (m, 5H, C₆H₅), 4,47 (s, 2H, CH₂Ph), 4,16 (m, 4H, COOCH₂), 3,58 (t, 1H, CH), 3,50 (t, 2H, OCH₂-CH₂), 2,21 (t, 2H, O-CH₂-CH₂), 1,20 (t, 6H, COOCH₂-CH₃). ¹³C RMN (67,5 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 169,20 (CO), 138,10, 128,60, 127,80 (aromático), 73,00 (CH₂Ph), 67,30 (O-CH₂-CH₂), 61,70 (COOCH₂), 49,10 (CH), 28,90 (O-CH₂-CH₂), 14,10 (COOCH₂CH₃).

Etapas (b): N,N'-Bis(2-aminoetil)-2-(2-benciloxi-etil)malonamida.

Se añadió [2-(benciloxi)etil]malonato de dietilo (4,00 g) a etilendiamina (30 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante dos días. El exceso de etilendiamina se eliminó por evaporación rotatoria y el residuo se secó a alto vacío durante 2 días para dar un aceite amarillo (4,28 g) que cristalizó en reposo. El producto todavía contenía trazas de etilendiamina, como se detectó en los espectros de RMN.

¹H RMN (270 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 7,74 (ancho t, 2H, CO-NH), 7,32 (m, 5H, C₆H₅), 4,46 (s, 2H, CH₂Ph), 3,50 (t, 2H, OCH₂-CH₂), 3,33 (t, 1H, CH), 3,23 (m, 4H, CO-NH-CH₂), 2,74 (t, 4H, CH₂-NH₂), 2,18 (q, 2H, O-CH₂-CH₂), 1,55 (ancho s, 4H, NH₂). ¹³C RMN (67,5 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 171,10 (CO), 138,20, 128,30, 127,70 (aromático), 73,00 (CH₂Ph), 67,80 (O-CH₂-CH₂), 51,40 (CH), 42,40 (CO-NH-CH₂), 41,20 (CH₂-NH₂), 31,90 (O-CH₂-CH₂).

Etapas (c): N,N'-Bis(2-amino-etil)-2-(2-benciloxietil)-1,3-diaminopropano.

Se disolvió N,N'-bis(2-aminoetil)-2-(2-benciloxi-etil)malonamida (3,80 g) en THF (20 ml) y el matraz se sumergió en un baño de hielo. El matraz se lavó abundantemente con argón y se añadió a través de una jeringa complejo de borano THF (80 ml, 1 M en THF). Se dejó que la mezcla de reacción se calentara hasta la temperatura ambiente y después se agitó a 40° C durante 2 días y se calentó a reflujo durante 1 hora. Se añadió metanol (50 ml) gota a gota y la solución se agitó a 40° C durante la noche. Los disolventes se eliminaron por evaporación rotatoria y el residuo se disolvió en metanol (20 ml). Se añadió hidróxido sódico (10 g en 15 ml de agua) y el metanol se eliminó por ebullición. Se separó un aceite incoloro que se extrajo con CH₂Cl₂ (3x50 ml). La solución se secó sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente dio 3,40 g de aceite incoloro.

¹H RMN (270 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 7,34 (m, 5H, C₆H₅), 4,49 (s, 2H, CH₂Ph), 3,55 (t, 2H, OCH₂-CH₂), 2,76 (t, 4H, N-CH₂), 2,63 (m, 8H, N-CH₂), 1,84 (m, 1H, CH), 1,58 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂-O), 1,41 (ancho s, 6H, NH). ¹³C RMN (67,5 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 138,60, 128,30, 127,60 (aromático), 72,80 (CH₂Ph), 68,70 (O-CH₂-CH₂), 53,50 (N-CH₂), 52,80 (N-CH₂), 41,60 (N-CH₂), 36,40 (CH), 31,30 (CH-CH₂-CH₂-O). MS-EI: 295 [M+H]⁺, (calculado: 295,2).

Etapas (d): N,N'-Bis(2-terc-butoxicarbonilamino-etil)-2-(2-benciloxietil)-1,3-di(terc-butoxicarbonilamino)propano.

Se disolvió N,N'-bis(2-aminoetil)-2-(2-benciloxi-etil)-1,3-diaminopropano (3,30 g) en CH₂Cl₂ (100 ml) y se añadieron trietilamina (5,40 g) y dicarbonato de *terc*-butilo (10,30 g). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla se lavó con agua (100 ml), solución de ácido cítrico (100 ml, 10% en agua) y con agua (2x100 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria dando un aceite de color amarillo que se secó a un peso constante a alto vacío. El producto bruto (7,70 g) se purificó en una columna de gel de sílice (250 g, malla 230-400, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-Et₂O 1: 1) para dar 6,10 g (78,3%) de un aceite claro.

¹H RMN (270 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 7,32 (m, 5H, C₆H₅), 5,12 (ancho d, 2H, NH), 4,47 (s, 2H, CH₂Ph), 3,49 (t, 2H, OCH₂-CH₂), 3,24 (ancho, 12H, N-CH₂), 2,14 (ancho, 1H, CH), 1,59 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂-O), 1,45 (s, 18H, *t*-Bu), 1,42 (s, 18H, *t*-Bu). ¹³C RMN (67,5 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 155,90 (NH-CO), 138,20, 128,30, 127,60, 127,50 (aromático), 79,90, 78,90 (CMe₃), 72,80 (CH₂-Ph), 68,00 (O-CH₂-CH₂), 50,00 (ancho, N-CH₂), 46,90 (ancho, N-CH₂), 39,20 (N-CH₂), 34,40 (ancho, CH), 29,80 (CH-CH₂-CH₂-O), 28,30 (*t*-Bu). MS-EI: 695 [M+H]⁺, (calculado: 695,5)

Etapas (e): N,N'-Bis(2-terc-butoxicarbonilamino-etil)-2-(2-hidroxietil)-1,3-di(terc-butoxicarbonilamino)propano.

Se disolvió N,N'-bis(2-terc-butoxicarbonilamino-etil)-2-(2-benciloxi-etil)-1,3-di(terc-butoxicarbonilamino)propano (3,16 g) en etanol absoluto (100 ml) y se añadió Pd sobre carbono activado (1,00 g, seco, 10%). La mezcla se hidrogenó

en un aparato de hidrogenación Parr a 35 psi durante dos días. El catalizador se eliminó por filtración, y se lavó con etanol (3x20 ml). El etanol se eliminó por evaporación rotatoria para dar un aceite incoloro que se secó hasta una masa constante (2,67 g, 97,1%) a alto vacío.

¹H RMN (270 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 5,25 (ancho d, 2H, NH), 3,69 (t, 2H, OCH₂-CH₂-), 3,28 (ancho, 12H, N-CH₂), 2,71 (ancho, OH), 2,23 (ancho, 1H, CH), 1,56 (hombro, m, 2H, CH-CH₂-CH₂-O), 1,48 (s, 18H, t-Bu), 1,44 (s, 18H, t-Bu). ¹³C RMN (67,5 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 156,10 (NHCO), 80,00, 79,20 (CMe₃), 59,60 (O-CH₂-CH₂), 49,90 (ancho, N-CH₂), 47,00 (ancho, N-CH₂), 39,34 (N-CH₂), 33,80 (CH), 32,30 (CH-CH₂-CH₂-O), 28,30 (t-Bu). MS-EI: 605 [M+H]⁺, (calculado: 605,4).

Etapas (f): N,N'-Bis(2-terc-butoxicarbonilamino-etil)-2-(2-carboximetil)-1,3-di(terc-butoxicarbonilamino)propano (Compuesto 1).

Se utilizó el método de Mazitschek *et al* [Ang. Chem. Int. Ed., 41, 4059-4061 (2002)]. Por lo tanto, se disolvió N,N'-bis(2-terc-butoxicarbonilamino-etil)-2-(2-hidroxietil)-1,3-di(terc-butoxicarbonilamino)propano (2,60 g) en DMSO (15 ml) y se añadió 1-hidroxi-1,2-benciyodóxol-3(1H)-ona-1-óxido (IBX, 3,50 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se añadió N-hidroxisuccinimida (2,50 g). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 días. Se añadió solución de hidróxido de sodio (2 M, 40 ml) y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 4 horas. La solución se sumergió en un baño de hielo y se acidificó con ácido clorhídrico 2 M a pH 2. La capa acuosa se extrajo con éter (4x100 ml) y los extractos de éter combinados se lavaron con agua (3x50 ml). La capa de éter se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria para dar un residuo sólido de color amarillo que contenía el producto y el ácido 2-yodosobenzoico. La mayor parte del ácido yodosobenzoico (2,1 g) se separó por cristalización a partir de cloroformo-hexanos (1:3) (80 ml). La evaporación del licor madre de cloroformo-hexanos dio un aceite amarillo (3 g) que se cargó en una columna de sílice (300 g, CH₂Cl₂-Et₂O, 1:1). El ácido yodosobenzoico restante se eluyó con éter. El producto se eluyó con éter-metanol (9:1). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y la eliminación del disolvente dio 1,5 g de un aceite amarillo pálido. Este se volvió a cromatografiar en una columna de sílice (50 g, Et₂O). El producto se eluyó con éter-ácido acético (95:5). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria para dar un aceite que se secó a alto vacío. El rendimiento fue de 1,10 g (41,3%).

¹H RMN (270 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 7,61 (s ancho, 1H, COOH), 5,19 (d ancho, 2H, NH), 3,22 (ancho, 12H, N-CH₂), 2,47 (ancho m, 1H, CH), 2,26 (ancho, 2H, CH-CH₂-COOH), 1,41 (s, 18H, t-Bu), 1,37 (s, 18H, t-Bu). ¹³C RMN (67,5 MHz, CDCl₃, 25° C, TMS) δ = 175,90 (COOH), 156,10 (NHCO), 80,40, 79,10 (CMe₃), 49,50 (N-CH₂), 46,80 (N-CH₂), 39,00 (N-CH₂), 34,70 (CH-CH₂-COOH), 34,20 (CH-CH₂-COOH), 28,30, 28,20 (t-Bu). MS-EI: 619 [M+H]⁺, (calculado: 619,4).

Ejemplo 2: Síntesis del éster terc-butílico del ácido carbámico de (8-amino-2-[[terc-butoxicarbonil-(2-terc-carbonilamino-etil)-amino]-metil]octil)-(2-terc-butiloxycarbonilamino-etilo) (Compuesto 2).

Etapas (a): 2-(6-Cloro-hexiloxi)tetrahidropirano.

Se disolvieron 6-clorohexanol (6,85 g, 10 mmoles) y ácido p-toluenosulfónico (500 mg), en éter seco (75 ml) y se enfrió a de 0 - 5 en ° C en un baño de hielo. Se añadió dihidropirano (4,3 g, 10 mmoles) en éter seco (25 ml) gota a gota con agitación constante durante un período de 30 minutos. Después de la adición completa, el baño de refrigeración se retiró y la agitación se continuó durante 16 horas. La solución se extrajo con agua (50 ml x 2), se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para dejar un aceite de color amarillo pálido. Este aceite mostró por espectroscopía de RMN de ¹³C ser lo suficientemente puro para usarse sin purificación en las reacciones posteriores. Rendimiento 10,1 g (91%).

¹³C RMN (CDCl₃): δ 19,7 (CH₂), 25,5 (CH₂), 25,6 (CH₂), 26,7 (CH₂), 29,6 (CH₂), 30,8 (CH₂), 32,6 (CH₂), 45,0 (CH₂Cl), 62,3 (OCH₂), 67,4 (OCH₂), 98,8 (OCHO).

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,30-1,71 (14H, m, CH₂ x 7), 3,24 - 3,32 (1H), 3,41 - 3,48 (3H, m CH y CH₂), 3,60 - 3,67 (1H, m, CH), 3,72 - 3,82 (1H, m ancho, CH), 4,44 - 4,49 (1H, m ancho, OCHO).

Etapas (b): Éster dietílico del ácido malónico de 2-[6-(tetrahidro-piran-2-iloxi)hexilo].

Se disolvió sodio (1,13 g, 49 mmoles) en pequeñas cantidades en etanol seco (100 ml) con agitación constante bajo una capa de nitrógeno seco. Se añadió malonato de dietilo (8,0 g, 50 mmoles) en una porción y la solución se calentó a 60° C durante 1 hora. Se añadió 2-(6-cloro-hexiloxi)tetrahidropirano (9,3 g, 42,2 mmoles) en una porción y la temperatura se elevó a de 75-80° C y se mantuvo a este nivel durante 24 horas. Después de enfriar, el sólido inorgánico se separó por filtración y el disolvente se evaporó del filtrado. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (50 ml), se extrajo con agua (30 ml x 2), se secó (MgSO₄), se filtró y se eliminaron los volátiles para dejar un aceite de color amarillo pálido. Este aceite se sometió a cromatografía sobre gel de sílice usando éter de petróleo 40:60 / éter (200:40) como eluyente. El producto requerido se eluyó con un R_f = 0,15 y se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento 8,7 g, (60%).

¹³C RMN (CDCl₃): δ 14,0 (CH₃ x 2), 19,6 (CH₂), 25,5 (CH₂), 27,2 (CH₂), 28,6 (CH₂), 29,0 (CH₂), 29,6 (CH₂), 30,0 (CH₂), 30,8 (CH₂), 52,0 (CH), 61,2 (OCH₂ x 2), 62,2 (OCH₂), 67,4 (OCH₂), 98,8 (OCHO), 169,4 (C=O x 2).

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,10 - 1,25 (14H, m, CH₃ x 2, CH₂ x 4), 1,36 - 1,50 (6H, m ancho, CH₂ x 3), 1,70 - 1,81 (2H, m ancho, CH₂), 3,17 - 3,28 (2H, m, CH₂), 3,56 - 3,66 (1H, m, CH), 3,70 - 3,80 (1H, m, OCH), 4,04 - 4,16 (4H, m, OCH₂ x 2), 4,03 - 4,08 (1H, m, OCHO).

Etapa (c): N,N'-bis-(2-amino-etil)-2-[6-(tetrahidro-piran-2-iloxi)hexil]malonamida.

Se disolvió el éster dietílico del ácido malónico de 2-[6-(tetrahidro-piran-2-iloxi)hexilo] (5,1 g, 14,8 mmoles) en 1,2-diaminoetano (10 g, 167 mmoles) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Los volátiles se eliminaron (40 - 50° C a 0,01 mm de Hg) para dejar un residuo viscoso de color verde pálido que se sometió a cromatografía en columna eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (50:50:5). El compuesto del título se eluyó con un R_f de 0,2 y se recogió como un aceite viscoso verde pálido, que se solidifica en reposo. (Rendimiento 3,9 g, 71%).

¹³C RMN (CDCl₃): δ 19,8 (CH₂), 25,5 (CH₂), 26,0 (CH₂), 27,5 (CH₂), 29,2 (CH₂), 29,7 (CH₂), 30,8 (CH₂), 31,9 (CH₂), 41,0 (NCH₂ x 2), 41,9 (NCH₂ x 2), 54,6 (CH), 62,5 (OCH₂), 67,5 (OCH₂), 98,9 (OCHO), 171,6 (C=O x 2).

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,15 - 1,28 (6H, s ancho, CH₂ x 3), 1,39 - 1,44 (6H, m ancho, CH₂ x 3), 1,69 - 1,74 (4H, m ancho, CH₂ x 2), 2,64 (4H, s ancho, NH₂ x 2), 2,73 (4H, t, J = 6 Hz, CH₂ x 2), 3,8 - 3,29 (6H, m, CH₂ x 3), 3,35 - 3,41 (1H, m, CH), 3,55 - 3,63 (1H, m, CH), 3,70 - 3,78 (1H, m, CH), 4,43 (1H, t ancho, J = 4 Hz, OCHO), 7,78 (2H, t ancho, J = 5 Hz, OCNH x 2)

IR (película fina) cm⁻¹: - 3417, 3082, 2936, 2862, 1663, 1558, 1439, 1354, 1323, 1261, 1200, 1189, 1076, 1026, 956, 907, 867, 810.

Etapa (d): N,N'-Bis(2-aminoetil)-2-(6-hidroxi-hexil)malonamida.

Se calentaron a reflujo N,N'-bis(2-aminoetil)-2-[6-(tetrahidro-piran-2-iloxi)hexil]malonamida (3,9 g, 10,6 mmoles), el monohidrato del ácido *p*-toluenosulfónico (8,5 g, 3 mmoles) y etanol (50 ml) a 70 - 75° C durante 16 horas. Después de enfriar, se añadió hidróxido amónico concentrado (0,880) gota a gota hasta que se alcanzó un pH de 9 permanente. El sólido blanco precipitado se separó por filtración a través de celita y la torta de filtro se lavó con etanol (30 ml). El etanol se eliminó bajo presión reducida (15 mm de Hg, 40° C) para dejar una cera semisólida. Este residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (100:50:10) y se encontró que el compuesto del título tenía un R_f = 0,2. Este producto se recogió y se evaporó conjuntamente con etanol (100 ml x 3) para eliminar cualquier agua residual. Se obtuvo un residuo viscoso de color verde pálido que solidifica en reposo. (Rendimiento 2,1 g, 69%).

¹³C RMN (CD₃OD): δ 25,4 (CH₂), 27,3 (CH₂), 28,9 (CH₂), 30,4 (CH₂), 32,2 (CH₂), 40,6 (NCH₂ x 2), 41,7 (NCH₂ x 2), 54,1 (CH), 61,6 (CH₂OH), 171,7 (C = O x 2).

¹H RMN (CD₃OD): δ 1,28-1,38 (6H, s ancho, CH₂ x 3), 1,46 - 1,55 (2H, m ancho, CH₂), 1,79 - 1,87 (2H, m ancho, CH₂), 2,73 (4H, t, J = 6 Hz, H₂NCH₂ x 2), 3,13 (1H t, J = 7 Hz, CH), 3,27 (4H, dt, J = 6 y 2 Hz, HNCH₂ x 2), 3,53 (2H t, J = 7 Hz OCH₂).

IR (película fina) cm⁻¹: - 3364, 2932, 2862, 2527, 1663, 1558, 1462, 1327, 1223, 1192, 1034.

Espectro de masas (FAB) m/e: - Calculado para C₁₃H₂₉N₄O₃ (M + H) 289 encontrado 289.

Etapa (e): *Terc*-butil éster del ácido carbónico de (2-*terc*-butoxicarbonil-amino-etil)-2-[[*terc*-butoxicarbonil-(2-*terc*-butoxicarbonil-amino-etil)-amino]-metil]-8-hidroxi-octilo).

Se añadió gota a gota a través de una jeringuilla bajo un manto de nitrógeno seco, el aducto de borano-sulfuro de dimetilo puro (15 ml, 150 mmoles) a una mezcla agitada de N,N'-bis-(2-aminoetil)-2-(6-hidroxi-hexil)malonamida (2,1 g, 7,3 mmoles) en dioxano (50 ml). Después de la adición completa, la mezcla se calentó suavemente a reflujo a 110° C durante 5 días. Durante este período permaneció un poco de sólido blanco. Después de enfriar, los volátiles se eliminaron a presión reducida para dejar un sólido de color blanco al que se añadió gota a gota metanol (50 ml) dando una solución incolora. Esta solución se calentó a reflujo durante 3 horas, se enfrió, se añadió HCl concentrado (5 ml) y se continuó calentando a reflujo a de 70 - 75° C durante 48 horas. El disolvente se eliminó para dejar un residuo verde viscoso que se evaporó conjuntamente con metanol (100 ml x 3) para dejar un sólido de color verde pálido. Este sólido se volvió a disolver en metanol seco y se añadió carbonato de potasio anhidro (4,0 g, 30 mmoles) seguido del di-carbonato de *terc*-butilo (7,0 g, 32 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. El sólido inorgánico se separó por filtración a través de celita y el disolvente se evaporó del filtrado para dejar un residuo viscoso. Este residuo se mezcló con agua (50 ml) y se extrajo con CH₂Cl₂ (50 ml x 3). Las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron y el disolvente se evaporó para dejar un residuo de color amarillo pálido.

Nota: En este punto es conveniente controlar la reacción por ¹³C RMN.

El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) como eluyente. El compuesto del título se eluyó con un $R_f = 0,41$ y se aisló como un aceite incoloro viscoso (rendimiento 2,5 g, 52%).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 25,6 (CH_2), 26,4 (CH_2), 28,4 ($\text{CH}_3 \times 12$), 29,8 ($\text{CH}_2 \times 2$), 32,6 (CH_2), 36,5 (muy ancho, CH), 39,2 ($\text{NCH}_2 \times 2$, CH adyacente), 46,9 (s ancho, $\text{HNCH}_2 \times 2$), 50,0 (s ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 62,4 (HOCH_2), 79,0 ($\text{OC} \times 2$), 79,9 ($\text{OC} \times 2$), 156,4 (s ancho $\text{C}=\text{O} \times 4$)

^1H RMN (CDCl_3): δ 1,05 – 1,18 (8H, s ancho, $\text{CH}_2 \times 4$), 1,27 (18H, s, $\text{CH}_3 \times 6$, t-butilo), 1,31 (18H, s, $\text{CH}_3 \times 6$, t-butilo), 1,41 (2H, m, CH_2), 1,81 (s ancho 1H, CH), 2,63 (1H, s ancho, OH), 2,98 (4H, s ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 3,11 (8H, s ancho, $\text{NCH}_2 \times 4$), 3,44 (2H, t, $J = 8$ Hz, CH_2O), 5,2 (2H, s ancho, $\text{NH} \times 2$) IR (película fina) cm^{-1} : - 3350, 2976, 2931, 2859, 1674, 1516, 1455, 1418, 1393, 1260, 1250, 1165, 1069, 965, 871, 775.

10 Espectro de masas (FAB) m/e: - Calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{65}\text{NaO}_9$ (M + H) 661 Encontrado 661.

Etapa (f): Éster octílico del ácido tolueno-4-sulfónico de 8-[*terc*-butoxicarbonil-(2-*terc*-butoxicarbonilamino-etil-amino)-7-[[*terc*-butoxicarbonil-(2-*terc*-butoxicarbonilamino-etil)-amino]metilo].

Se agitaron a temperatura ambiente el éster *terc*-butílico del ácido carbónico de (2-*terc*-butoxicarbonilamino-etil-2-[[*terc*-butoxicarbonil-(2-*terc*-butoxicarbonilaminoetil)amino]metil]-8-hidroxiocetilo) (2,52 g, 3,82 mmoles), cloruro de *p*-toluenosulfonilo (1,0 g, 5,2 mmoles), trietilamina (1,3 g, 12,8 mmoles) y CH_2Cl_2 (30 ml) con la lenta evaporación del disolvente. La reacción se controló por RMN de carbono y después de 3 días quedaba poco material de partida. El volumen de reacción se completó hasta 30 ml con CH_2Cl_2 , se extrajo con agua (50 ml $\times$ 3), se secó (MgSO_4), se filtró y el disolvente se evaporó para dejar un residuo marrón. Este residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:5) como eluyente. El primer compuesto en eluir fue cloruro de tosilo sin reaccionar con un $R_f = 0,95$. El compuesto del título se eluyó con un $R_f = 0,2$ y se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento (1,20 g, 39%).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 21,7 (CH_3 tosilo), 25,3 (CH_2), 26,3 (CH_2), 28,5 ($\text{CH}_3 \times 12$), 28,8 (CH_2), 29,5 (CH_2), 29,9 (CH_2), 36,5 (CH muy ancho), 39,4 ($\text{NCH}_2 \times 2$), 47,0 (ancho $\text{NCH}_2 \times 2$), 50,5 (ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 70,6 (TsOCH_2), 79,1 ($\text{OC} \times 2$), 80,0 ($\text{OC} \times 2$), 127,9 ($\text{CH} \times 2$), 129,9 ($\text{CH} \times 2$), 133,2 (C), 144,7 (CS Ts), 156,1 (ancho, $\text{C} = \text{O} \times 4$).

^1H RMN (CDCl_3): δ 1,16 (8H, s ancho, $\text{CH}_2 \times 4$), 1,35 (18H, s, $\text{CH}_3 \times 6$), 1,39 (18H, s, $\text{CH}_3 \times 6$), 1,88 (1H, s ancho, CH), 2,38 (3H, s, CH_3 tosilo), 3,10 – 3,12 (4H, s ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 3,19 (8H, s ancho, $\text{NCH}_2 \times 4$), 3,93 (2H, t, $J = 7$ Hz, CH_2 OTs), 5,0 (1H, s ancho, NH), 5,08 (1H, s ancho, NH), 7,29 (2H, d, $J = 8$ Hz, CH $\times$ 2, Ar), 7,72 (2H, d, $J = 8$ Hz CH $\times$ 2, Ar)

IR (película fina) cm^{-1} : - 3360, 2974, 2932, 2862, 1693, 1516, 1479, 1418, 1391, 1366, 1250, 1177, 1069, 959, 816, 775.

Espectro de masas (FAB) m/e: -Calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{71}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{S}$ (M + H) 815 encontrado 815

Etapa (g): Éster *terc*-butílico del ácido carbámico de (8-azido-2-[[*terc*-butoxicarbonil-(2-*terc*-carbonilamino-etil)-amino]-metil]octil)-(2-*terc*-butiloxycarbonilamino-etilo).

Se calentaron a reflujo el éster octílico del ácido tolueno-4-sulfónico de 8-[*terc*-butoxicarbonil-(2-*terc*-butoxicarbonilaminoetil-amino)-7-[[*terc*-butoxicarbonil-(2-*terc*-butoxicarbonilaminoetil)amino]metilo] 1,105 g, 1,36 mmoles), azida de sodio (350 mg, 5,4 mmoles) y metanol (10 ml) a de 70 - 75° C durante 16 horas Después de enfriar, se eliminó el metanol a temperatura ambiente bajo presión reducida hasta que quedó aproximadamente de 1 - 2 ml. Este residuo se diluyó con agua (25 ml) y se extrajo con CH_2Cl_2 (25 ml $\times$ 4) Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (MgSO_4), se filtraron y los volátiles se evaporaron a temperatura ambiente (**Nota: las azidas son potencialmente explosivas y este paso debe llevarse a cabo detrás de una protección de seguridad**) para dejar un residuo viscoso de color amarillo pálido que era el compuesto deseado en un estado puro. (Rendimiento 820 mg, 88%).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 26,3 (CH_2), 26,5 (CH_2), 28,3 ($\text{CH}_3 \times 12$), 28,7 (CH_2), 29,6 (CH_2), 29,8 (CH_2), 36,8 (ancho, CH), 39,3 ($\text{NCH}_2 \times 2$), 46,9 (ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 50,0 (ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 51,3 (CH_2N_3), 79,0 ($\text{OC} \times 2$), 79,8 ($\text{OC} \times 2$), 156,0 ($\text{C} = \text{O} \times 4$).

^1H RMN (CDCl_3): δ 1,16 (8H, s ancho, $\text{CH}_2 \times 4$), 1,29 (18H, s, $\text{CH}_3 \times 6$), 1,33 (18H, s, $\text{CH}_3 \times 6$), 1,47 (2H, t ancho, $J = 6,5$ Hz CH_2CH adyacente), 1,86 (1H, s ancho, CH), 2,95 - 3,05 (4H, s ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 3,05 - 3,20 (10H, s ancho, $\text{NCH}_2 \times 4$ y CH_2N_3), 5,09 (2H, s ancho, $\text{NH} \times 2$)

IR (película fina) cm^{-1} : - 3350, 2974, 2932, 2860, 2097 (banda fuerte N_3), 1694, 1520, 1470, 1418, 1391, 1366, 1250, 1167, 1069, 870, 777.

Etapa (h): Éster *terc*-butílico del ácido carbámico de (8-amino-2-[[*terc*-butoxicarbonil-(2-*terc*-carbonilamino-etil)-amino]-metil]octil)-(2-*terc*-butiloxycarbonilamino-etilo) (Compuesto 2).

El éster *terc*-butilíco del ácido carbámico de (8-azido-2-[[*terc*-butoxicarbonil-(2-*terc*-carbonilamino-etilamino)]metil]octil)-(2-*terc*-butiloxycarbonilamino-etilo) (820 mg, 1,20 mmoles), paladio al 10% sobre carbón (100 mg) y metanol (10 ml) se trataron con gas hidrógeno a una presión de 30 atmósferas a temperatura ambiente durante 16 horas. Los sólidos se retiraron por filtración a través de celita y la torta de filtro se lavó con metanol (50 ml). Los volátiles se eliminaron del filtrado para dejar un aceite viscoso que era el material deseado en estado puro. (Rendimiento 700 mg, 89%).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 26,4 (CH_2), 26,6 (CH_2), 28,4 ($\text{CH}_3 \times 12$), 32,9 ($\text{CH}_2 \times 2$), 36,8 (ancho, CH), 39,2 ($\text{NCH}_2 \times 2$), 41,8 (H_2NCH_2), 46,9 (ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 49,8 (ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 78,9 ($\text{OC} \times 2$), 79,7 ($\text{OC} \times 2$), 156,0 ($\text{C} = \text{O} \times 4$).

^1H RMN (CDCl_3): δ 1,08 (8H, s ancho, $\text{CH}_2 \times 4$), 1,23 (18H, s, $\text{CH}_3 \times 6$), 1,27 (20H, s ancho, $\text{CH}_3 \times 6$ y CH_2), 1,77 (1H, s ancho, CH), 2,40 (2H, s ancho, NH_2), 2,50 (2H, t, $J = 7$ Hz, CH_2NH_2), 2,97 (4H, m ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 3,00 - 3,16 (8H, m ancho, $\text{NCH}_2 \times 4$), 5,21 (1H, s ancho, NH), 5,30 (1H, s ancho, NH).

IR (película fina) cm^{-1} : - 3360, 1693, 1520, 1459, 1418, 1392, 1367, 1250, 1170, 1068, 964, 922, 871, 775, 733.

Espectro de masas (FAB) m/e: - Calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_8$ (M+H) 660 encontrado 660.

Ejemplo 3: Síntesis del Compuesto 3.

Etapa (a): Acoplamiento del Compuesto 1 a bencilamina.

Se trató el Compuesto 1 (61,8mg, 0,1 mmoles), en CH_2Cl_2 (5 ml) con bencilamina (10,7 mmoles), cloruro difenilfosfínico (25,9 mg) y diisopropilamida (29 mg 0,22 mmoles) en un matraz de fondo redondo (50 ml) a 20°C durante 18 horas. Después, la reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (20 ml) y se lavó con ácido clorhídrico 1 N (5 ml) y carbonato de potasio acuoso saturado (5 ml). La capa de CH_2Cl_2 se separó, se secó (Na_2SO_4) y se concentró a la consistencia de una goma (~50 mg). El material crudo a continuación se sometió a cromatografía sobre sílice con un gradiente de acetato de etilo en gasolina (100 ml cada una de 50%, 70% y 90%). Se recogió una pequeña cantidad de la impureza que pasó más rápida seguida de cerca por la fracción principal.

^1H y ^{13}C espectros de RMN se realizaron en CDCl_3 . Estos indicaron que la fracción principal era el compuesto puro requerido.

Etapa (b): Desprotección de los grupos protectores Boc.

Se trató el producto de la etapa (a) (27,8 mg, 0,039 mmoles), en CH_2Cl_2 (0,5 ml) con ácido trifluoroacético (0,5 ml) y la reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después se concentró la mezcla de reacción a la consistencia de una goma para eliminar el exceso de ácido y se pesó (53 mg). ^1H y ^{13}C RMN (CDCl_3) indicaron que los grupos Boc se habían eliminado completamente. Una muestra pesada del Compuesto 2 se disolvió en agua para dar una solución 10 milimolar de la sal de TFA, que se usó para los experimentos de radiomarcage.

Ejemplo 4: Síntesis del Compuesto 6.

Etapa (a): Éster *terc*-butilíco del ácido carbámico de (8-benzoilamino-2-[[*terc*-butoxicarbonil-(2-*terc*-carbonilamino-etil)-amino]-metil]octil)-(2-*terc*-butiloxycarbonilamino-etilo).

Se añadió el éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido benzoico (20 mg, 0,091 mmoles), en CH_2Cl_2 en una porción a una solución del Compuesto 2 (50 mg, 0,08 mmoles) en CH_2Cl_2 (1 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (10 ml), se extrajo con agua (15 ml $\times$ 2), se secó (MgSO_4), se filtró y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria. El residuo restante se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando CH_2Cl_2 /metanol 94:6 ($R_f = 0,23$) como eluyente para dar un aceite viscoso incoloro. (Rendimiento 25 mg, 41%).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 26,4 (CH_2), 26,8 (CH_2), 28,5 ($\text{CH}_3 \times 12$), 29,6 ($\text{CH}_2 \times 2$), 29,7 (CH_2), 29,9 (CH_2), 36,6 (ancho, CH), 39,4 ($\text{NCH}_2 \times 2$), 40,0 ($\text{O}=\text{CNCH}_2 \times 2$), 47,0 (ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 49,8 ($\text{NCH}_2 \times 2$), 79,7 ($\text{OC} \times 2$), 80,0 ($\text{OC} \times 2$), 127,0 (Ar CH $\times$ 2), 128,5 (Ar CH $\times$ 2), 131,3 (Ar CH), 134,9 (Ar C), 156,1 ($\text{C} = \text{O} \times 4$), 167,6 (Ar C = O).

^1H RMN (CDCl_3): δ 1,28 (8H, s ancho, $\text{CH}_2 \times 4$), 1,38 (18H, s, $\text{CH}_3 \times 6$), 1,42 (20H, s ancho, $\text{CH}_3 \times 6$ y CH_2), 1,95 (1H, s ancho, CH), 3,1 (4H, s ancho, $\text{NCH}_2 \times 2$), 3,22 (8H, s ancho, $\text{NCH}_2 \times 4$), 3,42 (2H, q ancho, $J = 6$ Hz, $\text{CH}_2\text{N-benzoil}$), 5,08 (2H, s ancho, NH $\times$ 2), 6,18 (1H, s ancho, HN-benzoil), 7,38 - 7,45 (3H, m, Ar CH $\times$ 3), 7,74 (2H, d ancho, $J = 7$ Hz, Ar CH $\times$ 2),

IR (película fina) cm^{-1} : - 3350, 2976, 2932, 2859, 1693 (ancho), 1652, 1520, 1419, 1391, 1367, 1251, 1166, 732

Espectro de masas (FAB) m/e: - Calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{70}\text{N}_5\text{O}_9$ (M+H) 764 encontrado 764.

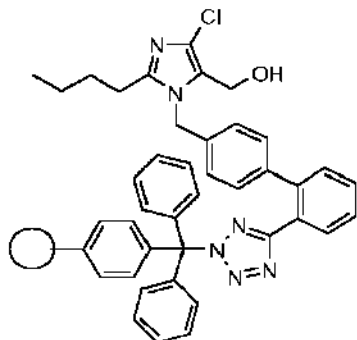
Etapa (b): Desprotección de los grupos protectores Boc.

Se trató la benzamida tetraamina Boc de la etapa (a) (42 mg, 0,056 mmoles), en CH_2Cl_2 (0,5 ml) con ácido trifluoroacético (0,5 ml) y la reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, se concentró la reacción para eliminar el exceso de ácido, hasta la consistencia de una goma. Peso esperado (45 mg), peso encontrado (45,7 mg). ^1H y ^{13}C RMN (CD_3OD) indicaron que los grupos Boc se habían eliminado completamente y que contenía el compuesto requerido. Una muestra pesada del compuesto se disolvió en agua para dar una solución 10 mMolar de la sal de TFA (56 μmoles en 5,6 ml) que se usó para el radiomarcaje.

Ejemplo 5: Síntesis del Compuesto 4.

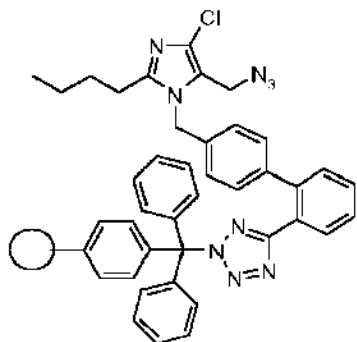
Todas las reacciones se llevaron a cabo en un aparato de burbujeo de nitrógeno manual.

Etapla (a): Unión de losartán al soporte sólido derivatizado de tritilo



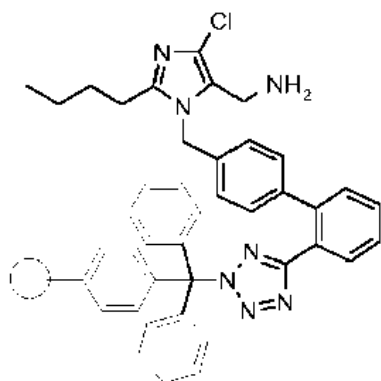
Se añadieron losartán (MSD, 0,236 g, 0,558 mmoles) y trietilamina (Fluka, 0,233 ml, 1,67 mmoles) a una suspensión de resina de cloruro de tritilo (Novabiochem, sustitución 1,24 mmoles/g, 0,300 g) en DMF (5 ml). Después de 4 días se drenó y se lavó la resina. Se escindió una alícuota de la resina (diclorometano/TFA/triisopropilsilano, 92,5:5,0:2,5, 15 minutos). El análisis por HPLC (columna Phenomenex Luna C18 (2) 3 μm 4,6 x 50 mm, disolventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente de 10-40% de B durante 10 minutos; flujo 2,0 ml/min, detección UV a 214 y 254 nm) dio un pico con t_R de 6,7 minutos correspondientes al losartán. La resina se trató con una solución de diclorometano/metanol/diisopropiletilamina (17:2:1, 20 ml, 1 hora), se lavó con diclorometano y se secó.

Etapla (b): Sustitución del grupo hidroxilo por azida



Se añadieron difenilfosforil azida (Aldrich, 0,481 ml, 2,23 mmoles) y DBU (0,611 ml, 4,09 mmoles) a una suspensión de losartán unido a la resina de la etapa (a) (0,372 mmoles) en THF (10 ml). La reacción se dejó durante la noche. Una alícuota de la resina se escindió como se describe para la etapa (a). El análisis por LC-MS (columna Phenomenex Luna C18 (2) 3 μm 50 x 4,60 mm, disolventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente de 20-80% de B durante 10 minutos; flujo 1 ml/min, detección UV a 214 nm, ESI-MS) dio un pico, con t_R de 7,3 minutos, con m/z de 448,1 (MH^+) correspondiente a la estructura.

Etapla (c) Reducción del grupo azida a amina



Se añadió a una suspensión de la resina de la etapa (b) en THF (4 ml), cloruro de estaño (II) (Acros, 0,141 g, 0,744 mmoles), tiofenol (Fluka, 0,304 ml, 2,976 mmoles) y trietilamina (Fluka, 0,311 ml, 2,23 mmoles). Después de 1,5 horas una alícuota de la resina se escindió como se describe bajo a). El análisis de LC-MS (columna Phenomenex Luna C18 (2) 3 μ m 50 x 4,60 mm, disolventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente de 20-80% de B durante 10 minutos; flujo 1 ml/min, detección UV a 214 nm, ESI-MS) dio un pico a 1,9 minutos con m/z de 422,2 (MH^+) como se esperaba para la amina.

Paso (d): Quelante losartan-leu-tetraamina (Compuesto 4).

Se acopló Fmoc-Leu-OH (Novabiochem, 0,030 g, 0,084 mmoles) a una alícuota del amino-losartán unido a la resina de la etapa (c) (0,042 mmoles) en DMF usando reactivos de acoplamiento estándar (HATU y DIEA) y el protocolo de escisión estándar Fmoc (20% de piperidina en DMF). La finalización del acoplamiento se comprobó mediante la prueba estándar de Kaiser. A continuación, se acopló a la resina el Compuesto 1 (0,026 g, 0,042 mmoles) usando los mismos reactivos de acoplamiento (HATU y DIEA) en DMF. Después de cuatro horas el producto se escindió de la resina y los grupos Boc se eliminaron en la misma etapa (solución de diclorometano/TFA/triisopropilsilano, 47,5:50:2,5 durante una hora). La solución se filtró, se concentró y se purificó por HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna C18 (2) 5 μ m 21,2 x 250 mm, disolventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente de 20-40% de B durante 60 minutos; flujo 10,0 ml/min, detección UV a 214 nm) para dar 5 mg de producto después de la liofilización. Análisis por LC-MS (columna Phenomenex Luna C18 (2) 3 μ m 50 x 4,60 mm, disolventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente de 10-80% de B durante 10 minutos; flujo 0,3 ml/min, detección UV a 214 y 254 nm, ESI-MS) t_R 5,1 minutos, m/z 735,4 (MH^+) confirmó la estructura.

Ejemplo 6: Síntesis del Compuesto 5.

El compuesto se sintetizó sobre un soporte sólido como se describe en el Ejemplo 4. Fmoc-Leu-OH (Novabiochem, 0,033 g, 0,092 mmoles) y el ácido diglicólico Fmoc-amino PEG (PolyPure, 0,049 mg, 0,092 mmoles) se acoplaron sucesivamente a una alícuota del amino-losartán unido a la resina del Ejemplo 4 (c) (0,046 mmoles) en DMF utilizando reactivos estándar de acoplamiento (HATU y DIEA) y el protocolo de escisión estándar Fmoc (20% de piperidina en DMF). La finalización del acoplamiento se comprobó mediante la prueba de Kaiser estándar. A continuación se acopló a la resina, el Compuesto 1 (0,029 g, 0,046 mmoles) usando los mismos reactivos de acoplamiento (HATU y DIEA) en DMF. La reacción se dejó durante la noche, después el producto se escindió de la resina y los grupos Boc se eliminaron en la misma etapa (solución de diclorometano/ TFA/ triisopropilsilano, 47,5: 50: 2,5 durante una hora). La solución se filtró, se concentró y se purificó por HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna C18 (2) 5 μ m 21,2 x 250 mm, disolventes: A = agua/HCOOH al 0,1% y B = acetonitrilo/HCOOH al 0,1%; gradiente de 10-40% de B durante 60 minutos; flujo 10,0 ml/min, detección UV a 214 nm) para dar 3,5 mg de producto después de la liofilización. El análisis de LC-MS (columna Phenomenex Luna C18 (2) 3 μ m 50 x 4,60 mm, disolventes: A = agua/HCOOH al 0,1% y B = acetonitrilo/HCOOH al 0,1%; gradiente de 10-40% de B durante 10 minutos; flujo 0,3 ml/min, detección UV a 214 y 254 nm, ESI-MS) t_R 4,7 minutos, m/z 1025,4 (MH^+) confirmó la estructura.

Ejemplo 7: Síntesis del Compuesto 8.

Etapas (a): Síntesis de N-Boc-N-[FmocNH-CH₂CH₂]Gly-OH.

Se trató 1 g de N-[FmocNH-CH₂CH₂]Gly-OtBu.HCl (Fluka 09660) con 20 ml de ácido trifluoroacético al 50% (TFA) en diclorometano que contenía 0,5 ml de triisopropilsilano durante 60 minutos. La mezcla se evaporó y el residuo se volvió a disolver en 20 ml de 50% de tetrahidrofurano en agua. Se añadieron 2,6 g del anhídrido *terc*-butiloxycarbonilo y 1,2 ml de *N*-metilmorfolina y la mezcla se agitó durante cuatro días. Se evaporó luego el tetrahidrofurano y el residuo se disolvió de nuevo en diclorometano. La capa orgánica se lavó con agua y se secó con MgSO₄. El diclorometano se evaporó y el residuo se volvió a disolver en 5 ml de dimetilformamida. La solución de dimetilformamida se diluyó con 400 ml de 60% de acetonitrilo en agua y se bombeó en una columna de RP-HPLC preparativa para la purificación (30-80% de B durante 40 minutos, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, a un caudal de 50 ml/min en una columna Phenomenex Luna de 10 μ C18 (2) de 250 x 50 mm)

proporcionando 450 mg de producto puro. El producto se analizó mediante HPLC analítica (gradiente, 20-70% de B durante 10 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; flujo, 0,3 ml/min; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm; detección, UV 214 nm; tiempo de retención del producto 8,66 minutos). La caracterización adicional del producto se realizó usando espectrometría de masas por electropulverización (MH⁺ calculado, 441,2; MH⁺ hallado, 440,8).

Etapa (b): Síntesis de N-((CH₂)₂-NHCOCH₂-tetraamina)-Gly-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile-OH (Compuesto 8).

Se sintetizó un análogo peptídico de la angiotensina II en un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems 433A partiendo de 0,1 mmoles de resina Fmoc-Ile-Wang. Se aplicó un exceso de 1 mmol de aminoácidos pre-activados [usando O-benzotriazol-1-il-N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU)] en las etapas de acoplamiento hasta la arginina. Se disolvieron 123 mg de N-Boc-N-[FmocNH-CH₂CH₂]Gly-OH, 114 mg de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-ilmetileno]-N-metilmetanaminio hexafluorofosfato N-óxido (HATU) y 60 μ l de N-metilmorfolina en dimetilformamida y se agitó durante 5 minutos, después se añadieron a la resina en un aparato de burbujeo de nitrógeno. Los reactivos se retiraron después de 2 horas y la resina se lavó con dimetilformamida y diclorometano. La resina se trató con piperidina al 20% en dimetilformamida (3 x 10 ml) y se lavó con dimetilformamida. Se disolvieron 23 mg del Compuesto 1, 14 mg de HATU y 7,5 μ l de N-metilmorfolina en dimetilformamida durante 10 minutos y se añadieron a la resina. Los reactivos se retiraron después de 4 horas y la resina se lavó con dimetilformamida y diclorometano. La retirada de los grupos protectores de la cadena lateral y la escisión del péptido de la resina se llevó a cabo simultáneamente en 10 ml de ácido trifluoroacético que contenía 2,5% de triisopropilsilano y un 2,5% de agua durante 90 minutos. Se eliminó el ácido trifluoroacético se añadió éter dietílico al residuo y el producto precipitado se lavó con éter dietílico y se secó al aire.

La purificación por RP-HPLC preparativa (0-30% de B durante 40 minutos, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%, a un caudal de 10 ml/min en una columna de Phenomenex Luna C18 (2) de 10 μ 250 x 21,20 mm) del producto proporcionó 32 mg de conjugado quelato-péptido puro. El producto se analizó mediante HPLC analítica (gradiente, 5-50% de B durante 20 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = CH₃CN/TFA al 0,1%; flujo, 1 ml/min; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm; detección, UV 214 nm; tiempo de retención del producto 5,22 minutos). La caracterización adicional del producto se realizó usando espectrometría de masas por electropulverización (MH⁺ calculado, 1197,8; MH⁺ encontrado, 1197,8).

Ejemplo 8: Radiomarcaje de ^{99m}Tc de los compuestos 3 a 7.

Se preparó un kit liofilizado ("Chelakit A plus") que contenía los siguientes ingredientes:

Componente	Peso Molecular.	
SnCl ₂ .2H ₂ O	225,63	0,016
MDP(H ₄)	176,00	0,025
NaHCO ₃	84,01	4,5
Na ₂ CO ₃	105,99	0,6
NaPABA	159,12	0,200

Se añadieron de 25-50 μ g del compuesto a ser etiquetado (disuelto en de 25-50 μ l de disolvente) a CHELAKIT-A plus, seguido del eluato generador (^{99m}TcO₄⁻ en solución salina, 1,0 ml). La solución se mezcló y se dejó a temperatura ambiente durante de 20-30 minutos.

Los Compuestos 3 y 6 fueron etiquetados con tecnecio a temperatura ambiente a un pH de 9 para dar los correspondientes complejos catiónicos de ^{99m}Tc con alto rendimiento (RCP > 90%). Los complejos de tetraamina se purificaron por HPLC (fase móvil: TFA al 0,1% en agua, 0,1% de TFA en acetonitrilo; columna XTERRA RP₁₈ 3,5 μ m 4,6 x 150 mm) y son estables en tampón de fosfato 50 mM a 37° C durante 2 horas (RCP > 95% por HPLC después de 2 horas).

Ejemplo 9: Medición de la lipofilia (LogP) de los complejos de ^{99m}Tc.

Se determinaron los coeficientes de reparto octanol-agua (LogP) de los complejos de ^{99m}Tc del Ejemplo 8 como sigue:

Se mezclaron 10 μ l del complejo de ^{99m}Tc purificado por HPLC del Ejemplo 8 con 1-octanol (2 ml) y tampón de fosfato 50 mM (pH = 7,4, 2,0 ml) en un tubo de centrifuga. El tubo se agitó con vórtex a temperatura ambiente

durante 1 minuto y luego se centrifugó a alta velocidad durante 60 minutos. Se pipetearon 0,1 ml de muestras de ambas fases en otros tubos de ensayo con una atención adecuada para evitar la contaminación cruzada entre las fases, y se contaron en un contador gamma Wallac Wizzard. La medición se repitió tres veces.

El coeficiente de partición, P, se calculó como sigue:

$$5 \quad P = (\text{cpm en octanol} - \text{cpm del medio}) / (\text{cpm en agua} - \text{cpm del medio})$$

Por lo general, el valor final del coeficiente de partición se expresó como log P.

Los resultados se dan en la Tabla 1:

Tabla 1: Valores de los complejos de compuestos tetra-amina de tecnecio

Complejo de ^{99m}Tc del número de compuesto	Log P (octanol)/tampón de fosfato 50 mM
3	<-2
	+0,6
	-0,1
	-1,8
	<-2

10 **Ejemplo 10: Biodistribución de los Complejos de ^{99m}Tc .**

Se prepararon los complejos de ^{99m}Tc de los compuestos 4, 5 y 7 como se describe en el Ejemplo 8. Los experimentos se realizaron en dos puntos de tiempo predeterminados (2 y 120 minutos) después de la inyección (ip) del producto de ensayo en ratas Wistar macho normales (180 a 220 g). Los animales fueron anestesiados con halotano (6% en oxígeno), inyectados con 0,1 ml (500 MBq/ml) del artículo de ensayo, sacrificados, diseccionados y las muestras se ensayaron en cuanto a la radiactividad. Los resultados se dan en la Tabla 1:

Tabla 1: Biodistribución de los complejos de ^{99m}Tc

%ID/G	Compuesto 4	Compuesto 5	Compuesto 7
Sangre 5 minutos	3,26	1,5	0,84
Sangre 120 minutos	0,91	0,26	0,05
Músculo 120 minutos	0,34	0,9	0,1
Hígado 120 minutos	6,52	3,53	1,55
Pulmón 120 minutos	1,84	0,6	0,4
Corazón 120 minutos	0,44	0,13	0,1
Corazón/sangre	0,49	0,5	2
Corazón/pulmón	0,24	0,21	0,25
Corazón/hígado	0,07	0,04	0,06
Músculo del corazón	1,3	1,44	1
% Retenido durante 2horas			

%ID/G	Compuesto 4	Compuesto 5	Compuesto 7
Aclaramiento (% ID)			
Orina (K,B,U) 120 minutos	21,13	14,45	64,26
HBS 120 minutos	74,65	54,21	19,63
Log P	0,6	-0,1	<-2

Ejemplo 11: Preparación alternativa del Compuesto 1.

Se disolvió N,N'-Bis(2-terc-butoxicarbonilamino-etil)-2-(2-hidroxietil)-1,3-di(terc-butoxicarbonilamino)propano del Ejemplo 1 etapa (e) en tetracloruro de carbono (14 ml) y acetonitrilo (14 ml). Se añadió agua (21 ml) para dar una mezcla bifásica seguido por peryodato de sodio (4,5 g, 21 mmoles) e hidrato de cloruro de rutenio (35 mg, 0,026 mmoles). La solución marrón oscuro resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se diluyó con CH₂Cl₂ (40 ml). La capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con más CH₂Cl₂ (40 ml x 3). Todos los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron y los volátiles se evaporaron bajo presión reducida para dejar la sal de sodio del Compuesto 1 como un residuo viscoso oscuro que se usó sin purificación adicional (4,15 g, 96%).

¹³C RMN (CDCl₃): δ_C 28,2 (x12) (CH₃), 34,1 (CH₂), 34,4 (CH), 38,6 (x2) (NCH₂), 46,8 (x2) (NCH₂), 49,3 (x2) (NCH₂), 79,0 (x2) (OC), 80,2 (x2) (OC), 155,9 (x4) (C=O), 175,4 (COOH).

¹H RMN (CDCl₃): δ_H 1,29 (18H, s, CH₃ x 6), 1,35 (18H, s, CH₃ x 6), 2,19 (1H, ancho, CH), 2,40 (2H, ancho, CH₂), 3,05 - 3,23 (12H, ancho, NCH₂ x 6), 5,10 - 5,24 (2H, ancho, NH x 2)

Espectrometría de masas (ESI) m/e: Calculado para (M+Na) C₂₉H₅₄O₁₀N₄Na 641,3738, encontrado 641,3787

Ejemplo 12: Preparación del Compuesto 9.

Se añadió 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC; 2,16 g, 10,5 mmoles) en una porción a una solución agitada del Compuesto 1 (4,15 g, 6,90 mmoles) y N-hidroxisuccinimida (1,81 g, 15,7 mmoles) en THF seco (30 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y después la DCU (1,3-diciclohexilurea) precipitada se eliminó por filtración. Se evaporaron los volátiles del filtrado dejando un residuo ceroso al cual se añadió éter seco (50 ml) precipitando más DCU que se eliminó por filtración. La solución etérea se lavó con agua (25 ml x 2), se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para dejar un sólido ceroso. Este sólido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de CH₂Cl₂/éter (1: 1) hasta que se eliminó el DCC que no había reaccionado. El eluyente se cambió a éter y se aisló el producto requerido (rf = 0,4, DCM/Et₂O 1: 1) como un sólido incoloro (2,7 g, 57%), pf 66-68° C.

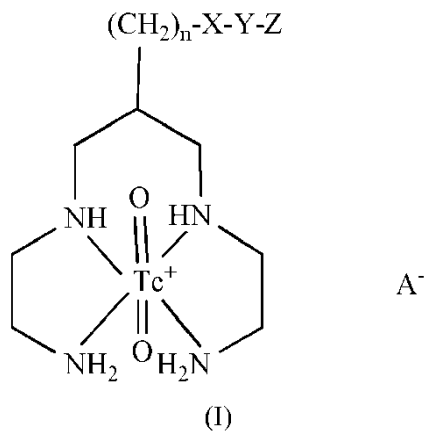
¹³C RMN (CDCl₃): δ_C 25,6 (x2) (CH₂), 28,4 (x12) (CH₃), 31,8 (CH₂), 35,2 (CH), 39,3 (x2) (NCH₂), 47,1 (x2) (NCH₂), 49,1 (x2) (NCH₂), 79,9 (x2) (OC), 80,5 (x2) (OC), 156,1 (x4) (C=O), 167,7 (C=O), 169,1 (x2) (C=O).

¹H RMN (CDCl₃): δ_H 1,35 (18H, s, CH₃ x6), 1,41 (18H, s, CH₃ x6), 2,52 (3H, s ancho, CH y CH₂), 2,77 (4H, s, CH₂ x2), 3,10 - 3,35 (12H, s ancho, NCH₂ x 6), 5,08 (2H, s ancho NH x 2)

Espectrometría de masas (ESI) m/e: Calculado para (M+Na) C₃₃H₅₄N₅O₁₂Na 738,3896, encontrado 738,3893

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de tecnecio de la fórmula (I):



- 5 donde:

X es -NR(C=O)-, -CONR- o un grupo Q;

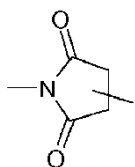
Y es independientemente aminoácido(s) 1-10 D- L-, o un grupo PEG de fórmula $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_w$, donde w es un número entero de valor 3 a 25;

Z es un resto de direccionamiento biológico sintético seleccionado de entre un péptido de 3-30 mer;

- 10 n es un número entero de valor 1 a 8;

R es H, alquilo C_{1-4} , alcoxilalquilo C_{2-4} , hidroxialquilo C_{1-4} , o fluoroalquilo C_{1-4} ;

Q es



A es un contraión;

- 15 con la condición de que la cadena de átomos de $\text{X}^1\text{-Y}_m$ carezca de enlaces en los que un heteroátomo está unido directamente a otro;

2. El complejo de tecnecio de la reivindicación 1, donde el radioisótopo de tecnecio es el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o $^{94\text{m}}\text{Tc}$.
3. El complejo de tecnecio de las reivindicaciones 1 o 2, donde n es de 1 a 6 y X es -CONR- o -NR(C=O)-.
4. El complejo de tecnecio de la reivindicación 3, donde X es -CONH- o -NH(C=O)-.

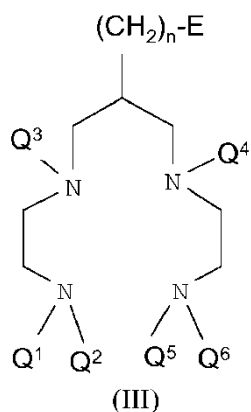
- 20 5. El complejo de tecnecio de la reivindicación 1 a 4, donde w es de 6 a 22.

6. El complejo de tecnecio de la reivindicación 1 a 5, donde los aminoácidos se eligen independientemente de la glicina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico o serina.

- 25 7. Un producto radiofarmacéutico que comprende el complejo de tecnecio de la fórmula I de las reivindicaciones 1 a 6, en el que A es un contraión farmacéuticamente aceptable, junto con un vehículo biocompatible en una forma adecuada para la administración humana.

8. El radiofármaco de la reivindicación 7, donde el radioisótopo de tecnecio es el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o $^{94\text{m}}\text{Tc}$.

9. Un compuesto de Fórmula III:



donde: Q^1 a Q^6 son independientemente grupos Q, donde Q es H o un grupo protector de amina,
y n son como se definen en la reivindicación 1;

5 E es un grupo funcional adecuado para la conjugación con el resto de direccionamiento biológico (Z) de las reivindicaciones 1 a 6, y se elige entre:

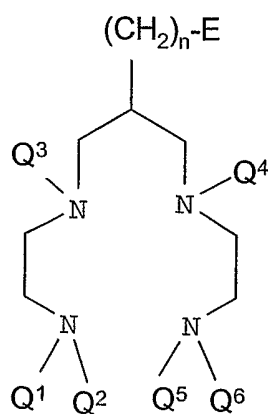
$-NH_2$, $-CO_2M$, $-NCS$, $-NCO$, maleimida o acrilamida,

donde: M es H, un catión, un grupo protector o un éster activo;

con las condiciones de que cuando $n = 3$, entonces al menos uno de Q^1 a Q^6 es un grupo protector de amina.

10 10. El compuesto de la reivindicación 9, donde E es $-NH_2$ o $-CO_2M$.

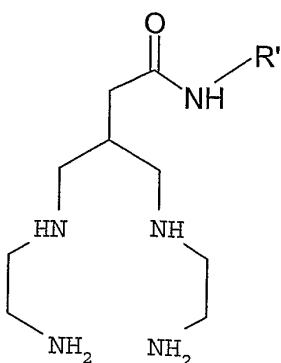
11. El compuesto de las reivindicaciones 9 o 10, donde n es de 1 a 6.

Figura 1.

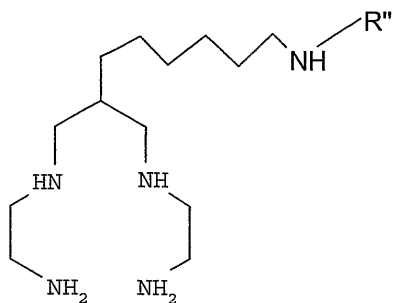
Q^1 a Q^6	n	E	Número de compuesto
$Q^1 = Q^3 = Q^4 = Q^5 = -CO_2C(CH_3)_3$ $Q^2 = Q^6 = H$	1	$-CO_2H$	1
$Q^1 = Q^3 = Q^4 = Q^5 = -CO_2C(CH_3)_3$ $Q^2 = Q^6 = H$	6	$-NH_2$	2
$Q^1 = Q^3 = Q^4 = Q^5 = -CO_2C(CH_3)_3$ $Q^2 = Q^6 = H$	1	$-CO_2(NHS)$	9

Donde NHS = éster activo de N-hidroxisuccinimida

Figura 2.



R'	Compuesto
-CH ₂ C ₆ H ₅	3
	4
	5
	8

Figura 3

R''	Número de compuesto
-COC ₆ H ₅	6
	7