

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 334**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2012 PCT/EP2012/053614**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12119937**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12706606 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2680888**

54 Título: **Péptidos marcados con tecnecio**

30 Prioridad:

04.03.2011 GB 201103696
04.03.2011 US 201161449102 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2018

73 Titular/es:

GE HEALTHCARE LIMITED (100.0%)
Amersham Place
Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, GB

72 Inventor/es:

IVESON, PETER, BRIAN;
INDREVOLL, BÅRD;
NEWTON, BEN;
BHALLA, RAJIV y
JOHANNESSEN, EDVIN, WILHELM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 651 334 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

Péptidos marcados con tecnecio

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a agentes de formación de imágenes con tecnecio que comprenden péptidos de unión a c-Met radiomarcados adecuados para la formación de imágenes de SPECT o PET *in vivo*. Los péptidos de unión a c-Met se marcan a través de conjugados de quelante. También se describen composiciones farmacéuticas, métodos para la preparación de los agentes y las composiciones, y métodos para la formación de imágenes *in vivo* empleando las composiciones, en especial para su uso en el diagnóstico del cáncer.

Antecedentes de la invención

- 10 El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor dispersante ("scatter factor", SF), es un factor de crecimiento que está implicado en diversos procesos fisiológicos, tales como la curación de heridas y la angiogénesis. La interacción de alta afinidad de la interacción de HGF con su receptor (c-Met) está implicada en el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis.

- 15 Knudsen *et al.* han analizado el papel de HGF y c-Met en el cáncer de próstata, con posibles implicaciones para la formación de imágenes y la terapia [Adv. Cancer Res., 91, 31-67 (2004)]. Se describen anticuerpos anti-met marcados para el diagnóstico y la terapia en el documento WO 03/057155.

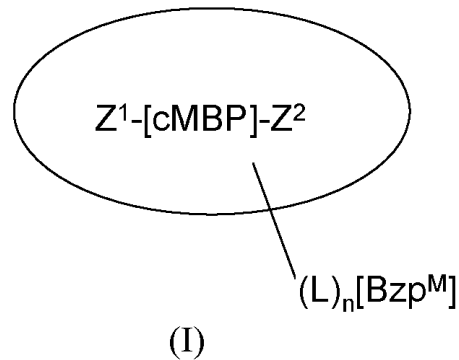
- 20 Se ha demostrado que c-Met está implicado en el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis en muchos cánceres humanos de origen epitelial. El c-Met es expresado por la mayoría de los carcinomas y se ha detectado su expresión elevada con relación al tejido normal en muchos cánceres, que incluyen: de pulmón, mama, colorrectal, pancreático, de cabeza y cuello, gástrico, hepatocelular, ovárico, renal, glioma, melanoma y una serie de sarcomas. En el carcinoma colorrectal (CRC), se ha detectado la sobreexpresión de c-Met en focos cripticos aberrantes displásicos, las lesiones preneoplásicas más tempranas de la enfermedad. En el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, se ha indicado que c-Met es expresado o sobreexpresado en aproximadamente 80% de los tumores primarios. En la metástasis del cáncer de próstata al hueso, se ha indicado que c-Met es sobreexpresado en más del 80% de las metástasis a hueso.

- 30 Bajo condiciones normales, c-Met es expresado sobre células epiteliales y se activa de un modo paracrino por HGF derivado del mesénquima. La activación de c-Met en células normales es un acontecimiento transitorio y fuertemente regulado. Sin embargo, en las células tumorales, c-Met puede estar constitutivamente activo. En el cáncer puede lograrse la estimulación de c-Met aberrante mediante la amplificación/sobreexpresión de c-Met, la activación de mutaciones de c-Met (por ejemplo, alteraciones estructurales) y la adquisición del control del crecimiento autónomo mediante la creación de bucles de señalización autocrina. Además, una infrarregulación defectuosa del receptor c-Met también contribuirá a una expresión de c-Met aberrante en la membrana celular. Aunque la sobreexpresión de c-Met depende de HGF (autocrina/paracrina), las alteraciones estructurales provocadas por las mutaciones son independientes de HGF (por ejemplo, pérdida del dominio extracelular).

- 35 El documento WO 2004/078778 describe polipéptidos o construcciones de péptidos multiméricos que se unen a c-Met o a un complejo que comprende c-Met y HGF. Se han descrito aproximadamente 10 clases estructurales diferentes del péptido. El documento WO 2004/078778 indica que los péptidos pueden marcarse con un marcador detectable para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, o con un fármaco para aplicaciones terapéuticas. El marcador detectable puede ser una enzima, un compuesto fluorescente, un tinte óptico, un ion metálico paramagnético, un agente de contraste con ultrasonidos o un radionúclido. Se indica que los marcadores preferidos del documento WO 40 2004/078778 son radiactivos o paramagnéticos, y lo más preferiblemente comprenden un metal que está quelado por medio de un quelante de metales. El documento WO 2004/078778 indica que los radionúclidos que pueden seleccionarse son: ¹⁸F, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ⁷⁷Br, ⁷⁶Br, ^{99m}Tc, ⁵¹Cr, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁴⁷Sc, ¹⁶⁷Tm, ¹⁴¹Ce, ¹¹¹In, ¹⁶⁸Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁴⁰La, ⁹⁰Y, ⁸⁸Y, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁵Dy, ¹⁶⁶Dy, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁹⁷Ru, ¹⁰³Ru, ¹⁸⁶Re, ²⁰³Pb, ²¹¹Bi, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹⁴Bi, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ^{117m}Sn, ¹⁴⁹Pm, ¹⁶¹Tb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹⁸Au y ¹⁹⁹Au. El documento WO 2004/078778 indica (p. 62) que los radionúclidos preferidos para fines de diagnóstico son ⁶⁴Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ^{99m}Tc y ¹¹¹In, siendo ^{99m}Tc particularmente preferido.

- El documento WO 2004/078778 indica, en los ejemplos 14-17, métodos para aumentar el tiempo de residencia en suero de los péptidos de unión a c-Met: la conjugación con un resto que se une de modo no covalente a albúmina de suero humana; la conjugación a PEG; la fusión a proteínas séricas y la conjugación a maleimida.

- 50 El documento WO 2009/016180 describe agentes de formación de imágenes que comprenden un conjugado de fórmula I:



en la que:

Z¹ está unido al N-terminal de cMBP, y es H o M^{IG};

Z² está unido al C-terminal de cMBP, y es OH, OB^c, o M^{IG},

en la que B^c es un catión biocompatible;

- 5 cMBP es un péptido cíclico de unión a c-Met de 17 a 30 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos (SEQ-1):

Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶;

en la que

X¹ es Asn, His o Tyr;

- 10 X² es Gly, Ser, Thr o Asn;

X³ es Thr o Arg;

X⁴ es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X⁵ es Ser o Thr;

X⁶ es Asp o Glu;

- 15 y Cys^{a-d} son cada uno restos cisteína, de modo que los restos a y b, así como c y d, están ciclados para formar dos enlaces disulfuro distintos;

M^{IG} es un grupo inhibidor del metabolismo;

L es un grupo conector sintético;

Bzp^M es un tinte de benzopirilio.

- 20 El documento WO 2008/139207 describe un péptido cíclico de unión a c-Met similar a los del documento WO 2009/016180, en este caso marcado con una clase concreta de tintes de cianina.

Se indica que los agentes de formación de imágenes ópticas de los documentos WO 2009/016180 y WO 2008/139207 son útiles para la formación de imágenes ópticas para obtener imágenes de sitios de sobreexpresión o localización de c-Met *in vivo*, en particular para la formación de imágenes del cáncer colorrectal.

25 La presente invención

La presente invención se refiere a composiciones de agentes de formación de imágenes que comprenden péptidos de unión a c-Met marcados con tecnecio radiactivo (^{99m}Tc o ^{94m}Tc) adecuados para la formación de imágenes mediante tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía de emisión de un único fotón (SPECT) *in vivo*. Los péptidos de unión a c-Met se marcan a través de un conjugado de quelante del péptido con un ligando de diaminadioxima. Los conjugados se radiomarcán con tecnecio bajo condiciones suaves a temperatura ambiente que producen el complejo de radiometal deseado con alto rendimiento y pureza radioquímica. Los agentes de formación de imágenes de ^{99m}Tc pueden prepararse con facilidad a partir de un kit no radiactivo estéril que se reconstituye con [^{99m}Tc]-pertechnetato a partir de un generador de ^{99m}Tc comercial.

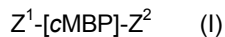
- 30 Los agentes de formación de imágenes muestran una buena captación por tumor específica de diana *in vivo*. Los

agentes de formación de imágenes también parecen ser bien tolerados en modelos preclínicos.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un agente de formación de imágenes que comprende un complejo de ^xTc radiactivo de un conjugado de quelante de un péptido de unión a c-Met, y dicho conjugado de quelante tiene la fórmula I:

5

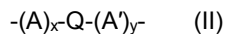


en la que:

^xTc es el radioisótopo ^{94m}Tc o ^{99m}Tc;

cMBP es un péptido cíclico de unión a c-Met de 18 a 30-mero de fórmula II:

10



en la que Q es la secuencia de aminoácidos (SEQ-1):



en la que

X¹ es Asn, His o Tyr;

15

X² es Gly, Ser, Thr o Asn;

X³ es Thr o Arg;

X⁴ es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X⁵ es Ser o Thr;

X⁶ es Asp o Glu;

20

y Cys^{a-d} son cada uno restos cisteína, de modo que los restos a y b, así como c y d, están ciclados para formar dos enlaces disulfuro distintos;

A y A' son independientemente cualquier aminoácido distinto de Cys, o uno de A y A' es Lys(ε-Z³);

x e y son independientemente números enteros con valor de 0 a 13, y se eligen de tal forma que [x+y] = 1 a 13;

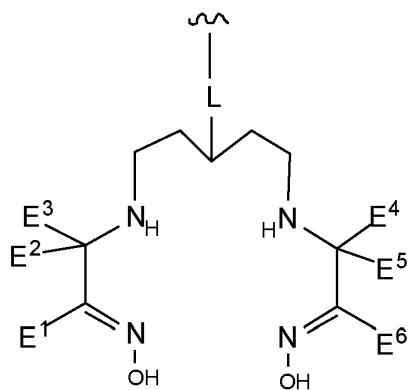
Z¹ está unido al N-terminal de cMBP, y es M^{IG} o Z³;

25

Z² está unido al C-terminal de cMBP, y es M^{IG} o Z³;

en los que cada M^{IG} es independientemente un grupo inhibidor del metabolismo que es un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido cMBP;

Z³ es un quelante de fórmula (III):



(III)

en la que E¹-E⁶ son cada uno independientemente un grupo R';

cada R' es independientemente H o alquilo C₁₋₄, (alquil C₃₋₇)arilo, (alcoxi C₂₋₇)alquilo, hidroxialquilo C₁₋₄, fluoroalquilo C₁₋₄, carboxialquilo C₂₋₇ o aminoalquilo C₁₋₄, o dos o más grupos R' junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo carbocíclico, heterocíclico, saturado o insaturado;

- 5 L es un grupo conector sintético de fórmula -(A)_m, en la que cada A es independientemente -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NRCR₂-, un grupo cicloheteroalquileo C₄₋₈, un grupo cicloalquileo C₄₋₈, un grupo arileno C₅₋₁₂, o un grupo heteroarileno C₃₋₁₂, o un bloque constitutivo de polietilenglicol (PEG) monodisperso;

10 cada R se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, alquenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄, (alcoxi C₁₋₄)alquilo o hidroxialquilo C₁₋₄;

m es un número entero con valor de 1 a 10;

con la condición de que el conjugado de fórmula I comprende un grupo Z³ y dicho grupo Z³ forma un complejo metálico con el ^xTc.

- 15 La expresión "agente de formación de imágenes" significa un compuesto adecuado para la formación de imágenes del cuerpo de mamíferos. Preferiblemente, el mamífero es un cuerpo de mamífero intacto *in vivo*, y más preferiblemente es un sujeto humano. El agente de formación de imágenes se administra generalmente en una cantidad no farmacológica, es decir, a una dosificación diseñada para que tenga un efecto biológico mínimo sobre el sujeto mamífero. Preferiblemente, el agente de formación de imágenes puede administrarse al cuerpo del mamífero de una manera mínimamente invasiva, es decir, sin un riesgo sustancial para la salud del sujeto mamífero cuando se realiza con conocimientos médicos profesionales. Esta administración mínimamente invasiva es preferiblemente una administración intravenosa en una vena periférica de dicho sujeto, sin que sea necesario un anestésico local o general.

20 La expresión "formación de imágenes *in vivo*", tal como se emplea en la presente, se refiere a las técnicas que producen, de modo no invasivo, imágenes de todo o parte de un aspecto interno de un sujeto mamífero.

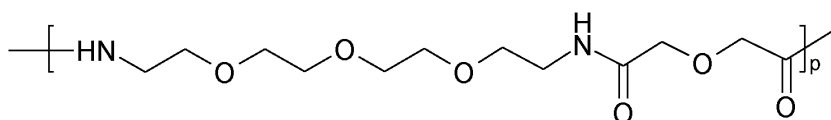
- 25 La expresión "conjugado de quelante" significa que el quelante está unido covalentemente al péptido cMBP.

La expresión "péptido cíclico de unión a c-Met" significa un péptido que se une al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, también conocido como c-Met (o simplemente MET). De modo adecuado, estos péptidos de la presente invención son péptidos cíclicos de 18 a 30 aminoácidos de fórmula I. Estos péptidos tienen una K_d aparente para c-Met menor que aproximadamente 20 nM. La secuencia de cMBP de dichos péptidos comprende restos prolina, y se sabe que dichos restos pueden mostrar una isomerización *cis/trans* del enlace amida del esqueleto. Los péptidos cMBP de la presente invención incluyen cualquiera de dichos isómeros. El cMBP de la presente invención se emplea de modo adecuado como un monómero, es decir, los dímeros y/o heterodímeros de cMBP están fuera del alcance.

30 El grupo Z¹ sustituye al grupo amina del último resto aminoácido de cMBP, es decir, el amino- o N-terminal. El grupo Z² sustituye al grupo carbonilo del último resto aminoácido de cMBP, es decir, el carboxi- o C-terminal.

La expresión "grupo inhibidor del metabolismo" (M^G) significa un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido cMBP en el amino-terminal (Z¹) o en el carboxi-terminal (Z²). Para los agentes de formación de imágenes de la presente invención, el M^G incluye el grupo Z³, es decir, el quelante de fórmula III. En este caso, el complejo de tecnecio está unido covalentemente al N- o C-terminal de cMBP (como Z¹ o Z², respectivamente), y el complejo de tecnecio actúa para bloquear el metabolismo de cMBP. Otros grupos M^G son muy conocidos por los expertos en la técnica y se eligen de modo adecuado, para el amino-terminal del péptido, de:

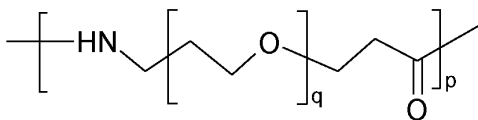
40 grupos N-acilados -NH(C=O)R^G, en los que, en el grupo acilo -(C=O)R^G, R^G se selecciona de: grupos alquilo C₁₋₆ o arilo C₃₋₁₀ o comprende un bloque constituyente de polietilenglicol (PEG). Dichos grupos PEG preferidos son los biomodificadores de fórmula IA o IB:



(IA)

45 Ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de fórmula IA

en la que p es un número entero de 1 a 10. Como alternativa, puede emplearse una estructura similar a PEG basada en un derivado de ácido propiónico de fórmula IB:



(IB)

en la que p es como se definió para la fórmula IA, y

q es un número entero de 3 a 15.

- 5 En la fórmula IB, p es preferiblemente 1 o 2, y q es preferiblemente de 5 a 12.

Estos grupos M^{IG} amino-terminales preferidos son acetilo, benciloxicarbonilo o trifluoroacetilo, lo más preferiblemente acetilo.

- 10 La expresión "aminoácido" significa un L- o D-aminoácido, un análogo de aminoácido (por ejemplo, naftilalanina) o un mimético de aminoácido que puede ser natural o de origen puramente sintético, y puede ser ópticamente puro, es decir, un único enantiómero y, por tanto, quiral, o una mezcla de enantiómeros. En la presente se emplean las abreviaturas de 3 letras o de una sola letra convencionales para aminoácidos. Preferiblemente, los aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros. La expresión "mimético de aminoácido" significa análogos sintéticos de aminoácidos naturales que son isómeros, es decir, que se han diseñado para imitar la estructura estérica y electrónica del compuesto natural. Se saben que estos aminoácidos isómeros se emplean dentro de péptidos 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)].

El término "péptido" significa un compuesto que comprende dos o más aminoácidos, tal como se definió anteriormente, unidos a través de un enlace peptídico (es decir, un enlace amida que enlaza la amina de un aminoácido con el carboxilo de otro).

- 20 Cuando A y A' son "cualquier aminoácido distinto de Cys", esto significa que los aminoácidos adicionales de los grupos A y A' carecen de grupos tiol libres, en particular restos Cys. Esto es debido a que un resto Cys adicional podría formar un puente disulfuro que desordenase los puentes disulfuro Cys^a-Cys^b y Cys^c-Cys^d de la secuencia Q, con la consiguiente pérdida de afinidad de unión por c-Met.

- 25 En la fórmula (I), el grupo Z³ (es decir, el quelante de fórmula III) se une de forma adecuada en una de las siguientes localizaciones (i)-(iii):

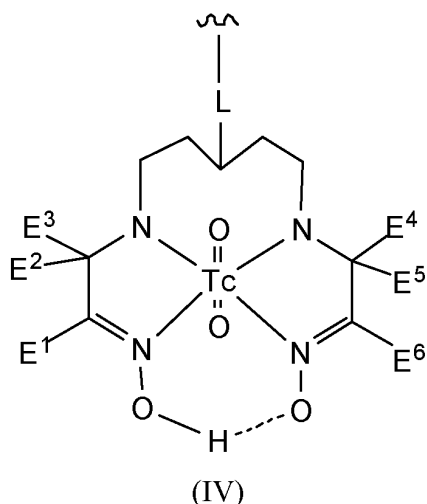
(i) amino-terminal de cMBP, como un grupo Z¹. Esta conjugación emplea un quelante con carboxi funcionalizado de fórmula III;

- 30 (ii) carboxi-terminal de cMBP, como un grupo Z². Esta unión directamente en el C-terminal puede lograrse empleando un quelante con amina funcionalizada de fórmula III. Por tanto, para dicha conjugación, es innecesario un resto Lys adicional para permitir la conjugación del quelante. Además, el complejo de tecnecio unido puede actuar como un grupo M^{IG};

(iii) unión a una cadena lateral de amina (épsilon) de Lys localizada en los grupos A o A'.

- 35 Cuando x es 94m, el radioisótopo del tecnecio es ^{94m}Tc, que resulta particularmente adecuado para la formación de imágenes mediante tomografía de emisión de positrones (PET) *in vivo*. Cuando x es 99m, el radioisótopo del tecnecio es ^{99m}Tc, que resulta particularmente adecuado para la formación de imágenes mediante tomografía de emisión de un único fotón (SPECT) *in vivo*. Preferiblemente, ^xTc es ^{99m}Tc.

- 40 La expresión "complejo de ^xTc radiactivo de un quelante" significa un complejo de radiometal de un agente quelante. La expresión "complejo de radiometal" significa un complejo de metal de coordinación del radiometal con el quelante de fórmula (III), en el que dicho quelante está unido covalentemente al péptido cMBP a través del grupo conector (L) de fórmula I. El término "quelante" o la expresión "agente quelante" tienen su significado convencional y se refieren a 2 o más átomos donantes de metal dispuestos de tal forma que surgen anillo quelados tras la coordinación del metal. El quelante de fórmula (III) presenta un conjunto quelante de diaminodioxima. Así, se cree que el complejo de ^xTc de la presente invención tiene la fórmula (IV):



en la que E¹ a E⁶ y L son como se definió para la fórmula (III).

El término "comprende" tiene su significado convencional a lo largo de esta solicitud e implica que los componentes listados deben estar presentes, pero que otros compuestos o especies no especificadas también pueden estar presentes. El término "comprende" incluye, como un subconjunto preferido, "que consiste fundamentalmente en", que significa que la composición presenta los componentes listados sin que estén presentes otros compuestos o especies.

Características preferidas

Los péptidos cMBP preferidos de la presente invención tienen una K_d para la unión de c-Met al complejo de c-Met/HGF menor que aproximadamente 10 nM (basado en mediciones de ensayos de polarización de fluorescencia), más preferiblemente en el intervalo de 1 a 5 nM, siendo el ideal menos de 3 nM.

Los agentes de formación de imágenes del primer aspecto preferiblemente se proporcionan en una forma adecuada para la administración a mamíferos. La expresión "en una forma adecuada para la administración a mamíferos" significa una composición que es estéril, apirógena, carece de compuestos que producen efectos tóxicos o adversos, y está formulada a un pH biocompatible (aproximadamente pH 6,5 a 8,5) y una osmolalidad fisiológicamente compatible. Estas composiciones carecen de partículas que podrían provocar embolia *in vivo*, y se formulan de modo que no se produzca precipitación tras el contacto con fluidos biológicos (por ejemplo, sangre). Estas composiciones también contienen solo excipientes biológicamente compatibles y son preferiblemente isotónicas. Una de estas formas preferidas es la composición radiofarmacéutica del cuarto aspecto (véase a continuación).

Los agentes de formación de imágenes de la presente invención tienen, de forma adecuada, ambos terminales del péptido cMBP protegidos con grupos M^G, que habitualmente serán diferentes. El hecho de que ambos terminales del péptido estén protegidos de esta manera es importante para aplicaciones de formación de imágenes *in vivo*, puesto que si no fuera así, se esperaría un rápido metabolismo del péptido con la consiguiente pérdida de afinidad de unión por c-Met. Cuando ambos Z¹ y Z² son M^G, preferiblemente Z¹ es acetilo y Z² es una amida primaria. Lo más preferiblemente, Z¹ es acetilo y Z² es una amida primaria, y el resto ^{99m}Tc está unido a la cadena lateral de épsilon-amina de un resto lisina de cMBP.

Q comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de SEQ-2 o SEQ-3:

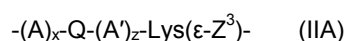
Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶ (SEQ-2);

Ala-Gly-Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-Gly-Thr (SEQ-3).

En SEQ-1, SEQ-2 y SEQ-3, X³ es preferiblemente Arg. El péptido cMBP del primer aspecto preferiblemente tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ-7):

Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys.

El agente de formación de imágenes de fórmula (I) se selecciona preferiblemente de modo que uno de A y A' es Lys(ε-Z³), y cMBP comprende solo uno de estos restos Lys. Más preferiblemente, el único resto Lys(ε-Z³) está en el carboxi-terminal, de modo que el cMBP tiene la fórmula IIA:



en la que:

z es un número entero con un valor de 0 a 12, y $[x+z] = 0$ a 12.

En la fórmula I y la fórmula II, los grupos $-(A)_x-$ o $-(A)_y-$ preferiblemente comprenden un péptido conector que se selecciona de:

-Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4),

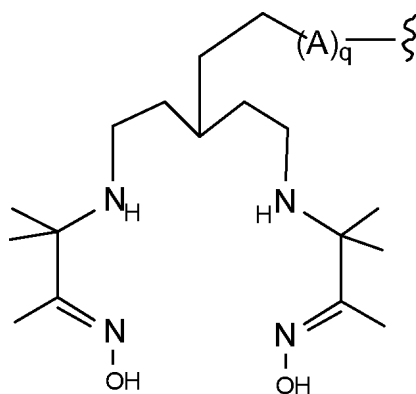
5 -Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5) o

-Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6),

y el grupo Z^3 está unido al grupo épsilon-amino del resto Lys de dicho péptido conector.

10 El quelante de fórmula (III) preferiblemente está unido al C-terminal (grupo Z^2), o en forma de un resto $Lys(\epsilon-Z^3)$. Más preferiblemente está unido en forma de un resto $Lys(\epsilon-Z^3)$ y, lo más preferiblemente, cuando el resto $Lys(\epsilon-Z^3)$ está en el carboxi-terminal, tal como en la anterior fórmula (IIA).

En el agente de formación de imágenes de fórmula (I), el quelante preferiblemente tiene la fórmula IIIA:



(IIIA)

en la que q es un número entero con un valor de 1 a 6, y A es como se definió para la fórmula (III).

En la fórmula (IIIA), $(A)_q$ es preferiblemente $-(NH)(A)_t-$, en la que t es un número entero con valor de 0 a 5.

15 Los agentes de formación de imágenes del primer aspecto pueden prepararse como se describe en el tercer aspecto (a continuación).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de quelante de fórmula I, tal como se definió en el primer aspecto. Los aspectos preferidos del péptido cMBP de fórmula (II) y el quelante de fórmula (III) en el segundo aspecto son como se describió en el primer aspecto (descrito anteriormente).

20 Los conjugados de quelante del segundo aspecto pueden obtenerse mediante la estrategia del quelante bifuncional. La expresión "quelante bifuncional" tiene su significado convencional, y se refiere a un agente quelante que lleva unido covalentemente un grupo funcional colgante. El grupo funcional se emplea como sitio reactivo para unir el quelante al péptido cMBP. La estrategia del quelante bifuncional y la síntesis asociada han sido descritas por Bartholoma *et al.* [Chem. Rev., 110(5), 2903-2920 (2010)]; Chakraborty *et al.* [Curr. Top. Med. Chem., 10(11), 1113-1134 (2010)]; y Brechbiel *et al.* [Quart. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 52(2), 166-173 (2008)]. El grupo funcional de la presente invención es preferiblemente una amina, ácido carboxílico o éster activado, más preferiblemente una amina primaria o un éster activado. Los quelantes bifuncionales que poseen un grupo funcional de amina colgante pueden conjugarse con el grupo carboxilo de un péptido. Los quelantes bifuncionales que tienen un grupo funcional carboxilo o éster activado pueden conjugarse con un grupo amina de un péptido.

30 Las expresiones "éster activado" o "éster activo" significan un derivado de éster del ácido carboxílico asociado que se diseña para ser un mejor grupo saliente y, por tanto, permite una reacción más fácil con nucleófilos, tales como aminas. Los ejemplos de ésteres activos adecuados son: *N*-hidroxisuccinimida (NETS); sulfo-succinimidil éster; pentafluorofenol; pentafluorotiofenol; *para*-nitrofenol; hidroxibenzotriazol y PyBOP (es decir, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio). Los ésteres activos preferidos son ésteres de *N*-hidroxisuccinimida o pentafluorofenol, en especial ésteres de *N*-hidroxisuccinimida.

35 Los péptidos de unión a c-Met de fórmula cMBP de la presente invención pueden obtenerse mediante un método de preparación que comprende:

(i) una síntesis peptídica en fase sólida de un péptido lineal que tiene la misma secuencia peptídica que el péptido cMBP deseado y en la que Cys^a y Cys^b no están protegidos, y los restos Cys^c y Cys^d presentan grupos protectores de tiol;

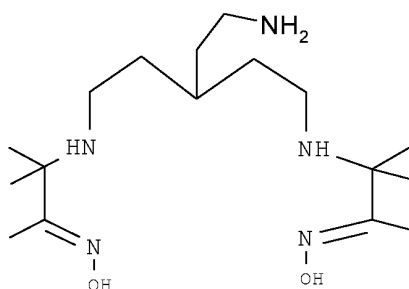
5 (ii) el tratamiento del péptido de la etapa (i) con una base acuosa en disolución para producir un péptido monocíclico con un primer enlace disulfuro que conecta Cys^a y Cys^b;

(iii) la retirada de los grupos protectores de tiol Cys^c y Cys^d y la ciclación para obtener un segundo enlace disulfuro que conecta Cys^c y Cys^d, que es el producto de péptido bicíclico deseado Z¹-[cMBP]-Z².

La expresión "grupo protector" significa un grupo que inhibe o suprime reacciones químicas no deseables, pero que se diseña para que sea suficientemente reactivo como para que pueda escindirse del grupo funcional en cuestión bajo condiciones lo suficientemente suaves como para que no modifiquen el resto de la molécula. Después de la desprotección se obtiene el producto deseado. Los grupos protectores de amina son muy conocidos por los expertos en la técnica y se eligen de forma adecuada de: Boc (siendo Boc *tert*-butiloxicarbonilo), Fmoc (siendo Fmoc fluorenilmetoxicarbonilo), trifluoroacetilo, aliloxicarbonilo, Dde [es decir, 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo] o Npys (es decir, 3-nitro-2-piridinsulfenilo). Los grupos protectores de tiol adecuados son Trt (tritilo), Acn (acetamidometilo), *t*-Bu (*tert*-butilo), *tert*-butiltio, metoxibencilo, metilbencilo o Npys (3-nitro-2-piridinsulfenilo). El uso de otros grupos protectores se describe en *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^a edición, Theodorora W. Greene y Peter G. M. Wuts [Wiley Blackwell, (2006)]. Los grupos protectores de amina preferidos son Boc y Fmoc, lo más preferiblemente Boc. Los grupos protectores de tiol preferidos son Trt y Acn.

Los ejemplos 1 y 2 proporcionan otros detalles específicos. Otros detalles sobre la síntesis de péptidos en fase sólida se describen en P. Lloyd-Williams, F. Albericio y E. Girald, *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, 1997. Los péptidos cMBP se conservan mejor en una atmósfera inerte y mantenidos en la nevera. Cuando se emplean en disolución es mejor evitar un pH mayor que 7, para evitar el riesgo de desordenar los puentes disulfuro.

Un quelante de diaminadioxima bifuncional preferido es el quelante 1, que tiene la fórmula:



25 Quelante 1

en la que el grupo amina primaria de cabeza de puente está conjugado con L (es decir, el grupo conector) y/o el péptido cMBP.

El quelante de diaminadioxima de fórmula III puede prepararse mediante la reacción de la diamina apropiada con:

(i) el derivado cloronitroso apropiado Cl-C(E²E³)-CH(NO)E¹;

30 (ii) una alfa-cloro oxima de fórmula Cl-C(E²E³)-C(=NOH)E¹;

(iii) una alfa-bromocetona de fórmula Br-C(E²E³)-C(=O)E¹, seguido de la conversión del producto de diaminacetona en la diaminadioxima con hidroxilamina.

La vía (i) se describe en S. Jurisson *et al.* [Inorg. Chem., 26, 3576-82 (1987)]. Los compuestos cloronitrosos pueden obtenerse mediante el tratamiento del alqueno apropiado con cloruro de nitrosilo (NOCl), tal como se conoce en la técnica. Se indican otros detalles sintéticos de compuestos cloronitrosos en: Ramalingam [Synth. Commun., 25(5), 743-752 (1995)]; Glaser [J. Org. Chem., 61(3), 1047-48 (1996)]; Clapp [J. Org. Chem., 36(8) 1169-70 (1971)]; Saito [Shizen Kagaku, 47, 41-49 (1995)]; y Schulz [Z. Chem., 21(11), 404-405 (1981)]. La vía (iii) se describe en términos generales en Nowotnik *et al.* [Tetrahedron, 50(29), p. 8617-8632 (1994)]. Las alfa-cloro oximas pueden obtenerse mediante oximación de la correspondiente alfa-cloro cetona o aldehído, que están disponibles en el mercado. Las alfa-bromo cetonas están disponibles en el mercado.

Se proporcionan otros detalles de quelantes específicos funcionalizados con carboxi y funcionalizados con amina de la invención y su conjugación con los péptidos cMBP en los ejemplos de apoyo.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para la preparación del agente de formación de imágenes del primer aspecto, que comprende la reacción del conjugado de quelante de fórmula I del primer aspecto con un suministro de ^{99m}Tc según se define en el primer aspecto, en un disolvente adecuado.

5 Los aspectos preferidos del péptido cMBP y el quelante en el conjugado de quelante y del ^{99m}Tc en el tercer aspecto son como se describió en el primer aspecto (anteriormente).

El disolvente adecuado generalmente tiene una naturaleza acuosa y es preferiblemente un disolvente vehículo biocompatible según se define en el cuarto aspecto (a continuación).

10 El ^{99m}Tc está disponible en el mercado a partir de generadores de radioisótopos, que proporcionan [^{99m}Tc]-pertenetato en forma estéril. Los métodos para preparar complejos de tecnecio son muy conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, I. Zolle (ed.), *Technetium-99m Pharmaceuticals*, Springer, Nueva York (2007)]. El ^{94m}Tc puede prepararse y procesarse mediante el método de Bigott *et al.* [Nucl. Med. Biol., 33(7), 923-933 (2006)].

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una composición radiofarmacéutica que comprende el agente de formación de imágenes del primer aspecto, junto con un vehículo biocompatible, en una forma adecuada para la administración a mamíferos.

15 Los aspectos preferidos del agente de formación de imágenes en el cuarto aspecto son como se definió en el primer aspecto. La expresión “en una forma adecuada para la administración a mamíferos” es como se definió anteriormente.

20 El “vehículo biocompatible” es un fluido, en especial un líquido, en el que el agente de formación de imágenes puede suspenderse o preferiblemente disolverse, de modo que la composición sea fisiológicamente tolerable, es decir, pueda administrarse al cuerpo de mamíferos sin toxicidad ni molestias indebidas. El vehículo biocompatible es, de modo adecuado, un líquido vehículo inyectable, tal como agua estéril apirógena para inyección; una disolución acuosa, tal como disolución salina (que puede equilibrarse de modo ventajoso de forma que el producto final para la inyección sea isotónico); una disolución tampón acuosa que comprende un agente tamponante biocompatible (por ejemplo, tampón fosfato); una disolución acuosa de una o más sustancias para ajustar la tonicidad (por ejemplo, sales de cationes plasmáticos con contraiones biocompatibles), azúcares (por ejemplo, glucosa o sacarosa), alcoholes de azúcares (por ejemplo, sorbitol o manitol), glicoles (por ejemplo, glicerol) u otros materiales de polioles no iónicos (por ejemplo, polietilenglicoles, propilenglicoles y similares). Preferiblemente, el vehículo biocompatible es agua apirógena para inyección, disolución salina isotónica o tampón fosfato.

30 Los agentes de formación de imágenes y el vehículo biocompatible se suministran cada uno en viales o recipientes adecuados que comprenden un recipiente sellado que permite el mantenimiento de la integridad estéril y/o la seguridad radiactiva, y opcionalmente un gas inerte en el espacio superior (por ejemplo, nitrógeno o argón), que permite la adición y la retirada de disoluciones mediante una jeringa o cánula. Uno de estos recipientes preferidos es un vial sellado con un septo, en el que el cierre hermético a gases está tapado con un sello corrugado (generalmente de aluminio). El cierre es adecuado para realizar una o varias punciones con una aguja hipodérmica (por ejemplo, un cierre sellado con un septo corrugado) manteniendo, al mismo tiempo, la integridad estéril. Estos recipientes tienen la ventaja adicional de que el cierre puede aguantar el vacío si se desea (por ejemplo, para cambiar el gas del espacio superior o desgasificar disoluciones) y aguantar cambios de presión, tales como reducciones en la presión, sin permitir el ingreso de gases atmosféricos externos, tales como oxígeno o vapor de agua.

35 Los recipientes de dosis múltiples preferidos comprenden un único vial a granel (por ejemplo, con un volumen de 10 a 30 cm^3) que contiene múltiples dosis para pacientes, en el que las dosis individuales para pacientes pueden así retirarse hacia jeringas de calidad clínica en diversos intervalos de tiempo durante la caducidad viable de la preparación para adecuarse a la situación clínica. Las jeringas prerrellenas se diseñan para que contengan una única dosis para seres humanos, o “dosis unitaria” y, por tanto, son preferiblemente una jeringa desechable u otra jeringa adecuada para un uso clínico. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención preferiblemente tienen una dosificación adecuada para un único paciente y se proporcionan en un recipiente o jeringa adecuada, tal como se describió anteriormente.

La composición farmacéutica puede contener otros excipientes opcionales, tales como un conservante antimicrobiano, un agente de ajuste del pH, una carga, un radioprotector, un solubilizante o un agente para ajustar la osmolalidad.

50 La expresión “conservante antimicrobiano” significa un agente que inhibe el crecimiento de microorganismo potencialmente perjudiciales, tales como bacterias, levaduras o mohos. El conservante antimicrobiano también puede mostrar propiedades bactericidas, dependiendo de la dosificación empleada. El principal papel del conservante o conservantes antimicrobianos de la presente invención es inhibir el crecimiento de cualquiera de estos microorganismos en la composición farmacéutica. Sin embargo, el conservante antimicrobiano también puede emplearse opcionalmente para inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente perjudiciales en uno o más componentes de los kits utilizados para preparar dicha composición antes de la administración. El conservante o conservantes antimicrobianos adecuados incluyen los parabenos, concretamente metil, etil, propil o butil parabeno, o

sus mezclas; alcohol bencílico; fenol; cresol; cetrimida y tiomersal. El conservante o conservantes antimicrobianos preferidos son los parabenos.

La expresión “agente de ajuste del pH” significa un compuesto o una mezcla de compuestos útiles para asegurarse de que el pH de la composición está dentro de límites aceptables (aproximadamente pH 4,0 a 10,5, preferiblemente de 6,5 a 8,5 para los agentes de la presente invención) para la administración a seres humanos o mamíferos. Dichos 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 carbonato de sodio, bicarbonato de sodio o sus mezclas. Cuando la composición se emplea en forma de kit, el agente de ajuste del pH puede proporcionarse opcionalmente en un vial o recipiente distinto, de modo que el usuario del kit pueda ajustar el pH como parte de un procedimiento de múltiples etapas.

El término “carga” significa un agente de carga farmacéuticamente aceptable que puede facilitar la manipulación del material durante la producción y la liofilización. Las cargas adecuadas incluyen sales inorgánicas, tales como cloruro de sodio, y azúcares o alcoholes de azúcares solubles en agua, tales como sacarosa, maltosa, manitol o trehalosa.

El término “radioprotector” significa un compuesto que inhibe las reacciones de degradación, tales como los procesos redox, atrapando los radicales libres muy reactivos, tales como radicales libres que contienen oxígeno que surgen de la radiólisis del agua. Puede emplearse una combinación de dos o más radioprotectores diferentes. Los radioprotectores de la presente invención se eligen de modo adecuado de etanol; ácido ascórbico; ácido *para*-aminobenzoico (es decir, ácido 4-aminobenzoico); ácido gentísico (es decir, ácido 2,5-dihidroxibenzoico), y, cuando sea apropiado, las sales de dichos ácidos con un catión biocompatible. La expresión “catión biocompatible” (B^c) significa un contraión con carga positiva que forma una sal con un grupo de carga negativa ionizado, en el que dicho contraión con carga positiva no es tóxico y, por tanto, es adecuado para la administración al cuerpo de mamíferos, en especial al cuerpo humano. Los 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, lo más preferiblemente sodio. El radioprotector de la presente invención preferiblemente comprende ácido ascórbico o ascorbato de sodio.

El término “solubilizante” significa un aditivo presente en la composición que aumenta la solubilidad del agente de formación de imágenes en el disolvente. Uno de estos disolventes preferidos es un medio acuoso y, por tanto, el solubilizante preferiblemente mejora la solubilidad en agua. Dichos solubilizantes adecuados incluyen alcoholes C₁₋₄; glicerina; polietilenglicol (PEG); propilenglicol; monooleato de polioxietilensorbitano; monooleato de sorbitano; polisorbatos; copolímeros en bloque de poli(oxietileno)poli(oxipropileno)poli(oxietileno) (PluronicTM); ciclodextrinas (por ejemplo, alfa-, beta- o gamma-ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina o hidroxipropil-γ-ciclodextrina) y lecitina. Los solubilizantes preferidos son ciclodextrinas, alcoholes C₁₋₄ y PluronicTM, más preferiblemente ciclodextrinas y alcoholes C₂₋₄. Cuando el solubilizante es un alcohol, es preferiblemente etanol o propanol, más preferiblemente etanol. El etanol tiene un papel dual potencial, puesto que también puede actuar como radioprotector. Cuando el solubilizante es una ciclodextrina, esta es preferiblemente una gamma-ciclodextrina, más preferiblemente hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPCD). La concentración de ciclodextrina puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mg/ml, preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 35 mg/ml, más preferiblemente de 20 a 30 mg/ml, y lo más preferiblemente de aproximadamente 25 mg/ml.

Las composiciones radiofarmacéuticas de la presente invención pueden prepararse mediante diversos métodos:

(i) técnicas de fabricación asépticas, en las que la formación del complejo de radiometal se realiza en un entorno de cámara limpia;

(ii) esterilización terminal, en la que la formación del complejo de radiometal se realiza sin emplear una fabricación aséptica y después se esteriliza en la última etapa [por ejemplo, mediante irradiación con rayos gamma, calor seco de autoclave o tratamiento químico (por ejemplo, con óxido de etileno)];

(iii) una metodología de kit en la que una formulación en kit no radiactiva estéril que comprende el conjugado de quelante de fórmula I y excipientes opcionales se hace reaccionar con un suministro del radiometal de tecnecio deseado.

Se prefiere el método (iii), y los kits para su uso en este método se describen en la quinta realización (a continuación).

Preferiblemente, la composición de agente de formación de imágenes se elige de modo que el péptido cMBP sin marcar esté presente en dicha composición en no más de 50 veces la cantidad molar del péptido cMBP marcado con ^xTc. Así, el exceso químico de conjugado de quelante empleado para el radiomarcaje con ^xTc puede ser tan alto como un exceso en 1000 veces frente a ^xTc, y el conjugado no marcado puede competir por los sitios c-Met *in vivo*. Sin embargo, unas concentraciones bajas del conjugado de quelante pueden afectar al RCP. Así, para ^{99m}Tc, pueden lograrse unos valores de RCP >90% empleando 45 nanomoles del compuesto 1, pero pueden variar entre 70 y 95% cuando se emplean 15-30 nanomoles. Cualquier exceso de péptido no marcado puede retirarse mediante HPLC o SPE.

- La expresión “no marcado” significa que el péptido cíclico de unión a c-Met no es radiactivo, es decir, no está radiomarcado con ^{x}Tc ni con cualquier otro radioisótopo. Estos péptidos no marcados principalmente incluyen los conjugados de quelante no radiactivos del segundo aspecto (descrito anteriormente). La expresión “no marcado” excluye el péptido cíclico de unión a c-Met marcado con ^{99}Tc , en el que dicho ^{99}Tc está presente en el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ empleado para radiomarcarse dicho péptido cíclico de unión a c-Met y, por tanto, es un producto de la misma reacción de radiomarcaje. Preferiblemente, el péptido cíclico de unión a c-Met no marcado está presente en dicha composición en menos de 20, más preferiblemente en menos de 10, lo más preferiblemente en menos de 5 veces la cantidad molar del correspondiente péptido marcado con ^{x}Tc .
- En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un kit para la preparación de la composición radiofarmacéutica del cuarto aspecto, que comprende el conjugado de quelante del segundo aspecto en forma sólida estéril, de modo que, tras la reconstitución con un suministro estéril del radiometal en un vehículo biocompatible, se produce la disolución para obtener la composición radiofarmacéutica deseada.
- Los aspectos preferidos del conjugado de quelante en el quinto aspecto son como se describió en el segundo aspecto de la presente invención (descrito anteriormente).
- El término “kit” significa uno o más recipientes de calidad farmacéutica no radiactivos que comprenden los productos químicos necesarios para preparar la composición radiofarmacéutica deseada, junto con instrucciones de funcionamiento. El kit se diseña para ser reconstituido con el radiometal deseado para obtener una disolución adecuada para la administración a seres humanos con el mínimo de manipulación.
- La forma sólida estéril es preferiblemente un sólido liofilizado.
- Para $^{99\text{m}}\text{Tc}$, el kit está preferiblemente liofilizado y se diseña para ser reconstituido con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetato estéril (TcO_4^-) a partir de un generador de radioisótopos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para obtener una disolución adecuada para la administración a seres humanos sin más manipulación. Los kits adecuados comprenden un recipiente (por ejemplo, un vial sellado con un septo) que contiene el conjugado de quelante en forma de base libre o de sal de ácidos, junto con un reductor biocompatible, tal como ditionito de sodio, bisulfito de sodio, ácido ascórbico, ácido formamidinsulfínico, ion estanoso, Fe(II) o Cu(I) . El reductor biocompatible es preferiblemente una sal estanosa, tal como cloruro estanoso o tartrato estanoso. Como alternativa, el kit puede contener opcionalmente un complejo de metal no radiactivo que, tras la adición del tecnecio, sufre una transmetalación (es decir, intercambio de metales) para producir el producto deseado. Los kits no radiactivos pueden comprender opcionalmente otros componentes adicionales, tales como un transquelante, un radioprotector, un conservante antimicrobiano, un agente de ajuste del pH o una carga, tal como se definió anteriormente.
- En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para formar imágenes del cuerpo humano o animal, que comprende generar una imagen de al menos parte de dicho cuerpo, en el cual se ha distribuido el agente de formación de imágenes del primer aspecto, o la composición radiofarmacéutica del segundo aspecto, empleando PET o SPECT, en el que dicho agente de formación de imágenes o composición ha sido previamente administrado a dicho cuerpo.
- Los aspectos preferidos del agente de formación de imágenes en el sexto aspecto son como se describió en el primer y cuarto aspecto, respectivamente, de la presente invención (descritos anteriormente). Preferiblemente, se emplea la composición radiofarmacéutica del cuarto aspecto.
- Preferiblemente, el mamífero es un cuerpo de mamífero intacto *in vivo*, y más preferiblemente es un sujeto humano. Preferiblemente, el agente de formación de imágenes puede administrarse al cuerpo del mamífero de una manera mínimamente invasiva, es decir, sin un riesgo sustancial para la salud del sujeto mamífero incluso cuando se realiza con conocimientos médicos profesionales. Esta administración mínimamente invasiva es preferiblemente una administración intravenosa en una vena periférica de dicho sujeto, sin que sea necesario un anestésico local o general.
- La formación de imágenes del sexto aspecto es preferiblemente de los sitios de localización o sobreexpresión de c-Met. El sitio de localización o sobreexpresión de c-Met es preferiblemente un cáncer o una lesión precancerosa.
- El método de formación de imágenes del sexto aspecto puede realizarse opcionalmente repetidas veces para controlar el efecto del tratamiento de un cuerpo humano o animal con un fármaco o con radiación, y dicha formación de imágenes se realiza antes y después de dicho tratamiento y, opcionalmente, también durante dicho tratamiento. De particular interés es el control temprano de la eficacia de la terapia del cáncer para asegurarse de que el crecimiento maligno está controlado antes de que el trastorno sea terminal.
- En este aspecto se incluye un método de diagnóstico de sitios de localización o sobreexpresión de c-Met del cuerpo de mamíferos *in vivo*, que comprende el método de formación de imágenes del sexto aspecto.
- En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona el uso del agente de formación de imágenes del primer aspecto, la composición radiofarmacéutica del cuarto aspecto, o el kit del quinto aspecto, en un método de diagnóstico del cuerpo humano o animal.

Los aspectos preferidos del agente de formación de imágenes o la composición en el séptimo aspecto son como se describió en el primer y cuarto aspecto, respectivamente, de la presente invención (descritos anteriormente). El método de diagnóstico del séptimo aspecto preferiblemente comprende el método de formación de imágenes del sexto aspecto y sus aspectos preferidos.

- 5 La invención se ilustra mediante los ejemplos no limitantes detallados a continuación. El ejemplo 1 proporciona la síntesis de un péptido cMBP de la invención que presenta grupos inhibidores del metabolismo ($Z^1 = Z^2 = M^{1G}$) en ambos terminales (péptido 1). Los ejemplos 2 a 4 proporcionan la síntesis de un quelante con amina funcionalizada bifuncional de la invención (quelante 1). El ejemplo 5 proporciona la síntesis de un quelante con éster funcionalizado activo bifuncional de la invención (quelante 1A). El ejemplo 6 proporciona la síntesis de un conjugado de quelante de un péptido de la invención (péptido 1) con el quelante 1 ("compuesto 1"). El ejemplo 7 proporciona la preparación de un complejo de ^{99m}Tc de la invención (^{99m}Tc -compuesto 1), y demuestra que la complejación se desarrolla con eficacia a alto rendimiento radioquímico a temperatura ambiente. El ejemplo 8 proporciona la biodistribución de ^{99m}Tc -compuesto 1, y demuestra que el complejo de tecnecio muestra una captación tumoral útil con buenas proporciones de tumor:fondo.

15 Abreviaturas

Se emplean las abreviaturas de 3 letras o de una sola letra convencionales para aminoácidos.

% di: porcentaje de dosis inyectada

Ac: acetilo

Acm: acetamidometilo

- 20 ACN: acetonitrilo

Boc: *tert*-butiloxicarbonilo

tBu: butilo terciario

DCM: diclorometano

DMF: dimetilformamida

- 25 DMSO: dimetilsulfóxido

EDC: *N*-3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo

HATU: hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio

HBTU: hexafluorofosfato de *O*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio

- 30 HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HSPyU: hexafluorofosfato de *O*-(*N*-succinimidil)-*N,N,N',N'*-tetrametilenuronio

NETS: *N*-hidroxisuccinimida

NMM: *N*-metilmorfolina

NMP: 1-metil-2-pirrolidinona

- 35 Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo

PBS: disolución salina tamponada con fosfato

PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio

s.c.: por vía subcutánea

tBu: *tert*-butilo

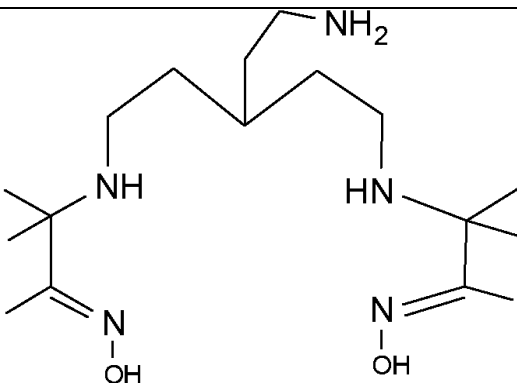
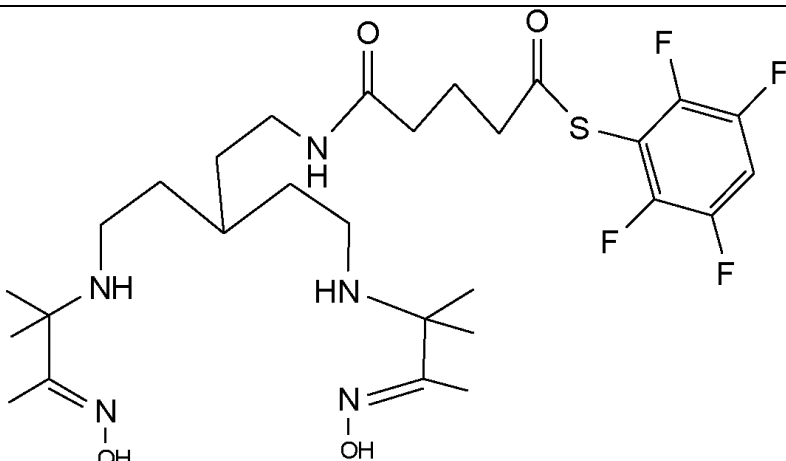
- 40 TFA: ácido trifluoroacético

THF: tetrahidrofurano

TIS: triisopropilsilano

Trt: tritilo

Compuestos de la invención

Nombre	Estructura
Péptido 1	Puentes disulfuro en Cys4-16 y Cys6-14; Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH ₂ o Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK-NH ₂
Quelante 1	
Quelante 1A	
Compuesto 1	[Péptido 1]-NH(CO)-(CH ₂) ₃ -(CO)-[quelante 1]

en los que el compuesto 1 está funcionalizado en el grupo épsilon-amina de la Lys carboxi-terminal del péptido 1.

Ejemplo 1: Síntesis del péptido 15 Etapa (a): Síntesis del péptido lineal precursor protegido

El péptido lineal precursor tiene la estructura:

Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂

- 10 La resina de peptidilo H-Ala-Gly-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Cys(Acm)-Ser(tBu)-Gly-Pro-Pro-Arg(Pbf)-Phe-Glu(OtBu)-Cys(Acm)-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Gly-Gly-Gly-Lys(Boc)-polímero se ensambló en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433A empleando la química de Fmoc comenzando con resina Rink Amide Novagel 0,1 mmol. Se aplicó un exceso de 1 mmol de aminoácidos preactivados (empleando HBTU) en las etapas de acoplamiento. Se incorporó Glu-Thr pseudoprolina (Novabiochem 15 05-20-1122) en la secuencia. La resina se trasladó a un aparato burbujeador de nitrógeno y se trató con una disolución de anhídrido acético (1 mmol) y NMM (1 mmol) disuelto en DCM (5 ml) durante 60 min. La disolución del anhídrido se retiró mediante filtración y la resina se lavó con DCM y se secó bajo una corriente de nitrógeno.

La eliminación simultánea de los grupos protectores de cadena lateral y la escisión del péptido de la resina se realizaron en TFA (10 ml) que contenía TIS al 2,5%, 4-tiocresol al 2,5% y agua al 2,5% durante 2 horas y 30 min. La

resina se retiró mediante filtración, el TFA se retiró al vacío y se añadió éter dietílico al residuo. El precipitado formado se lavó con éter dietílico y se secó al aire para producir 264 mg del péptido bruto.

5 Una purificación mediante una HPLC preparativa (gradiente: 20-30% de B a lo largo de 40 min, siendo A = H₂O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 \times 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 30 min) del péptido bruto produjo 100 mg del precursor lineal de péptido 1 puro. El producto puro se analizó mediante una HPLC analítica (gradiente: 10-40% de B lo largo de 10 min, siendo A = H₂O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 \times 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 6,54 min). Se realizó otra caracterización del producto empleando una espectroscopía de masas de electronebulización (MH₂²⁺ calculado: 1464,6, MH₂²⁺ encontrado: 1465,1).

10 Etapa (b): Formación del puente disulfuro Cys4-16 monocíclico

Cys4-16; Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Lys-NH₂

15 El precursor lineal de la etapa (a) (100 mg) se disolvió en DMSO al 5%/agua (200 ml) y la disolución se ajustó a pH 6 empleando amoniaco. La mezcla de reacción se agitó durante 5 días. La disolución después se ajustó a pH 2 empleando TFA y la mayor parte del disolvente se retiró mediante evaporación al vacío. El residuo (40 ml) se inyectó en porciones en una columna de HPLC preparativa para la purificación del producto.

20 Una purificación mediante una HPLC preparativa (gradiente: 0% de B durante 10 min, después 0-40% de B a lo largo de 40 min, siendo A = H₂O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 \times 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 44 min) del residuo produjo 72 mg del precursor monocíclico del péptido 1 puro. El producto puro (como una mezcla de isómeros P1 a P3) se analizó mediante una HPLC analítica (gradiente: 10-40% de B lo largo de 10 min, siendo A = H₂O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 \times 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 5,37 min (P1); 5,61 min (P2); 6,05 min (P3)). Se realizó otra caracterización del producto empleando una espectroscopía de masas de electronebulización (MH₂²⁺ calculado: 1463,6, MH₂²⁺ encontrado: 1464,1 (P1); 1464,4 (P2); 1464,3 (P3)).

25 Etapa (c): Formación del segundo puente disulfuro Cys6-14 (péptido 1)

30 El precursor monocíclico de la etapa (b) (72 mg) se disolvió en AcOH al 75%/agua (72 ml) bajo una manta de nitrógeno. Se añadieron HCl 1 M (7,2 ml) y I₂ 0,05 M en AcOH (4,8 ml) en ese orden y la mezcla se agitó durante 45 min. Se añadió ácido ascórbico 1 M (1 ml) para obtener una mezcla incolora. La mayoría de los disolventes se evaporaron al vacío y el residuo (18 ml) se diluyó con agua/TFA al 0,1% (4 ml) y el producto se purificó empleando una HPLC preparativa. Una purificación mediante una HPLC preparativa (gradiente: 0% de B durante 10 min, después 20-30% de B a lo largo de 40 min, siendo A = H₂O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 \times 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 43-53 min) del residuo produjo 52 mg del péptido 1 puro. El producto puro se analizó mediante una HPLC analítica (gradiente: 10-40% de B lo largo de 10 min, siendo A = H₂O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 \times 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 6,54 min). Se realizó otra caracterización del producto empleando una espectroscopía de masas de electronebulización (MH₂²⁺ calculado: 1391,5, MH₂²⁺ encontrado: 1392,5).

40 **Ejemplo 2: Síntesis de 1,1,1-tris(2-aminoetil)metano**

Etapa 1(a): Éster dimetílico del ácido 3-(metoxicarbonilmetil)glutárico

45 Se trató carbometoximetilentrifenilfosforano (167 g, 0,5 mol) en tolueno (600 ml) con 3-oxoglutarato de dimetilo (87 g, 0,5 mol) y la reacción se calentó hasta 100 °C en un baño de aceite a 120 °C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 36 h. La reacción después se concentró al vacío y el residuo oleoso se trituró con éter de petróleo/éter dietílico 40/60 1:1, 600 ml. El óxido de trifenilfosfina precipitó y el líquido sobrenadante se decantó/filtró. El residuo tras la evaporación al vacío se sometió a una destilación en columna de bolas a un vacío elevado Bpt (temperatura de la estufa 180-200 °C a 0,2 torr) para producir el éster dimetílico del ácido 3-(metoxicarbonilmetil)glutárico (89,08 g, 53%).

RMN de ¹H (CDCl₃): δ 3,31 (2H, s, CH₂), 3,7 (9H, s, 3 \times OCH₃), 3,87 (2H, s, CH₂), 5,79 (1H, s, =CH) ppm.

50 RMN de ¹³C (CDCl₃), δ 36,56, CH₃, 48,7, 2 \times CH₃, 52,09 y 52,5 (2 \times CH₂); 122,3 y 146,16 C=CH; 165,9, 170,0 y 170,5 3 \times COO ppm.

Etapa 1(b): Hidrogenación del éster dimetílico del ácido 3-(metoxicarbonilmetil)glutárico

El éster dimetílico del ácido 3-(metoxicarbonilmetil)glutárico (89 g, 267 mmol) en metanol (200 ml) se agitó con (10% de paladio sobre carbón: 50% de agua) (9 g) bajo una atmósfera de gas hidrógeno (3,5 bares) durante (30 h).

La disolución se filtró a través de una columna de bolas y se concentró al vacío para producir el éster dimetílico del ácido 3-(metoxicarbonilmetil)glutárico como un aceite, rendimiento (84,9 g, 94%).

RMN de ^1H (CDCl_3), δ 2,48 (6H, d, $J = 8$ Hz, $3 \times \text{CH}_2$), 2,78 (1H, heptete, $J = 8$ Hz, CH), 3,7 (9H, s, $3 \times \text{CH}_3$).

RMN de ^{13}C (CDCl_3), δ 28,6, CH; 37,50, $3 \times \text{CH}_3$; 51,6, $3 \times \text{CH}_2$; 172,28, $3 \times \text{COO}$.

5 Etapa 1(c): Reducción y esterificación del éster trimetílico al triacetato

Bajo una atmósfera de nitrógeno en un matraz de fondo redondo de 2 l y tres bocas se trató hidruro de litio y aluminio (20 g, 588 mmol) en THF (400 ml) cuidadosamente con *tris*(metiloxycarbonilmetil)metano (40 g, 212 mmol) en THF (200 ml) a lo largo de 1 h. Se produjo una reacción fuertemente exotérmica, provocando que el disolvente se agitase con fuerza a reflujo. La reacción se calentó en un baño de aceite a 90 °C a reflujo durante 3 días. La reacción se extinguió con la adición cuidadosa gota a gota de ácido acético (100 ml) hasta que cesó la emisión de hidrógeno. La mezcla de reacción agitada se trató cuidadosamente con una disolución de anhídrido acético (500 ml) a una velocidad tal para conseguir un reflujo suave. El matraz estaba equipado para la destilación y se agitó y después se calentó a 90 °C (temperatura del baño de aceite) para retirar el THF por destilación. Se añadió otra porción de anhídrido acético (300 ml), la reacción volvió a la configuración de reflujo y se agitó y se calentó en un baño de aceite a 140 °C durante 5 h. Se dejó que la reacción se enfriase y se filtró. El precipitado de óxido de aluminio se lavó con acetato de etilo y los filtrados reunidos se concentraron en un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de agua de 50 °C al vacío (5 mmHg) para producir un aceite. El aceite se suspendió en acetato de etilo (500 ml) y se lavó con una disolución de carbonato de potasio acuosa saturada. La disolución de acetato de etilo se separó, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para producir un aceite. El aceite se destiló en una columna de bolas para producir *tris*(2-acetoxietil)metano (45,3 g, 95,9%) como un aceite. P.e. 220 °C a 0,1 mmHg.

RMN de ^1H (CDCl_3), δ 1,66 (7H, m, $3 \times \text{CH}_2$, CH), 2,08 (1H, s, $3 \times \text{CH}_3$); 4,1 (6H, t, $3 \times \text{CH}_2\text{O}$).

RMN de ^{13}C (CDCl_3), δ 20,9, CH_3 ; 29,34, CH; 32,17, CH_2 ; 62,15, CH_2O ; 171, CO.

Etapa 1(d): Retirada de los grupos acetato del triacetato

Se calentó *tris*(2-acetoxietil)metano (45,3 g, 165 mM) en metanol (200 ml) y amoniaco 880 (100 ml) en un baño de aceite a 80 °C durante 2 días. La reacción se trató con otra porción más de amoniaco 880 (50 ml) y se calentó a 80 °C en un baño de aceite durante 24 h. Se añadió otra porción más de amoniaco 880 (50 ml) y la reacción se calentó a 80 °C durante 24 h. La reacción después se concentró al vacío para eliminar todos los disolventes y producir un aceite. Este se suspendió en amoniaco 880 (150 ml) y se calentó a 80 °C durante 24 h. La reacción después se concentró al vacío para eliminar todos los disolventes y producir un aceite. Una destilación en columna de bolas produjo acetamida en 170-180 0,2 mm. Las ampollas que contenían acetamida se lavaron y se continuó la destilación. El *tris*(2-hidroxietil)metano (22,53 g, 92%) destiló en 220 °C 0,2 mm.

RMN de ^1H (CDCl_3), δ 1,45 (6H, q, $3 \times \text{CH}_2$), 2,2 (1H, quintete, CH); 3,7 (6H, t $3 \times \text{CH}_2\text{OH}$); 5,5 (3H, sa, $3 \times \text{OH}$).

RMN de ^{13}C (CDCl_3), δ 22,13, CH; 33,95, $3 \times \text{CH}_2$; 57,8, $3 \times \text{CH}_2\text{OH}$.

35 Etapa 1(e): Conversión del triol en el *tris*(metansulfonato)

A una disolución enfriada en hielo agitada de *tris*(2-hidroxietil)metano (10 g, 0,0676 mol) en diclorometano (50 ml) se le añadió gota a gota lentamente una disolución de cloruro de metansulfonilo (40 g, 0,349 mol) en diclorometano (50 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno a tal velocidad que la temperatura no aumentó por encima de 15 °C. Después se añadió gota a gota piridina (21,4 g, 0,27 mol, 4 eq.) disuelta en diclorometano (50 ml) a tal velocidad que la temperatura no aumentó por encima de 15 °C, reacción exotérmica. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h y después se trató con una disolución de ácido clorhídrico 5 N (80 ml) y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con más diclorometano (50 ml) y los extractos orgánicos se reunieron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron al vacío para producir *tris*[2-(metilsulfonilo)etil]metano contaminado con un exceso de cloruro de metansulfonilo. El rendimiento teórico fue de 25,8 g.

45 RMN de ^1H (CDCl_3), δ 4,3 (6H, t, $2 \times \text{CH}_2$), 3,0 (9H, s, $3 \times \text{CH}_3$), 2 (1H, heptete, CH), 1,85 (6H, q, $3 \times \text{CH}_2$).

Etapa 1(f): Preparación de 1,1,1-*tris*(2-azidoetil)metano

Una disolución agitada de *tris*[2-(metilsulfonilo)etil]metano [de la etapa 1(e), contaminado con un exceso de cloruro de metilsulfonilo] (25,8 g, 67 mmol, teórico) en DMF seca (250 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno se trató con azida de sodio (30,7 g, 0,47 mol) de modo discontinuo a lo largo de 15 minutos. Se observó exotermia y la reacción se enfrió en un baño de hielo. Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se calentó en un baño de aceite a 50 °C durante 24 h. La reacción tomó un color marrón. La reacción se dejó enfriar, se trató con una disolución de carbonato de potasio diluido (200 ml) y se extrajo tres veces con éter de petróleo/éter dietílico 40/60 10:1 (3×150 ml). Los extractos orgánicos se lavaron con agua (2×150 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron. Se

añadió etanol (200 ml) a la disolución de petróleo/éter para mantener la triazida en disolución y el volumen se redujo al vacío a no menos de 200 ml. Se añadió etanol (200 ml) y se volvió a concentrar al vacío para eliminar los últimos restos de petróleo, dejando no menos de 200 ml de una disolución etanólica. La disolución en etanol de la triazida se empleó directamente en la etapa 1(g).

- 5 CUIDADO: NO RETIRAR TODO EL DISOLVENTE, PUESTO QUE LA AZIDA ES POTENCIALMENTE EXPLOSIVA Y DEBE MANTENERSE SIEMPRE EN DISOLUCIÓN DILUIDA

Se evapora al vacío menos de 0,2 ml de la disolución para retirar el etanol y se realiza una RMN de esta muestra pequeña: RMN de ^1H (CDCl_3), δ 3,35 (6H, t, $3\times\text{CH}_2$), 1,8 (1H, septete, CH), 1,6 (6H, q, $3\times\text{CH}_2$).

Etapa 1(g): Preparación de 1,1,1-tris(2-aminoetil)metano

- 10 Se trató *tris*(2-azidoetil)metano (15,06 g, 0,0676 mol) (suponiendo 100% de rendimiento de la reacción previa) en etanol (200 ml) con paladio al 10% sobre carbón (2 g, 50% de agua) y se hidrogenó durante 12 h. El recipiente de reacción se sometió al vacío cada 2 horas para eliminar el nitrógeno emitido de la reacción y se rellenó con hidrógeno. Se tomó una muestra para el análisis de RMN para confirmar la conversión completa de la triazida en triamina. Precaución: la azida no reducida puede explotar cuando se destila. La reacción se filtra a través de un lecho corto de Celite para eliminar el catalizador y se concentra al vacío para producir *tris*(2-aminoetil)metano como un aceite. Este se purificó aún más mediante una destilación en columna de bolas, p.e. 180-200 °C a 0,4 mm/Hg para producir un aceite incoloro (8,1 g, 82,7% de rendimiento global desde el triol).

RMN de ^1H (CDCl_3), δ 2,72 (6H, t, $3\times\text{CH}_2\text{N}$), 1,41 (H, septete, CH), 1,39 (6H, q, $3\times\text{CH}_2$).

RMN de ^{13}C (CDCl_3), δ 39,8 (CH_2NH_2), 38,2 (CH_2), 31,0 (CH).

- 20 **Ejemplo 3: Preparación de 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano**

- Una mezcla de 2-metilbut-2-eno (147 ml, 1,4 mol) y nitrito de isoamilo (156 ml, 1,16 mol) se enfrió hasta -30°C en un baño de hielo seco y metanol y se agitó vigorosamente con un agitador de aire suspendido y se trató gota a gota con ácido clorhídrico concentrado (140 ml, 1,68 mol) a tal velocidad que la temperatura se mantuvo por debajo de -20°C . Esto requiere aproximadamente 1 h, puesto que se produce una exotermia significativa y hay que tener cuidado para evitar el sobrecalentamiento. Se añadió etanol (100 ml) para reducir la viscosidad de la suspensión que se forma al final de la adición, y la reacción se agitó de -20 a -10°C durante 2 h más para completar la reacción. El precipitado se recogió mediante filtración al vacío y se lavó con 4×30 ml de etanol frío (-20°C) y 100 ml de agua enfriada en hielo, y se secó al vacío para producir 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano como un sólido blanco. El filtrado de etanol y los lavados se reunieron y se diluyeron con agua (200 ml), se enfriaron y se dejaron en reposo durante 1 h a -10°C , tras lo cual cristalizó otra cosecha de 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano. El precipitado se recogió mediante filtración y se lavó con el mínimo de agua y se secó al vacío para producir un rendimiento total de 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano (115 g, 0,85 mol, 73%) $>98\%$ puro mediante RMN.

RMN de ^1H (CDCl_3), como una mezcla de isómeros (isómero 1, 90%), 1,5 d, (2H, CH_3), 1,65 d, (4H, $2\times\text{CH}_3$), 5,85, q, y 5,95, q, juntos 1H. (isómero 2, 10%), 1,76 s, (6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,07 (3H, CH_3).

- 35 **Ejemplo 4: Síntesis de bis[N-(1,1-dimetil-2-N-hidroxiiminapropil)-2-aminoetil]-(2-aminoetil)metano (quelante 1)**

- A una disolución de *tris*(2-aminoetil)metano (4,047 g, 27,9 mmol) en etanol seco (30 ml) se le añadió carbonato de potasio anhidro (7,7 g, 55,8 mmol, 2 eq.) a temperatura ambiente con agitación vigorosa bajo una atmósfera de nitrógeno. Se disolvió una disolución de 3-cloro-3-metil-2-nitrosobutano (7,56 g, 55,8 mmol, 2 eq.) en etanol seco (100 ml) y 75 ml de esta disolución se añadió lentamente gota a gota a la mezcla de reacción. A la reacción le siguió una TLC en sílice [las placas se ensayaron en diclorometano, metanol, amoníaco concentrado (0,88 sg) 100/30/5 y la placa de TLC se reveló pulverizando con ninhidrina y calentando]. Se observaron los productos mono-, di- y trialquilados con unas RF crecientes en ese orden. Se realizó una HPLC analítica empleando una columna en fase inversa PRP en un gradiente de acetonitrilo al 7,5-75% en amoníaco acuoso al 3%. La reacción se concentró al vacío para eliminar el etanol y se resuspendió en agua (110 ml). La suspensión acuosa se extrajo con éter (100 ml) para eliminar una parte del compuesto trialquilado y las impurezas lipófilas, dejando el producto mono- y dialquilado deseado en la capa acuosa. La disolución acuosa se tamponó con acetato de amonio (2 eq., 4,3 g, 55,8 mmol) para asegurar una buena cromatografía. La disolución acuosa se conservó a 4°C durante la noche antes de purificar mediante una HPLC preparativa automática.

- 50 Rendimiento (2,2 g, 6,4 mmol, 23%).

Espectroscopía de masas: ion positivo 10 V voltaje de cono. Encontrado: 344; calculado $\text{M}+\text{H} = 344$.

RMN de ^1H (CDCl_3), δ 1,24 (6H, s, $2\times\text{CH}_3$), 1,3 (6H, s, $2\times\text{CH}_3$), 1,25-1,75 (7H, m, $3\times\text{CH}_2$, CH), (3H, s, $2\times\text{CH}_2$), 2,58 (4H, m, CH_2N), 2,88 (2H, t CH_2N_2), 5,0 (6H, s, NH_2 , $2\times\text{NH}$, $2\times\text{OH}$).

RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 1,1 4 \times CH; 1,29, 3 \times CH $_2$; 2,1 (4H, t, 2 \times CH $_2$).

RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ 9,0 (4 \times CH $_3$), 25,8 (2 \times CH $_3$), 31,0 2 \times CH $_2$, 34,6 CH $_2$, 56,8 2 \times CH $_2\text{N}$; 160,3, C=N.

Condiciones de HPLC: caudal de 8 ml/min empleando una columna PRP de 25 mm [A = disolución de amoníaco al 3% (sp. gr = 0,88)/agua; B = acetonitrilo].

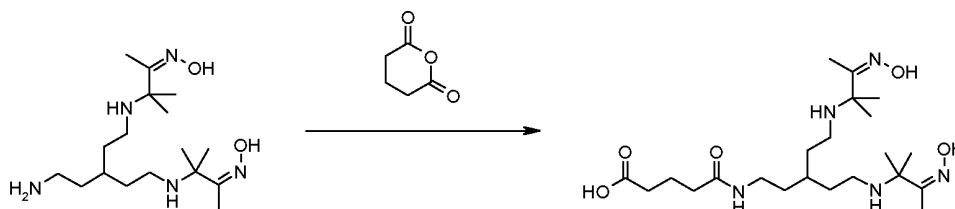
Gradiente	Tiempo (min)	0	15	20	22	30
	% B	7,5	75,0	75,0	7,5	7,5

5

Se cargan 3 ml de disolución acuosa por ejecución y se recoge en una ventana de tiempo de 12,5-13,5 min.

Ejemplo 5: Síntesis del éster tetrafluorotiofenílico del quelante 1-ácido glutárico (quelante 1A)

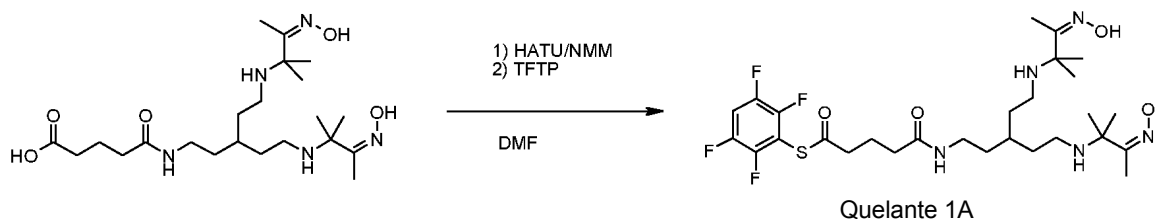
a) Síntesis del intermedio de [quelante 1]-ácido glutárico



10

El quelante 1 (100 mg, 0,29 mmol) se disolvió en DMF (10 ml) y se añadió anhídrido glutárico (33 mg, 0,29 mmol) en porciones con agitación. La reacción se agitó durante 23 horas para lograr la conversión completa del producto deseado. El ácido puro se obtuvo después de una RP-HPLC con buen rendimiento.

b) Síntesis del quelante 1A



15

Al [quelante 1]-ácido glutárico (de la etapa a; 300 mg, 0,66 mmol) en DMF (2 ml) se le añadió HATU (249 mg, 0,66 mmol) y NMM (132 μ l, 1,32 mmol). La mezcla se agitó durante 5 minutos y después se añadió tetrafluorotiofenol (0,66 mmol, 119 mg). La disolución se agitó durante 10 minutos, después la mezcla de reacción se diluyó con acetonitrilo al 20%/agua (8 ml) y el producto se purificó mediante RP-HPLC para producir 110 mg del producto deseado después de una liofilización.

Ejemplo 6: Síntesis del conjugado del péptido 1 con el quelante 1 (compuesto 1)

20

El quelante 1A (3,8 mg, ejemplo 5), el péptido 1 (3,4 mg) y sym.-colidina (1,6 μ l) se disolvieron en DMF (1 ml) y la disolución se agitó durante 90 min. La mezcla de reacción se diluyó con agua (6 ml) y el producto se purificó empleando una HPLC preparativa.

25

Una purificación mediante una HPLC preparativa (10-20% de B a lo largo de 40 min, siendo A = H $_2$ O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 \times 21,20 mm, detección: UV 214 nm) del péptido bruto produjo 1,1 mg (28%) del compuesto 1 puro. El material purificado se analizó mediante una HPLC analítica (gradiente: 10-40% de B lo largo de 5 min, siendo A = H $_2$ O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 0,6 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 \times 2 mm, detección: UV 214 nm, t_R : 3,04 min). Se realizó otra caracterización del producto empleando una espectroscopía de masas de electronebulización (encontrado m/z: 1611,2, esperado MH $_2^{2+}$: 1611,2).

30

Ejemplo 7: Radiomarcaje con ^{99m}Tc del compuesto 1

Etapa (i): Viales liofilizados

El compuesto 1 (45 nmol) se liofilizó en un primer vial (vial 1). Se preparó por separado un kit liofilizado que contenía la siguiente formulación (vial 2):

Componente	P.m.	mg	µmoles
SnCl ₂ ·2H ₂ O	225,63	0,016	0,07
MDP(H ₄)	176,00	0,025	0,14
NaHCO ₃	84,01	4,5	53,6
Na ₂ CO ₃	105,99	0,6	5,66
NaPABA	159,12	0,20	1,26

Etapa (ii): Radiomarcaje

5 El vial 1 se reconstituyó con una disolución de agua:etanol (0,1 ml de una mezcla 50:50), y el vial se sonicó o se mezcló durante 10 minutos. La disolución resultante del compuesto 1 (0,1 ml) se añadió después al vial 2. Después se añadió el eluato de ^{99m}Tc-pertecnetato de un generador Drytec™ (GE Healthcare; 0,9 ml, 0,25-2,18 GBq) al vial, y se dejó la disolución en reposo a temperatura ambiente durante 20 min antes del análisis de HPLC. El RCP fue de 93 a 94%.

10 **Ejemplo 8: Biodistribución del ^{99m}Tc-compuesto 1 en ratones atómicos que portan tumores**

Se alojaron ratones atómicos macho CD-1 (aproximadamente 20 g) en jaulas individuales ventiladas, con acceso libre a alimento y agua. Se cultivaron células HT-29 (ATCC, n.º de catálogo HTB-38) en medio 5a de McCoy (Sigma n.º M8403) suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina/estreptomicina. Las células se dividieron 1:3 dos veces por semana a una confluencia del 70-80% empleando tripsina al 0,25% y se incubaron en 5% de CO₂ a 37 °C.

15 A los ratones se le inyectó por vía subcutánea bajo una anestesia ligera con gas (isoflurano) la suspensión de células HT-29 en un sitio (nuca) con una dosis nominal de 10⁶ células por inyección en un volumen de 100 µl empleando una aguja de calibre fino (25 G). Después se dejó que los tumores se desarrollasen durante 20 días o hasta alcanzar un volumen de al menos 200 mm³ (para su inclusión en el estudio).

20 Después de un tiempo de crecimiento de 20 días, a los animales se les inyectó ^{99m}Tc-compuesto 1 (0,1 ml, 1-5 MBq/animal) como una inyección en embolada intravenosa a través de la vena de la cola. En diversos momentos tras la inyección, los animales recibieron eutanasia, se diseccionaron y se retiraron los siguientes órganos y tejidos. Los resultados a 120 min p.i. fueron los siguientes:

Porcentaje de dosis inyectada (% di/g)					Proporción (tumor:fondo)			
Sangre	Tumor	Pulmón	Hígado	Músculo	T:sangre	T:pulmón	T:hígado	T:músculo
0,29 (0,1)	1,08 (0,1)	0,37 (0,0)	0,46 (0,1)	0,11 (0,1)	3,7	2,9	2,4	12,2

En el tumor estaba presente 44% de la actividad retenida en el cuerpo a 120 min p.i.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> GE Healthcare Limited
 GE Healthcare Limited
- 5 <120> Péptidos marcados con tecnecio
 <130> PZ1114 WO
 <160> 7
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 17
- 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
- 20 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (1)..(13)
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> grupo que inhibe el metabolismo o quelante unido
- 30 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> N, H o Y
- 35 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (3)..(11)
- 40 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> G, S, T o N
- 45 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> T o R
- 50 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> A, D, E, G o S
- 55 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (16)..(16)
 <223> S o T
- 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (17)..(17)
 <223> grupo que inhibe el metabolismo o quelante unido
 <220>

<221>VARIANTE
 <222> (17)..(17)
 <223> D o E

5 <400> 1
 Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys Tyr Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa

<210> 2
 <211> 18
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido sintético
 15

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> grupo que inhibe el metabolismo o quelante unido
 20

<220>
 <221> DISULFURO
 <222> (2)..(14)

25 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> N, H o Y

30 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (4)..(12)

35 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> G, S, T o N

40 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (9) .. (9)
 <223> T o R

45 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (16)..(16)
 <223> A, D, E, G o S

50 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (17)..(17)
 <223> S o T

55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (18)..(18)
 <223> grupo que inhibe el metabolismo o quelante unido

60 <220>
 <221>VARIANTE
 <222> (18)..(18)
 <223> D o E

ES 2 651 334 T3

<400> 2
 Ser Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys Tyr Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa

- 5 <210> 3
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> péptido sintético
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 15 <222> (1)..(1)
 <223> grupo que inhibe el metabolismo o quelante unido
- <220>
 <221> DISULFURO
- 20 <222> (4)..(16)
- <220>
 <221>VARIANTE
- 25 <222> (5)..(5)
 <223> N, H o Y
- <220>
 <221> DISULFURO
- 30 <222> (6)..(14)
- <220>
 <221>VARIANTE
- 35 <222> (7)..(7)
 <223> G, S, T o N
- <220>
 <221>VARIANTE
- 40 <222> (11)..(11)
 <223> T o R
- <220>
 <221>VARIANTE
- 45 <222> (18)..(18)
 <223> A, D, E, G o S
- <220>
 <221>VARIANTE
- 50 <222> (19)..(19)
 <223> S o T
- <220>
 <221>VARIANTE
- 55 <222> (20)..(20)
 <223> D o E
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 60 <222> (22)..(22)
 <223> grupo que inhibe el metabolismo o quelante unido
- <400> 3

ES 2 651 334 T3

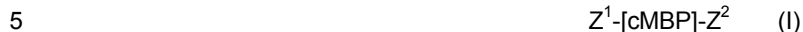
Ala Gly Ser Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys
 1 5 10 15

Tyr Xaa Xaa Xaa Gly Thr
 20

- 5 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> péptido sintético
- 15 <400> 4
 Gly Gly Gly Lys
 1
- 20 <210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 25 <220>
 <223> péptido sintético
- 30 <400> 5
 Gly Ser Gly Lys
 1
- 35 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 40 <220>
 <223> péptido sintético
- 45 <400> 6
 Gly Ser Gly Ser Lys
 1 5
- 50 <210> 7
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 55 <220>
 <223> péptido sintético
- 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> grupo que inhibe el metabolismo o quelante unido
- 65 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (4)..(16)
- 70 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (6)..(14)
- 75 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

REIVINDICACIONES

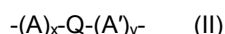
1.- Un agente de formación de imágenes que comprende un complejo de ^xTc radiactivo de un conjugado de quelante de un péptido de unión a c-Met, y dicho conjugado de quelante tiene la fórmula I:



en la que:

^xTc es el radioisótopo ^{94m}Tc o ^{99m}Tc;

cMBP es un péptido cíclico de unión a c-Met de 18 a 30-mero de fórmula II:



10 en la que Q es la secuencia de aminoácidos (SEQ-1):



en la que

X¹ es Asn, His o Tyr;

X² es Gly, Ser, Thr o Asn;

15 X³ es Thr o Arg;

X⁴ es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X⁵ es Ser o Thr;

X⁶ es Asp o Glu;

20 y Cys^{a-d} son cada uno restos cisteína, de modo que los restos a y b, así como c y d, están ciclados para formar dos enlaces disulfuro distintos;

A y A' son independientemente cualquier aminoácido distinto de Cys, o uno de A o A' es Lys(ε-Z³);

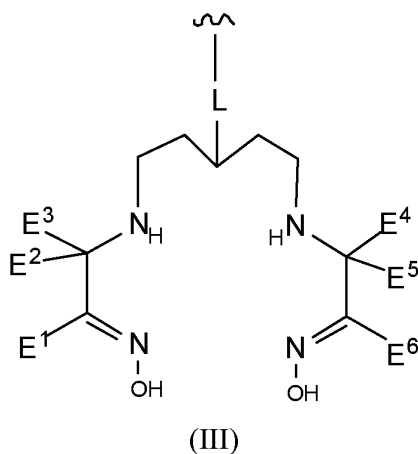
x e y son independientemente números enteros con valor de 0 a 13, y se eligen de tal forma que [x+y] = 1 a 13;

Z¹ está unido al N-terminal de cMBP, y es M^{IG} o Z³;

Z² está unido al C-terminal de cMBP, y es M^{IG} o Z³;

25 en los que cada M^{IG} es independientemente un grupo inhibidor del metabolismo, que es un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido cMBP;

Z³ es un quelante de fórmula (III):



en la que E¹-E⁶ son cada uno independientemente un grupo R';

cada R' es independientemente H o alquilo C₁₋₄, (alquil C₃₋₇)arilo, (alcoxi C₂₋₇)alquilo, hidroxialquilo C₁₋₄, fluoroalquilo C₁₋₄, carboxialquilo C₂₋₇ o aminoalquilo C₁₋₄, o dos o más grupos R' junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo carbocíclico, heterocíclico, saturado o insaturado;

5 L es un grupo conector sintético de fórmula -(A)_m-, en la que cada A es independientemente -CR₂-, -CR=CR-, -C=C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NR₂CR₂-, un grupo cicloheteroalquileo C₄₋₈, un grupo cicloalquileo C₄₋₈, un grupo arileno C₅₋₁₂, o un grupo heteroarileno C₃₋₁₂, o un bloque constitutivo de polietilenglicol (PEG) monodisperso;

cada R se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, alqueno C₂₋₄, alquino C₂₋₄, (alcoxi C₁₋₄)alquilo o hidroxialquilo C₁₋₄;

10 m es un número entero con valor de 1 a 10;

con la condición de que el conjugado de fórmula I comprende un grupo Z³ y dicho grupo Z³ forma un complejo metálico con el ^xTc.

2.- El agente de formación de imágenes de la reivindicación 1, en el que Q comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ-2 o de SEQ-3:

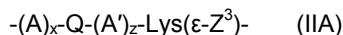
15 Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶ (SEQ-2);

Ala-Gly-Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-Gly-Thr (SEQ-3).

3.- El agente de formación de imágenes de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que X³ es Arg.

4.- El agente de formación de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que uno de A y A' es Lys(ε-Z³), y cMBP comprende solo un resto Lys.

20 5.- El agente de formación de imágenes de la reivindicación 4, en el que cMBP tiene la fórmula IIA:



en la que:

z es un número entero con un valor de 0 a 12, y [x+z] = 0 a 12.

25 6.- El agente de formación de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los grupos -(A)_x- o -(A')_y- comprenden un péptido conector que se selecciona de:

-Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4),

-Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5) o

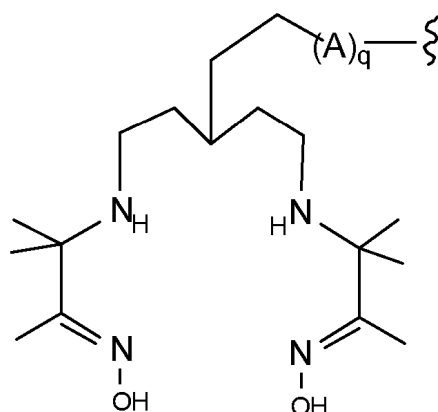
-Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6),

y el grupo Z³ está unido al grupo épsilon-amino del resto Lys de dicho péptido conector.

30 7.- El agente de formación de imágenes de la reivindicación 6, en el que cMBP tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ-7):

Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe- Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly- Gly-Lys.

8.- El agente de formación de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el quelante tiene la fórmula IIIA:



(III A)

en la que q es un número entero con valor de 1 a 6.

- 9.- El agente de formación de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que ^{x}Tc es $^{99\text{m}}\text{Tc}$.
- 10.- El conjugado de quelante de fórmula I, tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 5 11.- Un método para la preparación del agente de formación de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende la reacción del conjugado de quelante de la reivindicación 10 con un suministro de ^{x}Tc según se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 9, en un disolvente adecuado.
- 12.- Una composición radiofarmacéutica que comprende el agente de formación de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con un vehículo biocompatible, en una forma adecuada para la administración a mamíferos.
- 10 13.- Un kit para la preparación de la composición radiofarmacéutica de la reivindicación 12, que comprende el conjugado de quelante de la reivindicación 10 en forma sólida estéril, de modo que, tras su reconstitución con un suministro estéril de ^{x}Tc en un vehículo biocompatible, se produce la disolución para obtener la composición radiofarmacéutica deseadas, en la que ^{x}Tc es como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 9.
- 15 14.- Un método de formación de imágenes del cuerpo humano o animal, que comprende generar una imagen de al menos parte de dicho cuerpo, en el cual se ha distribuido el agente de formación de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o la composición radiofarmacéutica de la reivindicación 12, empleando PET o SPECT, en el que dicho agente de formación de imágenes o composición ha sido previamente administrado a dicho cuerpo.
- 15.- El método de la reivindicación 14, en el que las imágenes son de sitios de localización o sobreexpresión de c-Met.
- 20 16.- El método de la reivindicación 15, en el que el sitio de localización o sobreexpresión de c-Met es un cáncer o una lesión precancerosa.
- 17.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que se realiza repetidamente para controlar el efecto del tratamiento de un cuerpo humano o animal con un fármaco o radiación, realizándose dicha formación de imágenes antes y después de dicho tratamiento y, opcionalmente, también durante dicho tratamiento.
- 25 18.- El uso del agente de formación de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, la composición de la reivindicación 12, o el kit de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en un método para el diagnóstico del cuerpo humano o animal.