

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 910**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A61K 49/00 | (2006.01) |
| A61K 51/04 | (2006.01) |
| A61P 9/00 | (2006.01) |
| A61P 9/10 | (2006.01) |
| A61P 9/06 | (2006.01) |
| A61P 35/00 | (2006.01) |
| A61P 35/02 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2007 PCT/US2007/072669**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2008 WO08045604**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2007 E 07799253 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2079486**

54 Título: **Síntesis eficiente de quelantes para imagenología nuclear y radioterapia: Composiciones y aplicaciones**

30 Prioridad:

05.10.2006 US 828347 P
28.06.2007 US 770395

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2018

73 Titular/es:

THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (50.0%)
201 West 7th Street
Austin, TX 78701, US y
CELL>POINT, LLC (50.0%)

72 Inventor/es:

YANG, DAVID J.;
YU, DONGFANG;
ROLLO, DAVID y
THOMPSON, ANDREW S.

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 674 910 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

Síntesis eficiente de quelantes para imagenología nuclear y radioterapia: Composiciones y aplicaciones

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a los campos de síntesis química, diagnóstico por imágenes, radioterapia, marcado, quimioterapia, terapia médica, tratamiento de enfermedad cardiovascular y tratamiento del cáncer. Más concretamente, la invención se refiere a métodos novedosos de sintetizar conjugados quelante-ligandos de afinidad específica. En la presente memoria se exponen métodos orgánicos de síntesis que producen ligandos de afinidad específica por el quelante de alta pureza en comparación con los conjugados de afinidad específica por el quelante preparados mediante métodos acuosos. Los métodos de diagnóstico por imágenes de un sitio usando estos conjugados, así como kits para preparar estos conjugados, también se exponen en la presente memoria. Además, también se describen métodos de diagnosticar y tratar enfermedades (*es decir*, cánceres, enfermedades cardiovasculares, infecciones e inflamación) en un sujeto usando composiciones que incluyen los conjugados mencionados anteriormente.

20 **2. Descripción de la técnica relacionada**

El diagnóstico por imágenes biomédico incluye varias modalidades que son ampliamente utilizadas por médicos e investigadores para ayudar a no solo el diagnóstico de la enfermedad en un sujeto, sino también para obtener una mayor comprensión de la estructura y funcionamiento normales del organismo. Las modalidades de diagnóstico por imágenes ilustrativas incluyen PET, SPECT, diagnóstico por imágenes en cámara gamma, CT, MRI, ultrasonido, diagnóstico por imágenes duales y diagnóstico por imágenes ópticas.

En muchos casos, el diagnóstico por imágenes óptimo de un sitio concreto en un sujeto requiere la administración de un agente concreto al sujeto. Los metales inorgánicos tales como tecnecio (^{99m}Tc), hierro, gadolinio, renio, manganeso, cobalto, indio, platino, cobre, galio o rodio han demostrado ser un componente valioso de muchos agentes para el diagnóstico por imágenes.

Las moléculas marcadoras con metales inorgánicos pueden obtenerse quelando el metal a combinaciones de átomos de oxígeno, azufre y nitrógeno, por ejemplo, de compuestos concretos. Se han utilizado para este propósito quelantes tales como azufre coloidal, ácido dietilentríaminopentacético (DTPA, O_4), ácido etilendiaminotetracético (EDTA, O_4) y ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA, N_4). Sin embargo, los metales inorgánicos que se quelan de esta manera son de utilidad limitada para el diagnóstico por imágenes debido a su rápida eliminación del organismo.

El marcador radioactivo preferido para los agentes de diagnóstico por imágenes es el tecnecio (^{99m}Tc) debido a su favorable semivida (6 horas), facilidad de producción, amplia disponibilidad, baja energía (140 keV) y bajo coste. La semivida más larga de los isótopos, tales como ^{99m}Tc facilita el transporte de los aminoácidos radiomarcados a los hospitales sin necesidad de contar con un laboratorio de radioquímica especializado ni un ciclotrón in situ. Sin embargo, la unión del ^{99m}Tc a fármacos con fines de diagnóstico por imágenes es, con frecuencia, un reto.

^{188}Re tiene buenas características para el diagnóstico por imágenes y para su potencial uso terapéutico debido a su alta energía β (2,1 MeV), semivida física corta (16,9 h) y emisión de rayos gamma de 155 keV para propósitos de diagnóstico por imágenes y dosimétricos. La corta semivida del ^{188}Re permite mayores dosis en comparación con los radionúclidos de vida más larga. Además, la semivida corta reduce los problemas de gestión y almacenamiento de residuos radiactivos. En concreto, el ^{188}Re se comercializa a través de un sistema generador en las propias instalaciones similar a un generador de ^{99m}Tc . El ^{188}Re puede obtenerse de un generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, lo que lo hace muy conveniente para su uso clínico. Ambos, ^{99m}Tc y ^{188}Re , emiten rayos gamma, de modo que la dosimetría generada según las imágenes de ^{99m}Tc se espera que sea más precisa que la producida mediante el radioisótopo convencional actual, Y-90.

Con respecto al diagnóstico por imágenes mediante tomografía de emisión de positrones (PET), la radiosíntesis PET debe ser rápida, ya que el radioisótopo se deteriorará durante la síntesis química prolongada y puede producirse un mayor riesgo de exposición a la radiación durante la radiosíntesis. Los trazadores producidos en ciclotrones están limitados por la disponibilidad de un ciclotrón local y su alto coste. La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos permite la producción radiofarmacéutica en instalaciones comerciales centrales en condiciones bien controladas y distribuye a clínicas locales en las que se administran. Del mismo modo, los sistemas generadores de radionúclidos que pueden producirse en una instalación bien controlada han sido adoptados por los procedimientos actuales de la FDA y tienen un largo historial de aplicaciones clínicas exitosas. Un generador usa un par núclido precursor-producto en donde un isótopo precursor de vida relativamente larga se deteriora a un isótopo producto de vida corta que se usa para el diagnóstico por imágenes. El isótopo precursor, que se produce en unas instalaciones de ciclotrón, puede enviarse a un sitio clínico, desde el cual el isótopo producto puede eluirse en el mismo sitio para uso clínico.

65

El ^{68}Ga tiene una cantidad alta de emisión de positrones (89 % de su descomposición total); por lo tanto, la consideración principal con este radionúclido es su resolución espacial, que depende del intervalo de positrones (energía), la no colinealidad de la destrucción de fotones, las propiedades intrínsecas, el tamaño y la geometría del detector y la selección del algoritmo de reconstrucción. Los aspectos del diseño del detector, las propiedades físicas y su influencia en la resolución espacial del sistema han sido abordados ampliamente por muchos autores, lo que conduce a una optimización continua del hardware. Aunque la máxima cantidad de energía de positrones de ^{68}Ga (máx. = 1,90 MeV, media = 0,89 MeV) es mayor que la de ^{18}F (máx. = 0,63 MeV, media = 0,25 MeV), un estudio basado en el análisis Monte Carlo sobre resolución espacial reveló que, según la suposición de una resolución espacial de 3 mm de detectores PET, la anchura completa convencional a la mitad del pico (FWHM) de ^{18}F y ^{68}Ga es indistinguible en los tejidos blandos (3,01 mm frente a 3,09 mm). Esto significa que con la resolución espacial a 5-7 mm de los escáneres clínicos actuales, la calidad del diagnóstico por imágenes usando trazadores a base de ^{68}Ga puede ser tan buena como la de agentes a base de ^{18}F y esto ha estimulado a otros a investigar los posibles agentes de diagnóstico por imágenes a base de ^{68}Ga . Además, los agentes PET a base de ^{68}Ga poseen un importante potencial comercial porque el isótopo puede producirse a partir de un generador de ^{68}Ge (semivida de 275 días) en las propias instalaciones y servir como alternativa conveniente a los isótopos PET de ciclotrones, tales como ^{18}F o ^{13}N .

Con respecto a las preparaciones sintéticas de agentes para diagnóstico por imágenes, cuando dichos agentes se preparan en condiciones acuosas (húmedas), a veces, la purificación de los agentes puede suponer un problema. La purificación en condiciones acuosas se puede lograr usando, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño o diálisis con membranas de cortes de un peso molecular concreto; por ejemplo, la diálisis habitualmente es más eficaz cuando se separan especies de pesos moleculares de 1000 g/mol o superiores. Sin embargo, este método de purificación frecuentemente no solo aísla el agente deseado sino también cualquier otra especie que pueda pasar a través de la membrana. La introducción de impurezas en los agentes para el diagnóstico por imágenes puede ser problemática en aplicaciones futuras de los agentes para diagnóstico por imágenes, especialmente en lo que respecta a los usos terapéuticos o de diagnóstico por imágenes. Por ejemplo, si se cree que un agente para diagnóstico por imágenes que incorpora un radionúclido (el "verdadero" agente para diagnóstico por imágenes) es puro, pero realmente contiene impurezas que también incorporan un radionúclido, la medición o detección adecuada del agente para diagnóstico por imágenes "verdadero" puede oscurecerse o falsearse debido a la presencia de las impurezas.

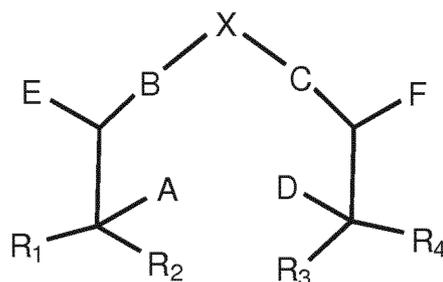
Los métodos de sintetizar compuestos orgánicos en medios orgánicos, que emplean disolventes orgánicos y el uso de grupos protectores, habitualmente ofrecen mejoras en la purificación de compuestos con respecto a las purificaciones acuosas. La instalación de grupos protectores permite proteger varios grupos funcionales de productos intermedios durante la síntesis y facilita la purificación de esos productos intermedios. Varios medios de purificación que utilizan disolventes orgánicos permiten la separación y el aislamiento de los compuestos deseados, tales como agentes para diagnóstico por imágenes, con muy pocas impurezas. Además, las especies de pesos moleculares inferiores a 1000 g/mol pueden, con frecuencia, purificarse fácilmente usando métodos de purificación de química orgánica. A la vista de los beneficios ofrecidos por la síntesis orgánica y la purificación con respecto a la purificación acuosa, los métodos de purificación y sintetización orgánica de los agentes para diagnóstico por imágenes producirían agentes de mayor pureza que los obtenidos mediante purificación acuosa.

Hasta la fecha, ciertos agentes para el diagnóstico por imágenes se han preparado solo mediante medios acuosos. Las impurezas presentes en estos agentes pueden perjudicar su uso como agentes para el diagnóstico por imágenes o terapéuticos. Por lo tanto, existe una necesidad de preparación de estos y otros agentes usando técnicas orgánicas sintéticas para permitir la obtención de agentes de mayor pureza.

Sumario de la invención

Los inventores presentes han identificado métodos novedosos de sintetizar agentes que son, en ciertas realizaciones, conjugados de un quelante y un ligando de afinidad específica (también denominado resto de afinidad específica). Dichos agentes pueden usarse para el diagnóstico por imágenes, el diagnóstico y/o fines terapéuticos, por ejemplo. Se describen métodos de purificación y sintéticos orgánicos (disolventes) y húmedos (acuosos), y se muestra que los métodos de purificación y sintéticos orgánicos derivan en compuestos de mayor pureza que los preparados/purificados por química húmeda. Los compuestos de alta pureza son mejores candidatos para la aplicación clínica, por ejemplo. Además, ciertos compuestos y métodos de la presente invención ofrecen una amplia flexibilidad y selectividad en términos de (1) sitios disponibles de conjugación de un quelante a un ligando de afinidad específica y (2) átomos disponibles para la quelación a un ion metálico.

Por consiguiente, un aspecto general de la presente invención contempla un método de sintetizar un conjugado quelante-ligando de afinidad específica que comprende:



a al menos un ligando de afinidad específica que comprende al menos un grupo funcional, en donde el quelante es etilendicisteína (EC), y en donde los dos grupos tiol y los dos grupos amina de la etilendicisteína están protegidos; es decir, en donde:

-A y D son, cada uno, un tiol protegido;

-B y C son, cada uno, una amina terciaria;

-E y F son, cada uno, -COOH;

-R₁, R₂, R₃ y R₄ son, cada uno, H;

-X es -CH₂-CH₂-; y

-la conjugación es entre A, D, E o F del quelante y al menos un grupo funcional desprotegido de cada ligando de afinidad específica;

-al menos uno de A, D y el ligando de afinidad específica comprende un grupo funcional protegido,

-al menos un grupo funcional del ligando de afinidad específica está desprotegido,

-el ligando de afinidad específica es un agente que simula la glucosa.

Los conjugados pueden incluir un ligando de afinidad específica o más de un ligando de afinidad específica. En algunas realizaciones, el conjugado incluye dos ligandos de afinidad específica. Los ligandos de afinidad específica pueden ser idénticos, o pueden ser de tipos distintos. A continuación, se comentan con mayor detalle los tipos de ligandos de afinidad específica.

Los métodos comentados en la presente memoria son distintos de los métodos descritos en la solicitud copendiente de patente de los Estados Unidos número de serie 11/737.694, presentada el 19 de abril de 2007, y son distintos de los métodos descritos en la solicitud copendiente de patente internacional n.º PCT/US2006/016784, presentada el 4 de mayo de 2006.

En general, los métodos de la presente invención tienen lugar en un medio orgánico. Como se utiliza en la presente memoria, "medio orgánico" se refiere a soluciones y métodos de purificación que comprenden uno o más disolventes orgánicos. Las opciones de disolventes para los métodos de la presente invención resultarán conocidas para el experto en la técnica. Las opciones de disolventes pueden depender, por ejemplo, de cuál o cuáles facilitarán la solubilización de todos los reactivos o, por ejemplo, de cuál o cuáles facilitarán más la reacción deseada (particularmente, si el mecanismo de reacción es conocido). Los disolventes pueden incluir, por ejemplo, disolventes polares y/o disolventes no polares. Un disolvente puede ser un disolvente aprótico polar, tal como dimetilsulfóxido. Las opciones de disolventes incluyen, aunque no de forma limitativa, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dioxano, metanol, etanol, hexano, cloruro de metileno, tetrahidrofurano y/o acetonitrilo. En algunas realizaciones, los disolventes incluyen etanol, dimetilformamida y/o dioxano. Se puede elegir más de un disolvente para cualquier reacción o procedimiento purificación concreto. El agua también puede mezclarse en cualquier opción de disolvente; esto se puede realizar para mejorar la solubilidad de uno o más reactivos, por ejemplo.

En algunas realizaciones, solo tiene lugar mediante síntesis orgánica (es decir, en medios orgánicos) la conjugación entre un quelante y un ligando de afinidad específica. En algunas realizaciones, solo tiene lugar mediante síntesis orgánica la síntesis de un quelante. En algunas realizaciones, solo tiene lugar mediante síntesis orgánica la quelación de un ion metálico valente. En ciertas realizaciones, una o más de estas etapas tienen lugar mediante síntesis orgánica.

Se puede utilizar cualquier quelante (es decir, un compuesto capaz de quelar o unir uno o más iones metálicos) conocido por los expertos en la técnica usando la metodología de la presente invención, y los quelantes ilustrativos se describen en más detalle en la presente memoria. Los quelantes habitualmente se unen a uno o más iones metálicos mediante una unión iónica. En algunas realizaciones, el quelante comprende DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), uno o más aminoácidos, o cualquier combinación de uno o más de estos grupos. En ciertas realizaciones, se seleccionan uno o más aminoácidos del grupo que consiste en glicina y cisteína. En algunas realizaciones, el quelante se selecciona del grupo que consiste en dicisteína, triglicina cisteína y tricisteína glicina. La cantidad y las opciones de aminoácidos pueden estar limitadas por su solubilidad en medios orgánicos. En ciertas realizaciones, el quelante es etilendicisteína (EC).

Los ligandos de afinidad específica también se describen con más detalle en la presente memoria. Si bien un quelante puede estar conjugado (es decir, vinculado o unido químicamente) a un ligando de afinidad específica

por cualquier modo conocido por los expertos en la técnica (p. ej., un enlace covalente, un enlace iónico, un enlace dativo, un par iónico), habitualmente la unión comprende un enlace covalente.

Los métodos de la presente invención pueden también comprender al menos una etapa de purificación. Cualquier compuesto puede purificarse a través de cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica están familiarizados con estos métodos y con cuándo se pueden emplear estos métodos. Por ejemplo, en una síntesis multietapa que está dirigida a llegar a un compuesto concreto, puede realizarse una etapa de purificación después de cada etapa sintética, después de cada pocas etapas, en varios puntos durante la síntesis, y/o al final de la síntesis. En algunos métodos, una o más etapas de purificación comprenden una técnica seleccionada del grupo que consiste en cromatografía en columna de gel de sílice, HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y LC (cromatografía líquida). En ciertas realizaciones, los métodos de purificación excluyen específicamente la cromatografía de exclusión por tamaño y/o la diálisis. Los métodos de purificación se describen con más detalle a continuación.

En ciertas realizaciones, los quelantes no conjugados y/o conjugados quelante-ligando de afinidad específica se generan mediante métodos orgánicos sintéticos con una pureza muy alta con respecto a dichos compuestos generados mediante la metodología acuosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, un quelante no conjugado, un quelante desprotegido, un quelante protegido, un conjugado quelante-ligando de afinidad específica o un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica generado por medios orgánicos (o cualquier compuesto que comprende una combinación de quelante, grupo protector, ligando de afinidad específica e ion metálico) tiene una pureza de entre aproximadamente 90 % y aproximadamente 99,9 %, en comparación con una pureza de entre aproximadamente 50 % y aproximadamente 70 % para el producto acuoso. En determinadas realizaciones, un quelante no conjugado, un quelante desprotegido, un quelante protegido, un conjugado quelante-ligando de afinidad específica, un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica generado por medios orgánicos (o cualquier compuesto que comprende una combinación de quelante, grupo protector, ligando de afinidad específica e ion metálico) tiene una pureza de aproximadamente o al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o superior, o cualquier intervalo derivable de los mismos. En ciertas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 70 % a aproximadamente 99,9 %. En ciertas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 75 % a aproximadamente 99,9 %. En ciertas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 80 % a aproximadamente 99,9 %. En ciertas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 85 % a aproximadamente 99,9 %. En ciertas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 90 % a aproximadamente 99,9 %. En ciertas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 95 % a aproximadamente 99,9 %.

Los grupos funcionales, como se describen en la presente memoria, pueden ser aquellos de cualquier tipo conocido por el experto en la técnica. El término "grupo funcional" generalmente se refiere a cómo los expertos en la técnica clasifican los grupos químicamente reactivos. Entre los ejemplos no limitativos se incluyen alqueno, alquino, arilo (p. ej., fenilo, piridinilo), alcohol, aldehído, cetona, azida, halógeno, éster, -COOH, -NH₂, tiol, una amina secundaria, una amina terciaria, -S-, -S(O)- y -S(O)₂-. En algunas realizaciones, al menos un grupo funcional comprende un átomo seleccionado del grupo que consiste en C, H, O, N, P y S. Las posiciones A, B, C, D, E, y/o F pueden comprender uno o más grupos funcionales (p. ej., -COOH, -NH₂, tiol, una amina secundaria, una amina terciaria, -S-, -S(O)- o -S(O)₂-). En determinadas realizaciones, al menos un grupo funcional del ligando de afinidad específica comprende un átomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, S y P. El grupo funcional del ligando de afinidad específica puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en amino, amido, tiol, hidroxilo, éter, éster, carbonilo, ácido carboxílico, sulfonamida, tioéter, tioéster y tiocarbonilo.

El ligando de afinidad específica y el quelante habitualmente tendrán uno o más grupos funcionales. En la presente memoria se describen grupos funcionales y agentes protectores que pueden usarse para generar un grupo funcional protegido. Los expertos en la técnica comprenderán que cualquier grupo funcional puede protegerse mediante un agente protector según sea necesario, como se describe en la presente memoria. De este modo, un grupo funcional puede estar protegido (p. ej., una amina protegida, tal como -NH-Cbz) o desprotegida, también denominada "libre" (tal como -NHNH₂). Como es conocido por los expertos en la técnica, los grupos protectores se usan en síntesis orgánicas y no en síntesis acuosas.

Además, en ciertas realizaciones, pueden eliminarse uno o más grupos protectores. La eliminación de un grupo protector puede realizarse en cualquier momento durante cualquier método o síntesis descritos en la presente memoria, pero se lleva a cabo, habitualmente, cuando el grupo protector ya no es necesario y el grupo funcional que está siendo protegido desea ser "revelado". En cualquier método descrito en la presente memoria, cualquier compuesto que comprende un quelante descrito en la presente memoria (p. ej., un conjugado quelante-ligando de afinidad específica, un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica) puede no contener ningún grupo protector, o puede comprender uno o más grupos protectores. Por ejemplo, se puede diagnosticar por imágenes un sitio usando un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica que no contiene grupos protectores, o que contiene uno o más grupos protectores.

En ciertas realizaciones, el ligando de afinidad específica comprende un grupo saliente. El término "grupo saliente" generalmente se refiere a grupos que pueden desplazarse fácilmente mediante un nucleófilo, tal como una amina, un

alcohol o un nucleófilo de tiol. Dichos grupos salientes son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, carboxilatos, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxibenzotriazol, haluros, triflatos, tosilatos, mesilatos, alcoxis, tioalcoxis, sulfonilos y similares.

En realizaciones adicionales, los tres o más grupos funcionales del quelante forman juntos un quelato. Habitualmente, tres o cuatro átomos juntos forman un quelato. En determinadas realizaciones, el quelato se selecciona en el grupo que consiste en NS_2 , N_2S , S_4 , N_2S_2 , N_3S y NS_3 . Por ejemplo, tres tioéteres y una amina secundaria pueden formar un quelato de NS_3 . En algunas realizaciones, tal como con etilendicisteína, el quelato es un quelato de N_2S_2 . Los quelatos pueden ser de cualquier tipo conocido por los expertos en la técnica y también se describen en la presente memoria. Otros átomos, además de N y S pueden comprender un quelato, tal como el oxígeno.

Como se utiliza en la presente memoria, "quelato" puede usarse como un nombre o un verbo. Como un nombre, "quelato" se refiere a uno o más átomos que son capaces de quelar uno o más iones metálicos, o son quelantes a uno o más iones metálicos. Los iones metálicos se describen con más detalle en la presente memoria. En algunas realizaciones, solamente un ion metálico se coordina a un quelato. Un ejemplo no limitativo de quelato incluye "un quelato de N_2S_2 ": esto significa que dos átomos de nitrógeno y dos átomos de azufre de un quelato son a) capaces de quelar a uno o más iones metálicos o b) están coordinados a (o quelados a) uno o más iones metálicos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el quelato es N_2S_2 . Un compuesto que comprende un quelato es un quelante. Habitualmente, solo un ion metálico está quelado a un quelante.

En el método inventivo de sintetizar un conjugado quelante-ligando de afinidad específica, A y D son, cada uno, un tiol protegido. El tiol puede estar protegido en al menos una etapa mediante al menos un agente protector tiol. El agente protector tiol puede ser cualquiera de los conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el agente protector tiol puede seleccionarse de un grupo que consiste en un haluro de alquilo, un haluro de bencilo, un haluro de benzoilo, un haluro de sulfonilo, un haluro de trifenilmetilo, un haluro de metoxitriphenilmetilo y cisteína.

En ciertas realizaciones, al menos una amina puede protegerse en una o más etapas usando al menos un agente protector de amina. Los agentes protectores de amina pueden ser cualquiera de los conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el grupo protector de amina puede seleccionarse del grupo que consiste en cloroformiato de bencilo, formiato de *p*-nitro-clorobencilo, cloroformiato de etilo, dicarbonato de di-terc-butilo, cloruro de trifenilmetilo y cloruro de metoxitriphenilmetilo.

En ciertas realizaciones, el quelante es etilendicisteína. Cuando se utiliza etilendicisteína como quelante en la síntesis de un conjugado etilendicisteína-ligando de afinidad específica, los dos grupos tiol de la etilendicisteína se protegen usando al menos un agente protector de tiol (*p. ej.*, usando dos o más equivalentes de un agente protector de tiol) y en otra etapa los dos grupos amina de la etilendicisteína se protegen usando al menos un agente protector de amina (*p. ej.*, mediante dos o más equivalentes de un agente protector de amina). Dado que los grupos tiol son más reactivos que los grupos amina, los grupos tiol se protegerán habitualmente antes de proteger los grupos amina, cuando ambos están inicialmente desprotegidos ("libres").

Como se mencionó, la conjugación entre el quelante y un ligando de afinidad específica puede tener lugar mediante cualquier método y unión química conocida por los expertos en la técnica. Es decir, el ligando de afinidad específica puede estar conjugado o unido a uno o más quelantes de cualquier manera conocida por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la conjugación entre el quelante y el ligando de afinidad específica tiene lugar en una única etapa (*es decir*, una reacción en "un solo recipiente"). Como saben los expertos en la técnica, dichas reacciones en una única etapa son deseables, ya que ahorran tiempo, ayudan a minimizar los reactivos residuales y a minimizar la pérdida de producto. Cualquiera de A, D, E y/o F puede participar en conjugación a un ligando de afinidad específica. Además, cualquiera de A, B, C, D, E y/o F puede participar en la quelación. Además, cualquiera de A, D, E y/o F puede participar tanto en la quelación como en la conjugación. Dicha flexibilidad permite manipular los quelantes de diversas formas, dependiendo de, por ejemplo, la reactividad de un ligando de afinidad específica seleccionado, la selectividad de conjugación deseada, la solubilidad de los reactivos, el ion metálico deseado para la quelación, etc. Habitualmente, pero no siempre, la conjugación se produce antes de la quelación.

Habitualmente, un tipo de ligando de afinidad específica está conjugado a un quelante, pero se pueden conjugar múltiples ligandos de afinidad específica a un único quelante. Comúnmente, durante la síntesis orgánica de conjugados quelante-ligandos de afinidad específica, como entre el quelante y el ligando de afinidad específica, uno actúa como el nucleófilo y uno actúa como el electrófilo de tal forma que dicha conjugación tiene lugar mediante un enlace covalente. El enlace covalente puede ser de cualquier tipo conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el enlace covalente se selecciona del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace éter, un enlace éster, un enlace tioéter, un enlace tioéster, un enlace sulfonamida y un enlace de carbono-carbono. El enlace de carbono-carbono habitualmente es un enlace sencillo, pero también puede ser un enlace doble o triple. Cuando actúan como electrófilos, los quelantes y ligandos de afinidad específica pueden comprender grupos funcionales tales como halógenos y sulfonilos, que actúan como grupos salientes durante la conjugación. En algunas realizaciones, la conjugación tiene lugar en uno o más grupos funcionales del quelante seleccionado del grupo que consiste en ácido carboxílico, amina y tiol. Los ligandos de afinidad específica también pueden comprender grupos nucleofílicos, tales como $-NH_2$, que pueden participar en conjugación con un quelante electrofílico. Los modos de conjugación se comentan con mayor detalle más adelante.

En ciertas realizaciones, el conjugado quelante-ligando de afinidad específica además comprende un conector entre el quelante y el ligando de afinidad específica. Dicho conector puede, por ejemplo, proporcionar una conjugación más fácil entre el quelante y el ligando de afinidad específica proporcionando un grupo reactivo que facilita la reacción de conjugación. El conector puede ser de cualquier tipo conocido por los expertos en la técnica. El conector puede estar inicialmente unido al quelante o al ligando de afinidad específica. Un conector puede estar unido al quelante, mientras que otro conector está unido al ligando de afinidad específica, de tal manera que los dos conectores pueden unirse a continuación. Los expertos en la técnica conocerán los tipos de conectores disponibles para los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, el conector se selecciona del grupo que consiste en un péptido, ácido glutámico, ácido aspártico, bromoetilacetato, etilendiamina, lisina y cualquier combinación de uno o más de estos grupos.

En determinadas realizaciones, E y F se seleccionan, cada uno, independientemente del grupo que consiste en -COOH, -NH₂ o tiol. En algunas realizaciones, E y F son, cada uno, -COOH. En ciertas realizaciones, la conjugación de al menos un ligando de afinidad específica tiene lugar en E y/o F. En ciertas realizaciones, cada uno de A y D se protegen mediante al menos un grupo protector antes de la conjugación.

Como apreciará un experto en la técnica, para conjugar un quelante con un ligando de afinidad específica, al menos un grupo funcional del quelante y al menos un grupo funcional del ligando de afinidad específica debe estar "libre" (es decir, no protegido por un grupo protector) de tal manera que los dos compuestos puedan unirse.

El quelante puede también comprender un espaciador, X. En ciertos aspectos, el uso de un espaciador permite el número y orientación adecuados de los átomos quelantes para quelar un ion metálico. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con los tipos de espaciadores que pueden usarse para los métodos de la presente invención, y los ejemplos de espaciadores se describen a continuación. Por ejemplo, puede emplearse un espaciador alquilo, tal como (-CH₂)_n, en donde n es 1-100. Un tipo de quelante que puede utilizarse en los métodos de la presente invención que comprende un espaciador de etileno es la etilendicisteína (EC). En determinadas realizaciones, X es -CH₂-C(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)- o -C(O)-CH₂-CH₂- y B y/o C es una amina secundaria. Esta realización, habitualmente, da como resultado que B o C sean menos nucleofílicas que la otra. Por ejemplo, si B, C y F juntos se representan como -NH-C(O)-CH₂-CH₂-NH-, la amina secundaria de la posición C será más nucleofílica que la amina secundaria de B. Por lo tanto, C será más reactiva, lo que dará lugar a la conjugación selectiva de un ligando de afinidad específica en la posición C. En determinadas realizaciones, tanto las posiciones A y D o E y F están cada una protegidas por al menos un grupo protector antes de la conjugación en C.

Una característica de usar enlaces amida, tales como cuando B, C y L forman juntos NH-C(O)-CH₂-CH₂-NH-, radica en el hecho de que las reacciones en donde un ion metálico se quela a un quelante con frecuencia tienen lugar en un medio ácido. Los enlaces amida son relativamente resistentes a la degradación en medios ácidos y, por lo tanto, proporcionan estabilidad estructural en el quelante durante dichas reacciones de quelación. Por lo tanto, X junto con B y/o C puede comprender un enlace amida.

Los conjugados quelante-ligando de afinidad específica quelados a un ion metálico pueden funcionar como, por ejemplo, agentes para el diagnóstico por imágenes y/o diagnósticos, como se describe en la presente memoria. También pueden funcionar como agentes terapéuticos o agentes para el diagnóstico y terapia dual, o el diagnóstico por imágenes y terapia duales. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención además comprenden la quelación de un ion metálico a un quelante para generar un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica. El ion metálico puede ser cualquiera de los conocidos por un experto en la técnica. El ion metálico puede ser un ion metálico "frío" (no radioactivo) o un radionúclido. En ejemplos no limitativos, el ion metálico puede seleccionarse del grupo que consiste en un ion tecnecio, un ion cobre, un ion indio, un ion talio, un ion galio, un ion arsénico, un ion renio, un ion holmio, un ion itrio, un ion samario, un ion selenio, un ion estroncio, un ion gadolinio, un ion bismuto, un ion hierro, un ion manganeso, un ion lutecio, un ion cobalto, un ion platino, un ion calcio y un ion rodio. El ion metálico frío puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en Cu-62, As-72, Re-187, Gd-157, Bi-213, Fe-56, Mn-55, un ion hierro, un ion manganeso, un ion cobalto, un ion platino y un ion rodio.

El ion metálico puede ser un radionúclido, y puede ser cualquier radionúclido conocido por los expertos en la técnica. El radionúclido, en algunas realizaciones, puede seleccionarse del grupo que consiste en ^{99m}Tc, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁶Re, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁸⁹Sr, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁴⁸Gd, ⁵⁵Fe, ²²⁵Ac, ²¹²Bi, ²¹¹At, ⁴⁵Ti, ⁶⁰Cu, ⁶¹Cu, ⁶⁷Cu y ⁶⁴Cu. En algunas realizaciones, el ion metálico es ^{99m}Tc.

Si se elige que el ion metálico sea ^{99m}Tc, por ejemplo, el método puede también comprender la adición de un agente reductor. El agente reductor puede ser cualquiera conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el agente reductor comprende un ion seleccionado del grupo que consiste en un ion ditionito, un ion estannoso y un ion ferroso. En algunas realizaciones, el ion metálico es ¹⁸⁸Re. En otras realizaciones, el ion metálico es ⁶⁸Ga.

Cuando se emplea un ion metálico en el método de la presente invención, el ion metálico puede quelarse a cualquier quelato conocido por los expertos en la técnica, como se describe en la presente memoria. Los expertos en la técnica reconocen que los iones metálicos se quelan a diversos números de átomos en función de, por ejemplo, el tipo de metal, su valencia y los átomos disponibles para la quelación. Por ejemplo, tres o cuatro átomos del quelante pueden quelarse a

un ion metálico. En determinadas realizaciones, un ion metálico quelado puede ser ^{99m}Tc . En determinadas realizaciones, un ion metálico quelado puede ser ^{186}Re . En determinadas realizaciones, un ion metálico quelado puede ser ^{187}Re .

5 En algunas realizaciones, el quelato puede seleccionarse del grupo que consiste en NS_2 , N_2S , S_4 , N_2S_2 , N_3S y NS_3 . En ciertas realizaciones, uno o más de estos quelatos puede no ser un quelato. En algunas realizaciones, N_3S no es un quelato. En determinadas realizaciones, el quelato es N_2S_2 , por ejemplo, etilendicisteína. Los métodos de la presente invención pueden también comprender la síntesis de un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica en donde el ligando de afinidad específica participa con A, B, C, D, E y/o F en la quelación a un ion metálico. Los iones metálicos, la quelación y los ligandos de afinidad específica se comentan con mayor detalle más adelante. En algunas realizaciones, el ion metálico se puede detectar mediante diagnóstico por imágenes. El diagnóstico por imágenes puede realizarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los métodos ilustrativos de diagnóstico por imágenes se comentan más adelante en profundidad en la memoria descriptiva, e incluyen PET y SPECT.

15 Según se describe anteriormente, los conjugados quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica preparados mediante síntesis orgánica habitualmente gozan de purzas más altas que los obtenidos mediante preparaciones acuosas. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, el conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica generado por medios orgánicos está entre aproximadamente 90 % y aproximadamente 99,9 % de pureza, en comparación con entre aproximadamente 50 % y aproximadamente 70 % de pureza para el producto acuoso. En determinadas realizaciones, el conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica sintetizado mediante medios orgánicos es aproximadamente, o al menos aproximadamente, de 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % de pureza o superior, o cualquier intervalo derivable de ellos.

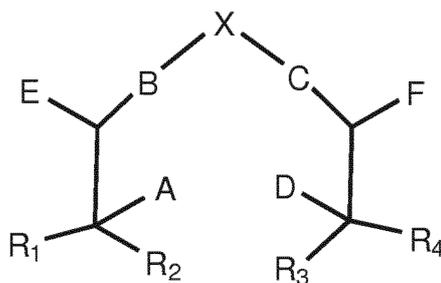
25 Cualquier quelante descrito en la presente memoria puede quelarse a un ion metálico. Puede usarse un quelante protegido, o un quelante desprotegido. El quelante puede quelarse antes o después de que el quelante se purifique.

En ciertas realizaciones, la generación de un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica comprende:

- 30 (a)eliminar al menos un grupo protector de un conjugado quelante-ligando de afinidad específica, como se describe en la presente memoria; y
(b)quelar un ion metálico al quelante del conjugado quelante-ligando de afinidad específica.

En ciertas realizaciones, la generación de un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica comprende:

- 35 (a)obtener un quelante de la fórmula siguiente:



40 en donde el quelante es etilendicisteína (EC), y en donde los dos grupos tiol y los dos grupos amina de la etilendicisteína están protegidos; es decir, en donde:

- A y D son, cada uno, un tiol protegido;
-B y C son, cada uno, una amina terciaria;
-E y F son, cada uno, $-\text{COOH}$;
45 - R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son, cada uno, H;
-X es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$;
(b)conjugarse el quelante a un ligando de afinidad específica para generar un conjugado quelante-ligando de afinidad específica;
(c)eliminar al menos un grupo protector del conjugado quelante-ligando de afinidad específica; y
50 (d) quelar un ion metálico como se describe en la presente memoria al quelante del conjugado quelante-ligando de afinidad específica.

De hecho, se contempla que cualquier compuesto descrito en la presente memoria que comprenda uno o más grupos protectores puede, en cualquier método concreto, experimentar la eliminación de uno o más grupos protectores. Un grupo protector se puede eliminar, por ejemplo, del resto quelante, el resto de ligando de afinidad específica o de ambos restos en una o más etapas antes o después de que un conjugado quelante-ligando de

afinidad específica se quele a un ion metálico, como se describe en la presente memoria. Los grupos protectores se describen con más detalle en la presente memoria, incluida su instalación y eliminación.

En otras realizaciones, la generación de un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica comprende:

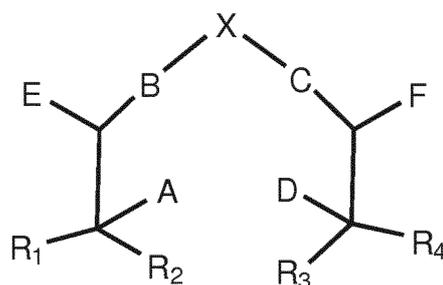
(a) quelar un ion metálico a un quelante como se describe en la presente memoria para generar un quelante marcado con ion metálico;

(b) conjugar el quelante marcado con ion metálico a un ligando de afinidad específica; y

(c) eliminar uno o más grupos protectores del conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica.

Ciertas realizaciones de la presente invención contemplan un método para sintetizar un quelante protegido que comprende:

(a) obtener un quelante de la fórmula siguiente:



en donde el quelante es etilendicisteína (EC), y en donde los dos grupos tiol y los dos grupos amina de la etilendicisteína están protegidos; es decir, en donde:

-A y D son, cada uno, un tiol protegido;

-B y C son, cada uno, una amina terciaria;

-E y F son, cada uno, -COOH;

-R₁, R₂, R₃ y R₄ son, cada uno, H;

-X es -CH₂-CH₂-; y

(b) proteger el -COOH, -NH₂, o el tiol mediante un agente protector de ácido carboxílico, un agente protector de amina o un agente protector de tiol, respectivamente.

Como para cualquier método sintético de la presente invención, el método puede llevarse a cabo en un medio orgánico. El quelante protegido puede ser etilendicisteína protegida. El método puede también comprender una etapa de purificación, una etapa de quelación que comprende la quelación de un ion metálico, la eliminación de al menos un grupo protector, o cualquier combinación de estas etapas. (De hecho, cualquier método descrito en la presente memoria puede comprender una etapa de purificación, una etapa de quelación que comprende la quelación de un ion metálico, la eliminación de al menos un grupo protector, o cualquier combinación de estas etapas.) En este o en cualquier método descrito en la presente memoria, el quelante protegido puede ser de aproximadamente 80 % a aproximadamente 99,9 % de pureza. Por ejemplo, el quelante protegido puede ser de aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % de pureza. En este o cualquier método descrito en la presente memoria que comprende un quelante con la estructura de núcleo mostrada anteriormente, cuando A y D son, cada uno, -NH₂, ni B ni C pueden ser una amina secundaria o terciaria.

El conjugado puede ser de entre aproximadamente 80 % y aproximadamente 99,9 % de pureza. El conjugado puede ser de entre aproximadamente 90 % y aproximadamente 99,9 % de pureza. El conjugado se puede definir además como un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica. El conjugado puede definirse además como ^{99m}Tc-EC-glucosamina, ¹⁸⁶Re-EC-glucosamina o ¹⁸⁷Re-EC-glucosamina.

Un "ligando de afinidad específica" se define en la presente memoria como una molécula o parte de una molécula que se une con especificidad a otra molécula. El experto en la técnica estará familiarizado con los numerosos agentes que pueden emplearse como ligandos de afinidad específica en el contexto de la presente invención. El ligando de afinidad específica puede ser cualquier molécula tal conocida por los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de ligandos de afinidad específica incluyen un ligando específico de tejido, un antimicrobiano, un fungicida o un agente para diagnóstico por imágenes.

Según la presente invención, el ligando de afinidad específica usado en el método de síntesis de un conjugado quelante-ligando de afinidad específica es un agente que simula la glucosa. Entre los ejemplos no limitativos de agentes que simulan la glucosa se incluyen la desoxiglucosa, glucosamina, glucosamina tetraacetilada, neomicina, kanamicina, gentamicina, paromicina, amikacina, tobramicina, netilmicina, ribostamicina, sisomicina, micromicina, lividomicina, dibekacina, isepamicina, astromicina o aminoglucósido. En realizaciones concretas, el agente que simula la glucosa es glucosamina.

Las realizaciones adicionales se refieren a un compuesto para uso en un método de diagnóstico, o tratamiento de un sujeto, en donde el compuesto es un conjugado entre un quelante y un agente que simula la glucosa, en donde el agente que simula la glucosa comprende glucosamina o desoxiglucosa y en donde el quelante y el agente que simula la glucosa están conjugados a través de un enlace amida o un enlace éster, en donde el compuesto se puede obtener mediante el método de la reivindicación 1 o 3 (con etapas (b) y (d)), en donde el conjugado se marca con un ion metálico seleccionado de ^{99m}Tc , ^{68}Ga , ^{188}Re , platino y ^{187}Re , y en donde la pureza del conjugado está entre aproximadamente 70 % (p/p) y aproximadamente 99,9 % (p/p), y en donde la enfermedad que se pretende diagnosticar, o tratar, es un infarto de miocardio, isquemia miocárdica, una insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía, una enfermedad valvular cardíaca, una arritmia o angina de pecho. En ciertas realizaciones, el quelante marcado con ion metálico está entre aproximadamente 90 % y aproximadamente 99,9 % de pureza. En ciertas realizaciones, el conjugado del quelante marcado con ion metálico está entre aproximadamente 80 % y aproximadamente 99,9 % de pureza. En ciertas realizaciones, el conjugado del quelante marcado con ion metálico está entre aproximadamente 70 % y aproximadamente 99,9 % de pureza. El conjugado del quelante marcado con ion metálico comprende etilendicisteína. El ion metálico, por ejemplo, puede ser cualquiera de los iones metálicos indicados anteriormente.

El sujeto puede ser cualquier sujeto, tal como un mamífero o modelos animales usados para evaluar la presencia de enfermedad cardiovascular. El mamífero, por ejemplo, puede ser un ser humano o un miembro de la especie mono. Los modelos animales incluyen perros, gatos, ratas, ratones o conejos. En realizaciones preferidas, el sujeto es un humano con enfermedad cardiovascular conocida o sospechada.

El sujeto, por ejemplo, puede ser un paciente que se presenta a un clínico con signos o síntomas que sugieren isquemia miocárdica o infarto de miocardio. El diagnóstico por imágenes del corazón del sujeto para diagnosticar enfermedad puede implicar administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica sintetizado usando cualquiera de los métodos expuestos en la presente memoria. El diagnóstico por imágenes se puede realizar utilizando cualquier modalidad de diagnóstico por imágenes conocida por los expertos en la técnica. En realizaciones concretas, el diagnóstico por imágenes implica el uso de tecnología de diagnóstico por imágenes con radionúclidos, tal como PET o SPECT. En realizaciones concretas, el conjugado radionúclido marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica es $^{99m}\text{Tc-EC-glucosamina}$. La glucosamina no es absorbida activamente por el tejido miocárdico viable, sino más bien es la diana específica para las regiones de isquemia. La gravedad de la isquemia puede evaluarse visualmente o clasificarse en función de la magnitud de la señal que se mide utilizando cualquier método conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el diagnóstico por imágenes usando cualquiera de los conjugados indicados en la presente memoria se realiza antes, durante o después del diagnóstico por imágenes del corazón mediante un segundo agente de diagnóstico por imágenes. Por ejemplo, el segundo agente de diagnóstico por imágenes puede ser talio detectado mediante escintigrafía que definiría la región de perfusión miocárdica normal (tejido no isquémico).

La SPECT de la perfusión miocárdica (MPS) consiste en una combinación de una modalidad de esfuerzo (ejercicio o farmacológico) con administración en descanso y en esfuerzo y diagnóstico por imágenes de radioproductos farmacéuticos. El talio tiene excelentes propiedades fisiológicas para el diagnóstico por imágenes de la perfusión miocárdica. Al extraerse a un alto nivel durante el primer paso a través de la circulación coronaria, se ha demostrado una relación lineal entre flujo sanguíneo y miocardio viable y la absorción de talio se ha demostrado durante el ejercicio; sin embargo, a niveles de flujo muy altos, se produce una "caída" de la absorción. Como análogo de potasio no unido, el talio se redistribuye con el tiempo. Su distribución inicial es proporcional a la perfusión miocárdica regional y en equilibrio, la distribución de talio es proporcional a la reserva de potasio regional, lo que refleja un miocardio viable. Los mecanismos de redistribución del talio son velocidades de lavado diferenciales entre las zonas normales y de miocardio con hipoperfusión pero viables y la entrada a las zonas con hipoperfusión inicial. La velocidad de lavado del talio es el gradiente de concentración entre la célula miocárdica y la sangre. Después del descanso o la inyección de ejercicio de bajo nivel, hay una eliminación del talio de la sangre más lenta. En pacientes normales que no alcanzan los niveles adecuados de esfuerzo se pueden observar velocidades de lavado lentas difusas, que simulan la isquemia difusa. Los estados hiperinsulinémicos ralentizan la redistribución, lo que conduce a una subestimación del miocardio viable; por tanto, se recomienda el ayuno antes de, y durante 4 horas después de, la inyección de talio. Esta es la razón por la que si se usa EC-G como un agente viable en combinación con talio, este se dirigirá al área exacta de interés, que sería el área isquémica pero viable (véase Angello *et al.*, 1987; Gutman *et al.*, 1983; Pohost *et al.*, 1977).

El diagnóstico por imágenes usando cualquiera de los conjugados quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica también puede realizarse en conjunción con otros métodos diagnósticos, tales como la medición de isoenzimas cardíacas o la cateterización cardíaca. El diagnóstico por imágenes puede realizarse en diversos intervalos después del inicio de los síntomas o puede realizarse para evaluar los cambios de perfusión miocárdica con el tiempo.

Las realizaciones adicionales se refieren a un método de diagnóstico por imágenes del corazón de un sujeto al que se ha administrado un compuesto, en donde el compuesto es un conjugado entre un quelante y un agente que simula la glucosa, en donde el agente que simula la glucosa comprende glucosamina o desoxiglucosa y en donde el quelante y el agente que simula la glucosa se conjugan a través de un enlace amida o un enlace éster, en donde el compuesto puede obtenerse mediante el método de la reivindicación 1 o 3 (con etapas (b) y (d)), en donde el conjugado se marca

con un ion metálico seleccionado de ^{99m}Tc , ^{68}Ga , ^{188}Re , platino y ^{187}Re , y en donde la pureza del conjugado se encuentra entre aproximadamente 70 % (p/p) y aproximadamente 99,9 % (p/p), en particular en donde la pureza del conjugado se encuentra entre aproximadamente 80 % (p/p) y aproximadamente 99,9 % (p/p) o entre aproximadamente 90 % (p/p) y aproximadamente 99,9 % (p/p), y la detección de una señal del conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica ubicado en el corazón. En ciertas realizaciones, el conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica es entre aproximadamente 90 % y aproximadamente 99,9 % puro. El conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica comprende etilendicisteína.

La señal puede detectarse por cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de dichos métodos incluyen PET, PET/CT, CT, SPECT, SPECT/CT, MRI, diagnóstico por imágenes ópticas y ultrasonidos.

El sujeto puede ser cualquier sujeto, tal como un mamífero o una especie aviar. En realizaciones concretas, el mamífero es un humano. El sitio del que se va a diagnosticar por imágenes es el corazón.

En algunas realizaciones, el método de diagnóstico por imágenes además comprende realizar uno o más procedimientos de diagnóstico o diagnóstico por imágenes adicionales para evaluar una enfermedad del sujeto. En otras realizaciones, el método de diagnóstico por imágenes se define además como un método de realizar diagnóstico por imágenes y terapia dual.

En ciertas realizaciones, la enfermedad que se pretende tratar es una enfermedad cardiovascular seleccionada de infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardiopatía, enfermedad valvular cardíaca, arritmia y angina de pecho.

Se contempla que cualquier realización comentada en esta memoria descriptiva puede implementarse con respecto a cualquier método o compuesto para uso de la invención, y *viceversa*.

Como se utiliza en la presente memoria, “medio orgánico” se refiere a soluciones (*p. ej.*, soluciones de reacción) y métodos de purificación que comprenden uno o más disolventes orgánicos (también denominados “disolventes” en la presente memoria). Las opciones de disolventes para los métodos de la presente invención resultarán conocidas para un experto en la técnica. Las opciones de disolventes pueden depender, por ejemplo, de cuál o cuáles facilitarán la solubilización de todos los reactivos o, por ejemplo, de cuál o cuáles facilitarán más la reacción deseada (particularmente, si el mecanismo de reacción es conocido). Los disolventes pueden incluir, por ejemplo, disolventes polares y disolventes no polares. Las opciones de disolventes incluyen, aunque no de forma limitativa, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dioxano, metanol, etanol, hexano, cloruro de metileno y acetonitrilo. En algunas realizaciones preferidas, los disolventes incluyen etanol, dimetilformamida y dioxano. Se puede elegir más de un disolvente para cualquier reacción o procedimiento purificación concreto. El agua (es decir, un componente acuoso) también puede mezclarse en cualquier elección de disolvente; el agua se añade habitualmente para facilitar la solubilización de todos los reactivos. En determinadas realizaciones, el componente orgánico del medio orgánico, en volumen, es aproximadamente o al menos aproximadamente 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de disolvente orgánico en comparación con el componente acuoso.

El término “conjugado” y “conjugado” se definen en la presente memoria como una unión química dentro de la misma molécula. Por ejemplo, dos o más moléculas y/o átomos pueden estar conjugados juntos mediante un enlace covalente, formando una única molécula. Las dos moléculas pueden conjugarse entre sí a través de una conexión directa (*p. ej.*, donde los compuestos están unidos directamente mediante un enlace covalente) o los compuestos pueden conjugarse a través de una conexión indirecta (*p. ej.*, donde los dos compuestos están unidos covalentemente a uno o más conectores, formando una única molécula). En otros casos, un átomo de metal se puede conjugar a una molécula por medio de una interacción de quelación.

El término “grupo funcional” generalmente se refiere a cómo los expertos en la técnica clasifican los grupos químicamente reactivos. Los ejemplos no limitativos de grupos funcionales incluyen enlaces carbono-carbono (incluidos enlaces sencillos, dobles y triples), grupos hidroxilo (o alcohol), amina, sulfhidrilo (o tiol), amida, éter, éster, tioéter, tioéster, ácido carboxílico y carbonilo. Como se utiliza en la presente memoria, “amina” y “amino” y otros pares similares de palabras tales como “hidroxi” e “hidroxilo” se refieren al mismo resto funcional y, por lo tanto, se usan indistintamente. Como se utiliza en la presente memoria, “amina” puede referirse tanto a $-\text{NH}_2$ como a $-\text{NH}-$.

Como se utiliza en la presente memoria, “quelato” puede usarse como un nombre o un verbo. Como un nombre, “quelato” se refiere a uno o más átomos que son capaces de quelar uno o más iones metálicos, o son quelantes a uno o más iones metálicos. En realizaciones preferidas, solamente un ion metálico se coordina a un quelato. Un ejemplo no limitativo de “quelato” incluye “un quelato de N_2S_2 ”: esto significa que dos átomos de nitrógeno y dos átomos de azufre de un quelante son a) capaces de quelar a uno o más iones metálicos o b) están coordinados a (o quelados a) uno o más iones metálicos (preferiblemente solo un ion metálico). Como verbo, “quelar” se refiere al proceso de coordinación o quelación de un ion metálico a, por ejemplo, un quelante o un conjugado quelante-ligando de afinidad específica.

Como se utiliza en la presente memoria, un “quelante no conjugado” se refiere a un quelante que no está conjugado a un ligando de afinidad específica.

Como se utiliza en la presente memoria, un “quelante desprotegido” se refiere a un quelante que no comprende ningún grupo protector.

5 Como se utiliza en la presente memoria, un “quelante protegido” se refiere a un quelante que comprende al menos un grupo protector.

Como se utiliza en la presente memoria, un “ligando de afinidad específica desprotegido” se refiere a un ligando de afinidad específica que no comprende ningún grupo protector.

10 Como se utiliza en la presente memoria, un “ligando de afinidad específica protegido” se refiere a un ligando de afinidad específica que comprende al menos un grupo protector.

15 El término “nucleófilo” o “nucleofílico” se refiere, generalmente, a átomos que tienen uno o más pares iónicos de electrones. Dichos términos son bien conocidos en la técnica e incluyen -NH₂, tiolato, carbanión y alcoholato (también conocido como hidroxilo).

20 El término “electrófilo” o “electrófilo” generalmente se refiere a especies que reaccionan con nucleófilos. Los grupos electrófilos habitualmente tienen una carga positiva parcial. Dicho término es bien conocido en la técnica e incluye el carbono de un carbono unido a un grupo saliente tal como un halógeno, sulfonilo o un grupo amino cuaternario.

25 El término “grupo saliente” generalmente se refiere a grupos que pueden ser fácilmente desplazables por un nucleófilo, tal como una amina y alcohol o un nucleófilo de tiol. Dichos grupos salientes son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, carboxilatos, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxibenzotriazol, halógeno (haluros), triflatos, tosilatos, mesilatos, alcoxi, tioalcoxi, sulfonilos y similares.

30 Como se utiliza en la presente memoria, “alquilo” o “alqu” se refiere a una cadena hidrocarbonada o de carbono-carbono lineal, ramificada o cíclica, que opcionalmente incluye una unión alqueno o alquino, que contiene 1-30 carbonos. “Alquilo inferior” se refiere a radicales alquilo que comprenden 1-4 carbonos. Los ejemplos no limitativos de alquilos inferiores son el metilo, etilo, propilo, butilo e isopropilo. “Alquilo sustituido” se refiere a un radical alquilo sustituido con al menos un átomo conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, pueden seleccionarse uno o más sustituyentes del grupo que consisten en hidrógeno, halógeno, oxo (*p.ej.*, éter), hidroxilo, alcoxi, sililoxi, cicloalquilo, acilo, arilo, acetilo, carbonilo, tiocarbonilo, ciano, azido, amido, aminocarbonilo, amino, -NH-alquilo, -N(alquilo)₂, -NH-cicloalquilo, -N-(cicloalquilo)₂, -NH-arilo, -N(arilo)₂, trialkilsililoxi, aciloxi, acilamino, bis-acilamino, éster, NO, NO₂ y sulfo (*p. ej.*, tioéter, tioéster, sulfonamido, sulfonilo).

35 El término “arilo” se refiere a un grupo aromático carbocíclico, que incluye, aunque no de forma limitativa, aquellos seleccionados del grupo que consisten en fenilo, naftilo, indenilo, indanilo, azulenilo, fluorenilo y antraceno; o bien un grupo aromático heterocíclico que incluye, aunque no de forma limitativa, los seleccionados del grupo que consisten en furilo, furanilo, tienilo, piridilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazol, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, tritiano, indolizino, indolilo, isoindolilo, indolinilo, tiofenilo, indazolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo, purinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, innolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, pteridinilo, carbazolilo, acridinilo, fenazinilo, fenotiazonilo, fenoxazinilo y cualquier combinación o derivado de uno o más de estos grupos.

40 Los grupos “arilo”, como se definen en esta solicitud, pueden contener independientemente uno o más grupos funcionales como sustituyentes. En determinadas realizaciones, los sustituyentes pueden seleccionarse del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, halógeno, oxo (*p. ej.*, éter), hidroxilo, alcoxi, sililoxi, cicloalquilo, acilo, arilo, acetilo, carbonilo, tiocarbonilo, ciano, amido, aminocarbonilo, amino, -NH-alquilo, -N(alquilo)₂, -NH-cicloalquilo, -N(cicloalquilo)₂, -NH-arilo, -N(arilo)₂, trialkilsililoxi, aciloxi, acilamino, bis-acilamino, éster, NO, NO₂ y sulfo (*p. ej.*, tioéter, tioéster, sulfonamido, sulfonilo). Además, cualquiera de estos sustituyentes puede sustituirse adicionalmente con sustituyentes como se acaba de describir.

45 Como se utiliza en la presente memoria, el término “cicloalquilo” se refiere a carbociclos o heterociclos de tres o más átomos, cuyos átomos del anillo pueden sustituirse opcionalmente con C, S, O o N, y cuyos átomos del anillo pueden comprender uno o más grupos funcionales como sustituyentes. En algunas realizaciones, los sustituyentes pueden seleccionarse del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, halógeno, oxo (*p. ej.*, éter), hidroxilo, alcoxi, sililoxi, cicloalquilo, acilo, arilo, acetilo, carbonilo, tiocarbonilo, ciano, azido, amido, aminocarbonilo, amino, -NH-alquilo, -N(alquilo)₂, -NH-cicloalquilo, -N(cicloalquilo)₂, -NH-arilo, -N(arilo)₂, trialkilsililoxi, aciloxi, acilamino, bis-acilamino, éster, NO, NO₂ y sulfo (*p. ej.*, tioéter, tioéster, sulfonamido, sulfonilo).

50 El término “aminoácido” se refiere a cualquiera de los aminoácidos naturales, así como análogos sintéticos (*p. ej.*, D-estereoisómeros de los aminoácidos naturales, tales como D-treonina) y derivados de los mismos. Los α-aminoácidos comprenden un átomo de carbono al que está unido un grupo amino, un grupo carboxilo, un átomo de hidrógeno y un grupo distintivo conocido como “cadena lateral”. Los aminoácidos que comprenden un grupo metileno adicional en su cadena principal se denominan frecuentemente β-aminoácidos. Las cadenas laterales de aminoácidos naturales son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, hidrógeno (*p. ej.*, como en glicina),

alquilo (*p. ej.*, como en alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina), alquilo sustituido (*p. ej.*, como en la treonina, serina, metionina, cisteína, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, arginina y lisina), arilalquilo (*p. ej.*, como en fenilalanina y triptófano), arilalquilo sustituido (*p. ej.*, como en tirosina) y heteroarilalquilo (*p. ej.*, como en histidina). Los aminoácidos no naturales también se conocen en la técnica, como se expone en, por ejemplo, Williams (1989); Evans y col. (1990); Pu *et al.* (1991); Williams *et al.* (1991), y todas las referencias citadas en ellos. La presente invención también incluye las cadenas laterales de aminoácidos no naturales.

Los términos “amina primaria”, “amina secundaria” y “amina terciaria” se refieren a aminas, como derivados de amoniaco (NH_3), en los cuales uno (primaria), dos (secundaria) o tres (terciaria) de los hidrógenos se han sustituido por carbono, en donde dicho carbono puede estar unido a cualquier otro átomo. En determinadas realizaciones, dicho carbono (C) está comprendido en X de la fórmula mostrada anteriormente, un grupo hidrocarbonado (*p. ej.*, $-\text{CH}_2-$), $-\text{CH}(\text{E})(\text{CHAR}_1\text{R}_2)$, $-\text{CH}(\text{F})(\text{CHDR}_3\text{R}_4)$ o un grupo $-\text{C}(\text{O})-$, en donde A, D, E, F, X, R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son como se define en la presente memoria.

Los compuestos, tal como se describen en la presente memoria, pueden contener uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, pueden presentarse como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, mezclas diastereoméricas y diastereómeros individuales. Todos los estereoisómeros posibles de todos los compuestos descritos en la presente memoria, salvo que se indique lo contrario, se consideran dentro del alcance de la presente invención. Los centros quirales de los compuestos pueden tener la configuración S- o R-, como definen las recomendaciones de la IUPAC de 1974. La presente invención pretende abarcar todas estas formas isoméricas.

La invención reivindicada también pretende abarcar las sales de cualquiera de los compuestos sintetizados. El término “sal(es)”, como se utiliza en la presente memoria, se entiende como sales ácidas y/o básicas formadas con ácidos y bases orgánicos y/o inorgánicos. Los zwitteriones (sales internas o interiores) se entiende que están incluidos en el término “sal(es)” como se utiliza en la presente memoria, ya que son sales de amonio cuaternario, tales como sales de alquilamonio. Se prefieren las sales no tóxicas y farmacéuticamente aceptables, como se describe a continuación, aunque pueden ser útiles otras sales, como por ejemplo, en etapas de aislamiento o purificación.

Los ejemplos no limitativos de sales de adición ácidas incluyen, aunque no de forma limitativa, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, oxalato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato.

Los ejemplos no limitativos de sales básicas se incluyen, aunque no de forma limitativa, sales de amonio; sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, litio y potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio; sales que comprenden bases orgánicas tales como aminas (*p. ej.*, dicitclohexilamina, alquilaminas tales como *t*-butilamina y *t*-amilamina, alquilaminas sustituidas, arilalquilaminas tales como bencilamina, dialquilaminas, dialquilaminas sustituidas tales como N-metilglucamina (especialmente N-metil D-glucamina), trialquilaminas y trialquilaminas sustituidas), y sales que comprenden aminoácidos como la arginina, lisina, etc. Los grupos que contienen nitrógeno básicos pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior (*p. ej.*, cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo), sulfatos de dialquilo (*p. ej.* sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo), haluros de cadena larga (*p. ej.*, cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo), haluros de arilalquilo (*p. ej.* bromuros de bencilo y fenetilo) y otros conocidos en la técnica.

El uso de la palabra “uno” o “una” cuando se usa junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno”, y “uno o más de uno”.

A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente del error para el dispositivo, el método empleado para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio. Por ejemplo, “aproximadamente” puede estar comprendido en 10 %, preferiblemente, comprendido en 5 %, más preferiblemente comprendido en 1 % y lo más preferiblemente comprendido en 0,5 %.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para indicar “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas solamente o las alternativas se excluyen mutuamente, aunque la descripción admite una definición que se refiere solamente a alternativas e “y/o”.

Como se utiliza en esta memoria descriptiva y la o las reivindicaciones, las palabras “comprender” (y cualquier forma de comprender, tal como “comprende” y “comprenden”), “tener” (y cualquier forma de tener, tal como “tiene” y “tienen”), “incluir” (y cualquier forma de incluir, tal como “incluye” e “incluyen”) o “contener” (y cualquier forma de contener, como “contiene” y “contienen”) son inclusivas o abiertas y no excluyen etapas de métodos o elementos no mencionados o adicionales.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se aportan únicamente a modo ilustrativo.

5 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede comprender mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en la presente memoria.

Fig. 1. Ejemplo no limitativo de una síntesis orgánica de la etilendicisteína-glucosamina (EC-G).

Fig. 2. Ejemplo no limitativo de una síntesis orgánica de renio-etilendicisteína-glucosamina (Re-EC-G).

Fig. 3. Ensayo de incorporación de [³H]timidina usando Re-EC-G y una línea celular de linfoma.

Fig. 4. Comparación de la absorción celular de EC-G en forma cruda o en forma purificada por HPCL preparativa.

Fig. 5. Espectrometría de masa de EC-G.

Fig. 6. Radio-TLC (cromatografía en capa fina) de ⁶⁸Ga-EC-G. (a) ⁶⁸Ga-EC-G, sintetizada mediante medio orgánico; (b) ⁶⁸Ga-EC-G, sintetizada mediante medio acuoso; (c) ⁶⁸Ga libre.

Fig. 7. Radio-HPLC analítica de ⁶⁸Ga-EC-G. (a) Detección UV; (b) Detección de NaI.

Figs. 8A y 8B. Estabilidad de ⁶⁸Ga-EC-G en suero de perro como se muestra por medio de radio-TLC. (a) ⁶⁸Ga-EC-G (0,7 mg/0,7 ml, pH 7,5, 32 MBq (865 μCi)); (b) 100 μl ⁶⁸Ga-EC-G en 100 μl de suero de perro, tiempo = 0; (c) tiempo = 30 min; (d) tiempo = 60 min; (e) tiempo = 120 min; (f) ⁶⁸Ga-EC-BSA.

Fig. 9. Estabilidad de ⁶⁸Ga-EC-G en suero de perro, según se analizó en un ensayo de unión de proteínas.

Fig. 10. Estudio de absorción *in vitro* de compuestos marcados con ⁶⁸Ga en la línea celular 13762 del cáncer de mama.

Fig. 11. Imágenes planares del derivado ^{99m}Tc-EC-ESMOLOL (11 MBq/rata (300 μCi/rata)) en ratas con tumores de mama. H/UM = relaciones de densidad de recuento corazón/mediastino superior (recuentos/píxel) a 15-45 minutos.

Fig. 12. Diagnóstico por imágenes PET con ⁶⁸Ga-EC-TML en un conejo blanco de Nueva Zelanda.

Fig. 13. Ejemplo no limitativo de una síntesis orgánica de la etilendicisteína-glucosamina (EC-G).

Descripción de las realizaciones ilustrativas

Los presentes inventores han identificado métodos sintéticos novedosos para la preparación de conjugados quelante-ligando de afinidad específica quelados opcionalmente a uno o más iones metálicos. La presente invención proporciona además síntesis de quelantes, tales como quelantes no conjugados, quelantes protegidos (es decir, quelantes en donde uno o más grupos funcionales se protegen usando un agente protector) y quelantes marcados con ion metálico (es decir, quelantes que están quelados a uno o más iones metálicos). Estos métodos sintéticos comprenden, generalmente, el uso de disolventes orgánicos y procedimientos sintéticos orgánicos, así como métodos de purificación. También se proporcionan métodos basados en la química húmeda (acuosa). Los compuestos resultantes de dichos métodos de química orgánica son de alta pureza, especialmente cuando se comparan con los compuestos preparados mediante química húmeda. El quelante utilizado en la presente invención es la etilendicisteína. Los iones metálicos quelados a compuestos pueden hacer que el compuesto además sea útil para el diagnóstico por imágenes, el diagnóstico o el uso terapéutico. Los compuestos, métodos de su síntesis y uso se describen más detalladamente a continuación.

A. Quelante

Los expertos en la técnica estarán familiarizados con los compuestos capaces de quelar uno o más iones metálicos ("quelantes"). Los quelantes empleados en el método de la presente invención comprenden generalmente uno o más átomos capaces de quelarse a uno o más iones metálicos. Por lo general, un quelante se quela a un ion metálico.

La quelación de un ion metálico a un quelante puede ser mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los métodos de quelación (también denominados coordinación) se describen con mayor detalle a continuación. Los átomos disponibles para la quelación son conocidos por los expertos en la técnica, y comprenden de forma típica O, N o S. En realizaciones preferidas, los átomos disponibles para la quelación se seleccionan del grupo que consiste en N y S. En determinadas realizaciones preferidas, el ion metálico se quela a un grupo de átomos,

denominados en la presente memoria como “quelatos” seleccionados del grupo que consiste en NS₂, N₂S, S₄, N₂S₂, N₃S y NS₃. La quelación también puede producirse entre el quelante y el ligando de afinidad específica, *es decir*, tanto el quelante como el ligando de afinidad específica pueden aportar átomos que quelan el mismo ion metálico.

5 En ciertas realizaciones, el quelante comprende compuestos que incorporan uno o más aminoácidos. Los aminoácidos se seleccionarán, habitualmente, del grupo que consiste en cisteína y glicina. Por ejemplo, el quelante puede comprender tres cisteínas y una glicina o tres glicinas y una cisteína. Según se describe a continuación, un espaciador puede conectar un aminoácido con otro.

10 Los expertos en la técnica saben que los quelantes, en general, comprenden una variedad de grupos funcionales. Los ejemplos no limitativos de estos grupos funcionales incluyen hidroxilo, tiol, amina, amido y ácido carboxílico.

1. Ácidos dicarboxílicos de bis-aminoetanotiol (BAT)

15 La etilendicisteína (EC), el quelante usado en la presente invención, es un ácido dicarboxílico bis-aminoetanotiol (BAT). Los ácidos dicarboxílicos BAT son capaces de actuar como ligandos tetradentados, y también se conocen como compuestos de diaminoditiol (DADT). Se sabe que estos compuestos forman complejos Tc(V)O estables sobre la base de la unión eficaz del grupo oxotecnecio a dos azufres del tiol y dos nitrógenos de la amina. El éster dietílico marcado con ^{99m}Tc (^{99m}Tc-L,L-ECD) es conocido como agente cerebral. La ^{99m}Tc-L,L-etilendicisteína (^{99m}Tc-L,L-EC) es el metabolito
20 más polar y se descubrió que se excretaba de forma rápida y eficaz por la orina. Así, ^{99m}Tc-L,L-EC se ha usado como agente de la función renal. (Verbruggen *et al.* 1992). Otros metales tales como indio, renio, galio, cobre, holmio, platino, gadolinio, lutecio, itrio, cobalto, calcio y arsénico se pueden quelar, también a ácidos dicarboxílicos tales como EC.

2. Espaciadores

25 La etilendicisteína (EC), el quelante usado en la presente invención, une dos aminoácidos por medio de un espaciador. Dichos espaciadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos espaciadores, en general, proporcionan flexibilidad adicional al compuesto global que puede facilitar la quelación de uno o más iones metálicos al quelante.

30 B. Grupos protectores

Cuando una reacción química se va a llevar a cabo selectivamente en un sitio reactivo de un compuesto multifuncional, a menudo se deben bloquear de forma temporal otros sitios reactivos. Un “grupo protector”, como se utiliza en la presente memoria, se define como un grupo usado para el propósito de este bloqueo temporal. Por
35 lo tanto, la función de un grupo protector es proteger uno o más grupos funcionales (*p. ej.*, -NH₂, -SH, -COOH) durante las reacciones posteriores que no avanzarían correctamente, bien porque el grupo funcional libre (en otras palabras, desprotegido) reaccionaría y se funcionalizaría de un modo inconsistente con su necesidad de estar libre para reacciones posteriores, o bien porque el grupo funcional exento interferiría en la reacción. Los expertos en la técnica reconocen que el uso de grupos protectores es habitual en la química orgánica sintética.

40 Durante la síntesis de los compuestos, varios grupos funcionales deben protegerse usando agentes protectores en diversas etapas de la síntesis. Un “agente protector” se usa para instalar el grupo protector. Por tanto, en un procedimiento habitual, se mezcla un agente protector con un compuesto que presenta un grupo funcional que se va a proteger, y el agente protector forma un enlace covalente con ese grupo funcional. De esta manera, el grupo
45 funcional está “protegido” por un grupo protector (y se vuelve eficazmente no reactivo) por el enlace covalente que formó con el agente protector. Se pueden proteger múltiples grupos funcionales en una o más etapas usando agentes protectores adecuadamente seleccionados. Los expertos en la técnica comprenderán dicha selección adecuada. Dicha selección se basa, frecuentemente, en la reactividad variable de los grupos funcionales que se protegerán: por lo tanto, habitualmente se protegen los grupos más reactivos (tales como azufre/tiol) antes de
50 proteger los grupos menos reactivos (tales como la amina).

Hay varios métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para lograr dicha etapa. Para proteger los agentes, su reactividad, instalación y uso, véase, *p. ej.*, Greene y Wuts (1999). El mismo grupo protector se puede
55 usar para proteger uno o más de los mismos o distintos grupos funcionales. A continuación, se describen ejemplos no limitativos de la instalación de grupos protectores.

El uso de la frase “hidroxi protegido” o “amina protegida” y similares no significa que todos dichos grupos
60 funcionales disponibles para ser protegidos estén protegidos. De igual modo, un “quelante protegido”, como se utiliza en la presente memoria, no implica que todos los grupos funcionales del quelante estén protegidos.

Los compuestos utilizados y fabricados durante la puesta en práctica del método de la presente invención están contemplados en la forma protegida y desprotegida (o “libre”). Los expertos en la técnica comprenderán que los
65 grupos funcionales necesarios para una transformación deseada deben estar desprotegidos.

Cuando ya no se necesita un grupo protector, se elimina por métodos bien conocidos por los expertos en la
técnica. Para obtener información sobre agentes desprotectores y su uso, véase, *p. ej.*, Greene y Wuts (1999).

Los agentes utilizados para eliminar el grupo protector se denominan, habitualmente, agentes desprotectores. Los grupos protectores son habitualmente fácilmente extraíbles (como es conocido los expertos en la técnica) mediante métodos que emplean agentes desprotectores que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los grupos protectores éster de acetato y carbamato pueden eliminarse fácilmente usando condiciones básicas o ácidas suaves, aunque los grupos protectores bencilo y éster de benzoilo necesitan condiciones básicas o ácidas mucho más fuertes. Es bien sabido que ciertos agentes desprotectores eliminan algunos grupos protectores y no otros, mientras que otros agentes desprotectores eliminan varios tipos de grupos protectores de varios tipos de grupos funcionales. Por ejemplo, las reacciones de reducción de Birch con amoniaco líquido y sodio (como se describe a continuación) desprotegen los grupos bencilo de los tioles (o azufre, más concretamente) o los grupos carbamato del nitrógeno, pero no los grupos acetato del oxígeno. Así, se puede usar un primer agente desprotector para eliminar un tipo de grupo protector, seguido del uso de un segundo agente desprotector para eliminar un segundo tipo de grupo protector, y así sucesivamente.

Los expertos en la técnica estarán familiarizados con el orden adecuado de eliminación de grupos protectores usando agentes desprotectores. Véase, *p. ej.*, Greene and Wuts (1999). A continuación, se describen ejemplos no limitativos de eliminación de grupos protectores.

Los grupos protectores de amina son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts (1999), capítulo 7. Estos grupos protectores pueden instalarse a través de agentes protectores bien conocidos por los expertos en la técnica. La eliminación de estos grupos también es bien conocida por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, el grupo protector de amina puede seleccionarse del grupo que consiste en *t*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, formilo, tritilo, acetilo, tricloroacetilo, dicloroacetilo, cloroacetilo, trifluoroacetilo, difluoroacetilo, fluoroacetilo, cloroformiato de bencilo, 4-fenilbenciloxicarbonilo, 2-metilbenciloxicarbonilo, 4-etoxibenciloxicarbonilo, 4-fluorobenciloxicarbonilo, 4-clorobenciloxicarbonilo, 3-clorobenciloxicarbonilo, 2-clorobenciloxicarbonilo, 2,4-diclorobenciloxicarbonilo, 4-bromobenciloxicarbonilo, 3-bromobenciloxicarbonilo, 4-nitrobenciloxicarbonilo, 4-cianobenciloxicarbonilo, 2-(4-xenil)isopropoxicarbonilo, 1,1-difenilet-1-iloxicarbonilo, 1,1-difenilprop-1-iloxicarbonilo, 2-fenilprop-2-iloxicarbonilo, 2-(*p*-toluil)prop-2-iloxicarbonilo, ciclopentaniloxicarbonilo, 1-metilciclopentaniloxicarbonilo, ciclohexaniloxicarbonilo, 1-metilciclohexaniloxicarbonilo, 2-metilciclohexaniloxicarbonilo, 2-(4-toluil)etoxicarbonilo, 2-(metilsulfonil)etoxicarbonilo, 2-(trifenilfosfino)etoxicarbonilo, fluorenilmetoxicarbonilo, 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 1-(trimetilsililmetil)prop-1-eniloxicarbonilo, 5-benzisoxalilmetoxicarbonilo, 4-acetoxibenciloxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, 2-etinil-2-propoxicarbonilo, ciclopropilmetoxicarbonilo, 4-(deciloxil)benciloxicarbonilo, isobromiloxicarbonilo, 1-piperidiloxicarbonilo y carbonato de 9-fluorenilmetilo.

En algunas realizaciones, el agente protector para la protección de amina se selecciona del grupo que consiste en cloroformiato de bencilo, formiato de *p*-nitro-clorobencilo, cloroformiato de etilo, dicarbonato de di-*tert*-butilo, cloruro de trifenilmetilo y cloruro de metoxitriphenilmetilo. En una realización preferida, el grupo protector es benciloxicarbonilo, instalado por el agente protector benciloxicloroformiato.

Los grupos protectores de tiol son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts (1999), Capítulo 6. Estos grupos protectores pueden instalarse a través de agentes protectores bien conocidos por los expertos en la técnica. La eliminación de estos grupos también es bien conocida por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, un grupo protector de tiol puede seleccionarse del grupo que consiste en acetamidometilo, benzamidometilo, 1-etoxietilo, benzoilo, trifenilmetilo, *t*-butilo, bencilo, adamantilo, cianoetilo, acetilo y trifluoroacetilo.

En algunas realizaciones, el agente protector para la protección del tiol se selecciona del grupo que consiste en un haluro de alquilo, un haluro de bencilo, un haluro de benzoilo, un haluro de sulfonilo, un haluro de trifenilmetilo, un haluro de metoxitriphenilmetilo y cisteína. Los ejemplos no limitativos de estos agentes protectores incluyen haluros de etilo, haluros de propilo y haluros de acetilo. Los haluros pueden comprender cloro, bromo o yodo, por ejemplo. En una realización preferida, el grupo protector es bencilo, instalado por el agente protector cloruro de bencilo.

Los grupos protectores de hidroxilo (o alcohol) son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts (1999), capítulo 2. Estos grupos protectores pueden instalarse a través de agentes protectores bien conocidos por los expertos en la técnica. La eliminación de estos grupos también es bien conocida por los expertos en la técnica.

Puede seleccionarse un grupo protector de hidroxilo del grupo que consiste en ésteres o éteres. Los ésteres, tales como los grupos acetato, benzoilo, *tert*-butilcarbonilo y trifluoroacetilo, pueden retirarse mediante condiciones ácidas o básicas. Los éteres, tales como metoxi, etoxi y tri-bencilmetilo pueden retirarse mediante condiciones básicas o ácidas más fuertes. Un grupo protector preferido es un éster de acetato.

Los grupos protectores de carbonilo son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts (1999), capítulo 4. Dichos grupos protectores pueden proteger, por ejemplo, cetonas o aldehídos, o bien el carbonilo presente en ésteres, amidas, ésteres y similares. Estos grupos protectores pueden instalarse a

través de agentes protectores bien conocidos por los expertos en la técnica. La eliminación de estos grupos también es bien conocida por los expertos en la técnica.

5 En algunas realizaciones, puede seleccionarse un grupo protector de carbonilo del grupo que consiste en dimetilacetal, dimetilcetal, diisopropilacetal, diisopropilcetal, enaminas y éteres de enol.

Los grupos protectores de ácido carboxílico son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts (1999), capítulo 5. La eliminación de estos grupos también es bien conocida por los expertos en la técnica.

10 Puede seleccionarse un grupo protector adecuado de ácido carboxílico del grupo que consiste en ésteres o amidas, por ejemplo. Las amidas, tales como la sulfonamida, para-nitroanilina, bencilamida y benzoliámina, se pueden hidrolizar en condiciones ácidas. Los ésteres tales como el éster metílico, éster etílico y éster bencílico pueden hidrolizarse mediante condiciones básicas o ácidas. Un grupo protector preferido es una amida.

15 C. Iones metálicos

Como se ha expuesto anteriormente, ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a composiciones que funcionarán para quelar uno o más iones metálicos. Los ligandos de afinidad específica también pueden participar en la quelación de uno o más iones metálicos. Un "ion metálico" se define en la presente memoria para referirse a un ion metálico que es capaz de formar un enlace, tal como un enlace no covalente, con uno o más átomos o moléculas. El o los otros átomos o moléculas pueden estar cargados negativamente.

25 Se contempla cualquier ion metálico conocido por los expertos en la técnica para su inclusión en las composiciones. El experto en la técnica estará familiarizado con los iones metálicos y su o sus aplicaciones. En algunas realizaciones, el ion metálico puede seleccionarse del grupo que consiste en Tc-99m, Cu-60, Cu-61, Cu-62, Cu-67, In-111, Tl-201, Ga-67, Ga-68, As-72, Re-186, Re-187, Re-188, Ho-166, Y-90, Sm-153, Sr-89, Gd-157, Bi-212, Bi-213, Fe-56, Mn-55, Lu-177, un ion hierro, un ion arsénico, un ion selenio, un ion talio, un ion manganeso, un ion cobalto, un ion platino, un ion renio, un ion calcio y un ion rodio. Por ejemplo, el ion metálico puede ser un radionúclido. Un radionúclido es un isótopo de origen artificial o natural que exhibe radioactividad.

30 En algunas realizaciones, el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ^{99m}Tc , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{148}Gd , ^{55}Fe , ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{45}Ti , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{67}Cu y ^{64}Cu . En realizaciones preferidas, el ion metálico es renio o un radionúclido tal como ^{99m}Tc , ^{188}Re o ^{68}Ga . Como se describe a continuación, un agente reductor puede que necesite acompañar a uno de los radionúclidos, tal como ^{99m}Tc . Los ejemplos no limitativos de dichos agentes reductores incluyen un ion ditionito, un ion estannoso y un ion ferroso.

35 Debido a las características de su mejor diagnóstico por imágenes y menor precio, se han realizado intentos de sustituir los compuestos marcados con ^{123}I , ^{131}I , ^{67}Ga y ^{111}In por los correspondientes compuestos marcados con ^{99m}Tc cuando sea posible. Debido a sus características físicas favorables, así como a su precio extremadamente bajo (0,007 \$/GBq (0,21 \$/mCi)), se ha preferido ^{99m}Tc para marcar los radioproductos farmacéuticos.

40 Se debe considerar una cantidad de factores para el diagnóstico por imágenes óptimo en seres humanos. Para maximizar la eficacia de detección, se prefiere un ion metálico que emita energía gamma en el intervalo de 100 a 200 keV. En la presente memoria, un "emisor gamma" se define como un agente que emite energía gamma de cualquier intervalo. El experto en la técnica estará familiarizado con los diversos iones metálicos que son emisores gamma. Para minimizar la dosis de radiación absorbida por el paciente, la semivida física del radionúclido debe ser tan corta como permita el procedimiento de diagnóstico por imágenes. Para permitir que se realicen exámenes en cualquier día y en cualquier momento del día, es ventajoso tener una fuente del radionúclido siempre disponible en el sitio clínico. ^{99m}Tc es un radionúclido preferido porque emite radiación gamma a 140 keV, tiene una semivida física de 6 horas, y está fácilmente disponible en las propias instalaciones mediante un generador de molibdeno-99/tecnecio-99m. El experto en la técnica estará familiarizado con métodos para determinar el diagnóstico por imágenes óptimo en humanos.

55 En ciertas realizaciones concretas de la presente invención, el ion metálico es un ion metálico terapéutico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ion metálico es un radionúclido terapéutico que es un emisor beta. Según se define en la presente memoria, un emisor beta es cualquier agente que emite energía beta de cualquier intervalo. Los ejemplos de emisores beta incluyen Re-188, Re-187, Re-186, Ho-166, Y-90, Bi-212, Bi-213 y Sn-153. Los emisores beta, además, pueden o no ser emisores gamma. El experto en la técnica estará familiarizado con el uso de emisores beta en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, tales como el cáncer.

60 En realizaciones adicionales, el ion metálico es un ion metálico terapéutico que no es un emisor beta o un emisor gamma. Por ejemplo, el ion metálico terapéutico puede ser platino, cobalto, cobre, arsénico, selenio, calcio o talio. Las composiciones que incluyen estos iones metálicos terapéuticos pueden aplicarse en métodos dirigidos al tratamiento de enfermedades tales como las enfermedades hiperproliferativas, la enfermedad cardiovascular, infecciones e inflamación. Los ejemplos de enfermedades hiperproliferativas incluyen los cánceres. Los métodos para realizar una terapia dual de quimioterapia y radiación que implica las composiciones se comentan con más detalle a continuación.

65

D. Ligandos de afinidad específica

Un "ligando de afinidad específica" se define en la presente memoria como una molécula o parte de una molécula que se une con especificidad a otra molécula. Según la presente invención, el ligando de afinidad específica es un agente que simula la glucosa.

Un solo ligando de afinidad específica, o más de un ligando de afinidad específica, pueden conjugarse a un quelante. En estas realizaciones, cualquier cantidad de ligandos de afinidad específica puede conjugarse a los quelantes expuestos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, un conjugado puede comprender un único ligando de afinidad específica. En otras realizaciones, un conjugado puede comprender solo dos ligandos de afinidad específica. En otras realizaciones, un ligando de afinidad específica puede comprender tres o más ligandos de afinidad específica. En cualquier situación en la que un conjugado comprende dos o más ligandos de afinidad específica, los ligandos de afinidad específica pueden ser iguales o diferentes.

Los ligandos de afinidad específica pueden estar unidos al quelante de cualquier manera, incluidos, por ejemplo, enlaces covalentes, enlaces iónicos y enlaces de hidrógeno. Por ejemplo, el ligando de afinidad específica puede estar unido al quelante en un enlace amida, un enlace éster, o un enlace carbono-carbono de cualquier longitud. Si dos o más ligandos de afinidad específica se unen a un quelante, los modos de unión pueden ser iguales o diferentes. En otras realizaciones, la unión comprende un conector. Los ejemplos no limitativos de dichos conectores incluyen péptidos, ácido glutámico, ácido aspártico, bromoetilacetato, etilendiamina, lisina y cualquier combinación de uno o más de estos grupos. Un experto en la técnica estará familiarizado con la química de estos agentes y los métodos para conjugar estos agentes como ligandos a los agentes quelantes de la invención reivindicada. Los métodos de síntesis de los compuestos, incluidos los modos de conjugación, se tratan en detalle más adelante.

La información correspondiente a ligandos de afinidad específica y conjugación con compuestos se proporciona en la patente US 6.692.724, n.º de serie de solicitud de patente US 09/599.152, n.º de serie de solicitud de patente US 10/627.763, n.º de serie de solicitud de patente US 10/672.142, n.º de serie de solicitud de patente US 10/703.405 y n.º de serie de solicitud de patente US 10/732.919.

Agentes que simulan la glucosa

Se contempla la inclusión de agentes que simulan la glucosa como ligandos de afinidad específica. Dichos agentes también pueden considerarse "análogos de glucosa" o "derivados de glucosa".

Los organismos vivos usan la glucosa a través de la ruta de glicólisis. Los compuestos tales como la neomicina, kanamicina, gentamicina, amikacina, tobramicina, netilmicina, ribostamicina, sisomicina, micromicina, lividomicina, dibekacina, isepamicina y astromicina pertenecen a un grupo denominado aminoglucósidos.

En términos de estructura, los agentes que simulan la glucosa, habitualmente, tienen una estructura de anillo de glucosa. Sin embargo, existen algunas excepciones, tales como la puromicina, que tiene una estructura de anillo de pentosa, pero que aún puede considerarse un agente que simula la glucosa.

En términos de función, los aminoglucósidos se usan como antibióticos que bloquean la ruta de glicólisis por su propiedad de ser estructuralmente similares a la glucosa y, por lo tanto, se consideran funcionalmente agentes que simulan la glucosa. Cuando estos aminoglucósidos se usan en estudios de diagnóstico por imágenes, no hay efectos farmacológicos detectables.

La palabra "simular", como define el American Heritage Dictionary en su cuarta edición, significa "simular o asemejarse estrechamente". Los aminoglucósidos se usan funcionalmente a través de la ruta glicolítica en virtud de su similitud estructural con la glucosa y bloquean la ruta de la glicólisis. Por lo tanto, se considera que los aminoglucósidos imitan o simulan la glucosa de manera estructural y funcional.

Los ejemplos no limitativos de estructuras químicas con su número CID identificador de la base de datos PubChem (NCBI) son los siguientes: Amikacina CID 37768; aminoglucósido CID 191574; astromicina CID 65345; desoxiglucosa CID 439268; D-glucosamina CID 441477; dibekacina CID 3021; gentamicina CID 3467; glucosa CID 5793; isepamicina CID 456297; kanamicina CID 5460349; lividomicina CID 72394; micromicina CID 107677; neomicina CID 504578; netilmicina CID 441306; puromicina CID 439530; ribostamicina CID 33042; sisomicina CID 36119, y tobramicina CID 36294.

Las referencias que describen el bloqueo de la glucólisis mediante aminoglucósidos incluyen, por ejemplo, Tachibana *et al.*, 1976; Borodina *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 1996; Hoelscher *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004; Michalik *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1997; Diamond *et al.*, 1978; Hostetler y Hall, 1982; Benveniste y Davies, 1973; Hu, 1998; Yanai *et al.*, 2006; Myszka *et al.*, 2003; Nakae y Nakae, 1982; Ozmen *et al.*, 2005, y Tod *et al.*, 2000.

Los agentes preferidos que simulan la glucosa, o azúcares, incluyen la neomicina, kanamicina, gentamicina, paromicina, amikacina, tobramicina, netilmicina, ribostamicina, sisomicina, micromicina, lividomicina, dibekacina, isepamicina, astromicina y glucosa de aminoglucósidos y glucosamina.

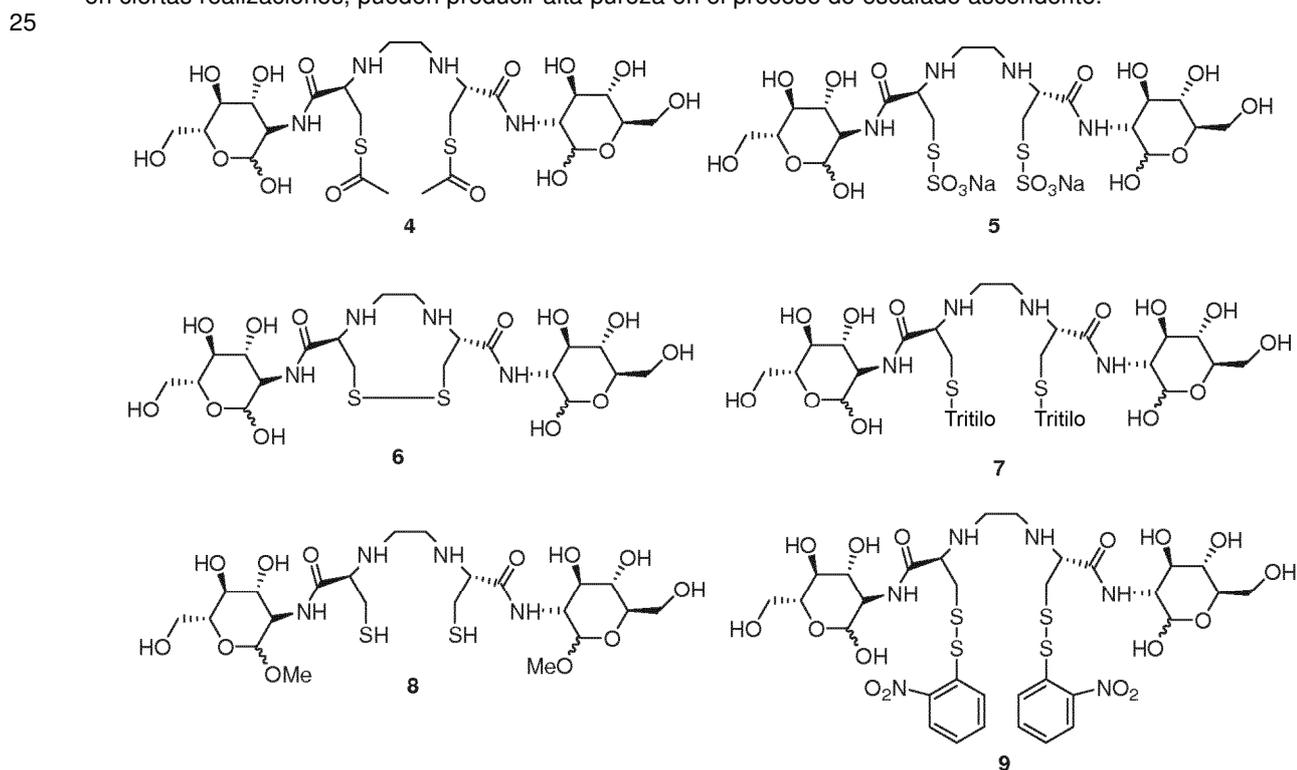
E. Métodos de síntesis

1. Fuente de reactivos para las composiciones

5 Los reactivos para la preparación de las composiciones pueden obtenerse de cualquier fuente. Una amplia variedad de fuentes son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los reactivos pueden obtenerse de fuentes comerciales, tales como Sigma Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), de síntesis química o de fuentes naturales. Por ejemplo, un proveedor de radionúclidos es Cambridge Isotope Laboratories (Andover, Ma). Los reactivos pueden aislarse y purificarse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, como se describe en la presente memoria. Los iones metálicos libres no unidos pueden eliminarse con, por ejemplo, resina de intercambio iónico o añadiendo un transquelante (p. ej., glucoheptonato, gluconato, gluclarato o acetilacetato).

2. Uso de un producto intermedio como el ingrediente farmacéutico activo (IFA)

15 La formación de disulfuro y el ataque nucleofílico del centro anomérico en el resto de glucosamina de ciertos compuestos pueden ser problemáticos. Estas reacciones no deseadas pueden producirse en los grupos tiol y/o los grupos amino de la EC-glucosamina (EC-G): estas son las reacciones laterales principales que pueden causar la inestabilidad de la EC-G. Además, el rendimiento habitualmente bajo de la etapa de desprotección con Na/NH₃ para obtener el producto primario de EC-G puede producir una pureza baja (véanse las Figs. 1 y 13). En consecuencia, puede ser deseable utilizar productos intermedios de síntesis de la presente invención como ingredientes farmacéuticos activos (IFA). Por ejemplo, los análogos de EC-G, tales como los que se muestran a continuación, que son productos intermedios en ciertas preparaciones, pueden usarse como IFA. Estos análogos, en ciertas realizaciones, pueden producir alta pureza en el proceso de escalado ascendente.



3. Procedimientos de purificación y determinaciones de pureza

30 Como se mencionó anteriormente, los expertos en la técnica conocerán métodos para purificar compuestos. Como se utiliza en la presente memoria, "purificación" se refiere a cualquier incremento medible en la pureza con respecto a la pureza del material antes de la purificación. Generalmente, es posible la purificación de todos los compuestos, incluida la purificación de productos intermedios, así como la purificación de los productos finales. La etapa de purificación no siempre se incluye en las metodologías generales explicadas más adelante, pero un experto en la técnica entenderá que los compuestos, por lo general, pueden purificarse en cualquier etapa. Los ejemplos de métodos de purificación incluyen filtración en gel, la cromatografía de exclusión por tamaño (también llamada cromatografía por filtración en gel, cromatografía por permeación en gel o exclusión molecular), diálisis, destilación, recristalización, sublimación, derivatización, electroforesis, cromatografía en columna de gel de sílice y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que incluye HPLC de fase normal y HPLC de fase reversa. En ciertas realizaciones, la cromatografía de exclusión por tamaño y/o diálisis se excluyen específicamente como formas de purificación de compuestos. La

40

purificación de compuestos mediante cromatografía en columna de gel de sílice o HPLC, por ejemplo, ofrece el beneficio de producir los compuestos deseados con una pureza muy alta, frecuentemente mayor que cuando los compuestos se purifican por medio de otros métodos. También se puede determinar la pureza radioquímica de los compuestos. Los métodos para determinar la pureza radioquímica son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos cromatográficos en conjunción con métodos de detección de radioactividad (*p. ej.*, análisis autorradiográfico). A continuación, se proporcionan ejemplos de comparaciones de la pureza de compuestos fabricados mediante diversas metodologías orgánicas y húmedas y purificados por diversos métodos.

Los métodos para determinar la pureza de los compuestos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, en ejemplos no limitativos, autorradiografía, espectroscopía de masas, determinación del punto de fusión, análisis ultravioleta, análisis colorimétrico, (HPLC), cromatografía en capa fina y análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) (que incluye, aunque no de forma limitativa, RMN 1H y 13C). En algunas realizaciones, podría usarse un método colorimétrico para valorar la pureza de un quelante o un conjugado quelante-ligando de afinidad específica. Por ejemplo, la generación de un aducto tiol-bencilo (es decir, un grupo funcional tiol protegido por un grupo bencilo) o el rendimiento de una reacción de oxidación usando yodo podría usarse para determinar la pureza del quelante o el conjugado quelante-ligando de afinidad específica. En una realización, la pureza de un compuesto desconocido puede determinarse comparándolo con un compuesto de pureza conocida: esta comparación puede tener la forma de una proporción cuya medición describe la pureza del compuesto desconocido. El Software disponible en diversos instrumentos (*p. ej.*, espectrofotómetros, de HPLC, RMN) puede ayudar a un experto en la técnica a realizar estas determinaciones, así como otros medios conocidos por los expertos en la técnica.

Los siguientes parámetros no limitativos pueden usarse en ciertas realizaciones, para determinar la pureza de los compuestos:

Columna: Primesep100, 4,6 x 150 mm, 5 μm , temperatura ambiente

Fase móvil (A): H₂O con TFA a 0,025 %

Fase móvil (B): acetonitrilo con TFA a 0,025 %

Ciclo isocrático: A/B (50/50) a 1,0 cm³/min (1,0 ml/min)

Detección: ELSD, SEDEX75, 50C, 0,45 MPa (4,5 bares)

En ciertas realizaciones de la presente invención, la purificación de un compuesto no elimina todas las impurezas. En algunas realizaciones, dichas impurezas se pueden identificar.

4. Obtención de un quelante

Los métodos de preparar y obtener quelantes son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los quelantes pueden obtenerse de fuentes comerciales, síntesis química o fuentes naturales.

En una realización, el quelante puede comprender etilendicisteína (EC). La preparación de la etilendicisteína (EC) se describe en la patente US 6.692.724. En resumen, la EC se puede preparar en una síntesis de dos etapas según los métodos descritos anteriormente (Ratner and Clarke, 1937; Blondeau et al., 1967). Se sintetizó el precursor, ácido L-tiazolidina-4-carboxílico y, después, se preparó la EC. Con frecuencia, también es importante incluir un antioxidante en la composición para evitar la oxidación de la etilendicisteína. El antioxidante preferido para uso de forma conjunta con la presente invención es la vitamina C (ácido ascórbico). Sin embargo, se contempla que también pueden ser útiles otros antioxidantes, tales como tocoferol, piridoxina, tiamina o rutina.

Los quelantes también pueden comprender aminoácidos unidos entre sí por espaciadores. Dicho espaciador puede comprender, como se describió anteriormente, un espaciador de alquilo, tal como el etileno.

Los enlaces amida también pueden unir uno o más aminoácidos entre sí para formar un quelante. Los ejemplos de métodos sintéticos para la preparación de dichos quelantes incluyen la síntesis en fase sólida y la síntesis en fase de solución. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en Bodansky, 1993 y Grant, 1992.

5. Síntesis orgánica de conjugados quelante-ligando de afinidad específica

En una realización preferida, la presente invención proporciona además un método de sintetización orgánica de conjugados quelante-ligando de afinidad específica. El método incluye obtener, por ejemplo, un quelante tal como etilendicisteína (EC) como se describió anteriormente y mezclar la EC con un grupo protector de tiol en un medio orgánico con el fin de proteger ambos tioles libres, lo que resulta en una EC S-S'-bis-protegida, que posteriormente se mezcla con un grupo protector de amino en un medio acuoso/orgánico con el fin de proteger ambas aminas libres, lo que resulta en una EC S-S'-bis-protegida-N,N'-bis-protegida. Los grupos tiol son más reactivos que los grupos nitrógeno; por lo tanto, los grupos tiol habitualmente se protegen primero. Como se ha descrito anteriormente, los expertos en la técnica estarán

familiarizadas con el orden adecuado de instalación de grupos protectores dependiendo de los tipos de grupos funcionales presentes en el quelante. Después, la EC protegida se conjuga a un ligando de afinidad específica de cualquier tipo descrito en la presente memoria a través de cualquier modo de conjugación descrito en la presente memoria, seguida de retirada de los grupos protectores de tiol y amina, lo que resulta en un conjugado quelante-ligando de afinidad específica.

En ciertas realizaciones, la conjugación entre un quelante y un ligando de afinidad específica tiene lugar en una etapa. En realizaciones concretas, la conjugación comprende una unión covalente de un quelante en un ligando de afinidad específica, en donde la unión covalente se produce en una etapa. Como se mencionó anteriormente, dichos procedimientos en una etapa son preferibles, ya que minimizan el tiempo, los reactivos, los residuos y la pérdida de producto.

Los conjugados quelante-ligando de afinidad específica sintetizados por este método pueden quelarse a continuación a un ion metálico de cualquier tipo descrito en la presente memoria. Dichos métodos de quelación son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen en la presente memoria. Los ejemplos de métodos de quelación de iones metálicos a conjugados quelante-ligando de afinidad específica se describen, por ejemplo, en la patente US 6.692.724. Los métodos descritos en la presente memoria, en donde un ion metálico se quela a un quelante, también pueden servir como ejemplos de cómo quelar un ion metálico a un conjugado quelante-ligando de afinidad específica.

Los beneficios de sintetizar conjugados quelante-ligando de afinidad específica a través de los métodos de la presente invención usando síntesis orgánica incluyen, por ejemplo, la obtención de conjugados de alta pureza con respecto a los conjugados obtenidos mediante síntesis acuosa, así como la síntesis y purificación eficaces de compuestos de molécula pequeña (*p. ej.*, 1000 g/mol o menos). Estos beneficios permiten que los conjugados se puedan utilizar en el diagnóstico por imágenes, el diagnóstico y/o experimentos terapéuticos y/o ensayos clínicos.

6. Síntesis orgánica de conjugados quelante-ligando de afinidad específica quelados con un ion metálico

En otra realización preferida, la presente invención proporciona además un método de sintetizar orgánicamente conjugados quelante-ligando de afinidad específica quelados a un ion metálico para el diagnóstico por imágenes, el diagnóstico o el uso terapéutico. El método incluye, por ejemplo, obtener en primer lugar un quelante, tal como EC. La EC puede entonces mezclarse con un ion metálico, que puede ser un radionúclido o cualquier otro ion metálico como se describe en la presente memoria, en un medio orgánico para quelar a la CE a través un quelato de N_2S_2 . Véase, *p. ej.*, la Fig. 2. En la presente memoria se describen otros métodos de quelación (*p. ej.*, quelatos de cualquier combinación de O, N y S) y la quelación puede producirse mediante cualquier método descrito en la presente memoria. En los ejemplos no limitativos, metales tales como tecnecio, indio, renio, galio, cobre, holmio, platino, gadolinio, lutecio, itrio, cobalto, calcio y arsénico se pueden quelar con un quelante tal como EC. El quelado de EC a un ion metálico ("EC quelada") se mezcla entonces con un ligando de afinidad específica, opcionalmente protegido con uno o más grupos protectores, en presencia de un medio orgánico con el fin de generar un conjugado quelante-ligando de afinidad específica quelado a un ion metálico. El modo de conjugación puede ser mediante cualquier modo descrito en la presente memoria y puede tener lugar en una etapa o en más de una etapa.

Los beneficios de sintetizar conjugados quelantes marcados con ion metálico-ligando de afinidad específica a través de los métodos de la presente invención usando síntesis orgánica incluyen, por ejemplo, la obtención de conjugados de alta pureza con respecto a los conjugados obtenidos mediante síntesis acuosa, así como la síntesis y purificación eficaces de compuestos de molécula pequeña (*p. ej.*, 1000 g/mol o menos). Estos beneficios permiten que los conjugados se puedan utilizar en el diagnóstico por imágenes, el diagnóstico y/o experimentos terapéuticos y/o ensayos clínicos.

7. Síntesis acuosa de conjugados quelante-ligando de afinidad específica

La presente invención proporciona además un método de sintetizar conjugados quelante-ligando de afinidad específica en un medio acuoso. Los conjugados quelante-ligando de afinidad específica se prepararon, en general, como un medio para comparar la pureza relativa de dichos productos u otros similares cuando se sintetizan en medios orgánicos. El método incluye, por ejemplo, obtener en primer lugar un quelante, tal como EC. A continuación, se disuelve la EC en una solución acuosa básica y se añaden agentes de acoplamiento de cualquier tipo descrito en la presente memoria. A continuación, se añade el ligando de afinidad específica a esta solución para generar el conjugado quelante-ligando de afinidad específica.

8. Síntesis acuosa de conjugados quelante-ligando de afinidad específica quelados a un ion metálico

La presente invención proporciona además un método de sintetizar, en un medio acuoso, conjugados quelante-ligando de afinidad específica quelados a un ion metálico. Al igual que la síntesis acuosa mencionada anteriormente, los conjugados quelante-ligando de afinidad específica quelados a un ion metálico se prepararon como un medio para comparar la pureza relativa de dichos productos u otros similares cuando se sintetizan en medios orgánicos. El método comienza, en una realización, con la obtención de un quelante quelado a un ion metálico como se describió anteriormente ("Síntesis orgánica de conjugados quelante-ligando de afinidad específica quelados a un ion metálico"). Este quelante quelado a un ion metálico puede ser, por ejemplo, EC quelada como se describió anteriormente. La quelación puede producirse mediante cualquier método descrito en la presente memoria. La EC quelada se puede disolver en una solución acuosa básica y los agentes de acoplamiento, como se describe en la

presente memoria, se añaden junto con un ligando de afinidad específica de cualquier tipo descrito en la presente memoria, con el fin de generar un conjugado quelante-ligando de afinidad específica quelado a un ion metálico.

9. Conjugación de un quelante con un ligando de afinidad específica

La presente invención contempla métodos de conjugación de un ligando de afinidad específica a un quelante (opcionalmente quelado a un ion metálico). El ligando de afinidad específica puede ser de cualquier tipo descrito en la presente memoria. Un experto en la técnica estará familiarizado con el medio de conjugación de ligandos de afinidad específica a varios grupos funcionales. Más comúnmente, como entre el quelante y el ligando de afinidad específica uno actúa como el nucleófilo y otro actúa como el electrófilo, dicha conjugación tiene lugar mediante un enlace covalente. Los ejemplos no limitativos de dichos enlaces covalentes incluyen un enlace amida, un enlace éster, un enlace tioéster y un enlace carbono-carbono. En realizaciones preferidas, la conjugación tiene lugar mediante un enlace amida o éster. En algunas realizaciones, la conjugación tiene lugar en uno o más grupos funcionales del quelante seleccionado del grupo que consiste en ácido carboxílico, amina y tiol. Cuando actúan como electrófilos, los quelantes y ligandos de localización específica pueden comprender grupos funcionales tales como halógenos y sulfonilos, que actúan como grupos salientes durante la conjugación. Los ligandos de afinidad específica también pueden comprender grupos nucleofílicos, tales como -NH₂, que pueden participar en conjugación con un quelante electrofílico.

Los agentes de acoplamiento, como se utilizan en la presente memoria, son reactivos utilizados para facilitar el acoplamiento de un quelante a un ligando de afinidad específica. Dichos agentes son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden emplearse en ciertas realizaciones de métodos de la presente invención. Los ejemplos de agentes de acoplamiento incluyen, aunque no de forma limitativa, N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), dimetilaminopiridina (DMAP), diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno (DBU), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) y dicitclohexilcarbodiimida (DCC). También se contemplan otras carbodiimidias como agentes de acoplamiento. Los agentes de acoplamiento se describen, por ejemplo, en Bodansky, 1993 y Grant, 1992. Estos agentes de acoplamiento se pueden usar solos o en combinación entre ellos o con otros agentes para facilitar la conjugación. Una vez que el ligando de afinidad específica se conjuga usando un agente de acoplamiento, habitualmente se forma urea. El subproducto urea puede eliminarse mediante filtración. El producto conjugado se puede purificar a continuación mediante, por ejemplo, cromatografía en columna de gel de sílice o HPLC.

En general, los ligandos para uso en conjunción con la presente invención poseerán grupos funcionales capaces de conjugarse a uno o más grupos funcionales de un quelante, tal como EC. Por ejemplo, un ligando de afinidad específica puede poseer una posición halogenada que reaccionará con una amina libre de un quelante para formar el conjugado. Si no hay grupos funcionales disponibles, o si un grupo funcional óptimo no está disponible, un ligando deseado puede seguir conjugándose a un quelante, tal como EC, mediante la adición de un conector, tal como etilendiamina, aminopropanol, dietilentriamina, ácido aspártico, ácido poliaspártico, ácido glutámico, ácido poliglutámico, cisteína, glicina o lisina. Por ejemplo, la patente US-6.737.247 describe varios conectores que pueden utilizarse con la presente invención. La patente US-5.605.672 describe varias "cadenas principales preferidas" que pueden usarse como conectores en la presente invención. En ciertas realizaciones, el quelante puede conjugarse a un conector y el conector conjugarse al ligando de afinidad específica. En otras realizaciones se puede usar más de un conector; por ejemplo, un quelante puede conjugarse a un conector, y el conector conjugarse a un segundo conector, en donde el segundo conector se conjuga al ligando de afinidad específica. En ciertas realizaciones, pueden usarse dos, tres, cuatro o más conectores que se conjugan juntos para conjugar un quelante y un ligando de afinidad específica. Sin embargo, generalmente se prefiere utilizar un solo conector para conjugar un quelante y un ligando de afinidad específica.

Algunos agentes quelantes, tales como EC, son solubles en agua. En algunas realizaciones, el conjugado quelante-ligando de afinidad específica quelado a un ion metálico de la invención es soluble en agua. Muchos de los ligandos de afinidad específica utilizados en conjunción con la presente invención serán solubles en agua, o formarán un compuesto soluble en agua cuando se conjuguen al quelante. Si el ligando de afinidad específica no es soluble en agua, sin embargo, puede utilizarse un conector que aumente la solubilidad del ligando. Los conectores pueden unirse a, por ejemplo, un alcohol alifático o aromático, una amina, un péptido o un ácido carboxílico. Los conectores pueden ser, por ejemplo, poliaminoácidos (péptidos) o aminoácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico o lisina. En la Tabla 2 se muestran los conectores preferidos para grupos funcionales de fármacos específicos.

Los beneficios de sintetizar conjugados quelante-ligando de afinidad específica, opcionalmente quelados a uno o más iones metálicos valentes a través de los métodos de la presente invención usando síntesis orgánica incluyen, por ejemplo, la obtención de conjugados de alta pureza con respecto a los conjugados obtenidos mediante síntesis acuosa, así como la síntesis y purificación eficaces de compuestos de molécula pequeña (*p. ej.*, 1000 g/mol o menos). Estos beneficios permiten que los conjugados se puedan utilizar en el diagnóstico por imágenes, el diagnóstico y/o experimentos terapéuticos y/o ensayos clínicos.

Tabla 2

Conectores

| Grupo funcional de arrastre | Conector | Ejemplo |
|---|--|---|
| OH alifático o fenólico | EC-poli(ácido glutámico) (PM 750-15 000) o EC-poli(ácido aspártico) (PM 2000-15 000) o bromoetilacetato o EC-ácido glutámico o EC-ácido aspártico. | estradiol, topotecán, paclitaxel, raloxifeno etopósido |
| NH ₂ aromático o alifático o péptido | EC-poli(ácido glutámico) (PM 750-15 000) o EC-poli(ácido aspártico) (PM 2000-15 000) o EC-ácido glutámico (mono- o diéster) o EC-ácido aspártico. | doxorubicina, mitomicina C, endostatina, anexina V, LHRH, octreótido, VIP |
| Ácido carboxílico o péptido | Etilendiamina, lisina | metotrexato, ácido fólico |

5

10. Quelación de un ion metálico

La presente invención contempla además métodos para la quelación (también denominada coordinación) de uno o más iones metálicos a un quelante o un conjugado quelante-ligando de afinidad específica. Dichas etapas de quelación pueden tener lugar en medios orgánicos. En otras realizaciones, la quelación tiene lugar en medios acuosos. En ciertas realizaciones, el quelante y el ligando de afinidad específica pueden contribuir a la quelación del ion metálico. En realizaciones preferidas, el ion metálico está quelado únicamente al quelante. El ion metálico quelado puede unirse a través de, por ejemplo, un enlace iónico, un enlace covalente o un enlace covalente coordinado (también denominado un enlace dativo). Los métodos de dicha coordinación son bien conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, puede producirse la coordinación mezclando un ion metálico en una solución que contiene un quelante. En otra realización, puede producirse la coordinación mezclando un ion metálico en una solución que contiene un conjugado quelante-ligando de afinidad específica. En una realización, se produce la quelación al quelante, con o sin un ligando de afinidad específica, mediante un quelato N₂S₂ formado por el quelante, tal como etilendicisteína (EC). El quelante y el ligando de afinidad específica pueden protegerse mediante uno o más grupos protectores antes o después de la quelación con el ion metálico.

La quelación puede producirse en cualquier átomo o grupo funcional de un quelante o ligando de afinidad específica que esté disponible para la quelación. La quelación puede producirse, por ejemplo, en uno o más átomos de N, S, O o P. Los ejemplos no limitativos de grupos de quelación incluyen NS₂, N₂S, S₄, N₂S₂, N₃S y NS₃ y O₄. En realizaciones preferidas, un ion metálico se quela a tres o cuatro átomos. En algunas realizaciones, la quelación se produce entre uno o más grupos funcionales tiol, amina o ácido carboxílico. La quelación, en realizaciones concretas, puede ser a un resto de carboxilo de glutamato, aspartato, un análogo de glutamato o un análogo de aspartato. Estas realizaciones pueden incluir múltiples iones metálicos quelados a quelantes poli(glutamato) o poli(aspartato). En algunas realizaciones, la quelación del ion metálico es a un ligando de afinidad específica, tal como a grupos carboxilo de un ligando específico de tejido. En realizaciones preferidas, la quelación se produce entre uno o más grupos tiol y uno o más grupos amina del quelante.

En algunos ejemplos no limitativos, el ion metálico puede ser tecnecio, indio, renio, galio, cobre, holmio, platino, gadolinio, lutecio, itrio, cobalto, calcio, arsénico o cualquier isótopo de los mismos. Cualquier ion metálico descrito en la presente memoria puede quelarse a un compuesto de la presente invención.

6. Agentes reductores

Para los propósitos de la presente invención, cuando el ion metálico es tecnecio, se prefiere que el Tc esté en el estado de oxidación +4. El agente reductor preferido para uso con este propósito es el ion estannoso en forma de cloruro estannoso (SnCl₂) para reducir el Tc hasta su estado de oxidación +4. Sin embargo, se contempla que otros agentes reductores, tales como ion ditionato o ion ferroso, pueden ser útiles en conjunción con la presente invención. También se contempla que el agente reductor puede ser un agente reductor en fase sólida. La cantidad de agente reductor puede ser importante, ya que es necesario para evitar la formación de un coloide. Es preferible, por ejemplo, usar de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 µg de SnCl₂ para de aproximadamente 100 a aproximadamente 11 GBq (300 mCi) de pertecnetato de Tc. La cantidad más preferida es aproximadamente 0,1 mg de SnCl₂ para aproximadamente 7,4 GBq (200 mCi) de pertecnetato de Tc y aproximadamente 2 ml de solución salina. Por lo general, esto produce suficiente conjugado Tc-EC-ligando de afinidad específica para usar en 5 pacientes.

F. Ejemplos de modalidades de diagnóstico por imágenes

1. Diagnóstico por imágenes con cámara gamma

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de técnicas de medicina nuclear para el diagnóstico por imágenes. Cualquiera de estas técnicas se puede aplicar en el contexto de los métodos de diagnóstico por imágenes de la presente invención para medir una señal del indicador. Por ejemplo, el diagnóstico por imágenes con cámara

55

gamma se contempla como método de diagnóstico por imágenes que se puede utilizar para medir una señal derivada del indicador. Un experto en la técnica estará familiarizado con las técnicas de aplicación del diagnóstico por imágenes con cámara gamma (véase, *p. ej.*, Kundra *et al.*, 2002). En una realización, la medición de una señal puede implicar el uso del diagnóstico por imágenes con cámara gamma de un sistema indicador 111-In-octreótido-SSRT2A.

5

2. PET y SPECT

Las modalidades de diagnóstico por imágenes con radionúclidos (tomografía por emisión de positrones (PET); tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT)), son técnicas de diagnóstico por imágenes de secciones transversales que mapean la ubicación y concentración de radiotrazadores marcados con radionúclidos. A pesar de que la CT y la MRI proporcionan una considerable información anatómica sobre la ubicación y la magnitud de los tumores, estas modalidades de diagnóstico por imágenes no pueden diferenciar adecuadamente las lesiones invasivas del edema, la necrosis por radiación, puntuación o gliosis. Pueden usarse las modalidades PET y SPECT para localizar y caracterizar tumores midiendo la actividad metabólica.

15

Las modalidades PET y SPECT proporcionan información que se refiere a información a nivel celular, tal como viabilidad celular. En la PET, un paciente ingiere o se le inyecta una sustancia ligeramente radioactiva que emite positrones que se puede monitorizar a medida que la sustancia se mueve por el organismo. En una aplicación común, por ejemplo, se administra a los pacientes glucosa con emisores de positrones unidos, y se monitorizan sus cerebros mientras realizan varias tareas. Puesto que el cerebro utiliza glucosa cuando funciona, una imagen de PET muestra dónde la actividad cerebral es alta.

20

La tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT) está estrechamente relacionada con la PET. La diferencia principal entre las dos es que en lugar de una sustancia emisora de positrones, la SPECT usa un trazador radiactivo que emite fotones de baja energía. La SPECT es valiosa para diagnosticar enfermedades de la arteria coronaria, y ya se realizan cada año unos 2,5 millones de pruebas cardíacas con SPECT en los EE. UU.

25

Los radioproductos farmacéuticos PET para el diagnóstico por imágenes suelen marcarse con emisores de positrones tales como ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{82}Rb , ^{62}Cu y ^{68}Ga . Los radioproductos farmacéuticos SPECT suelen marcarse con emisores de positrones tales como ^{99m}Tc , ^{201}Tl y ^{67}Ga . Con respecto al diagnóstico por imágenes del cerebro, los radioproductos farmacéuticos PET y SPECT se clasifican en función de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB), la perfusión cerebral, el metabolismo de unión al receptor y la unión de antígeno-anticuerpo (Saha *et al.*, 1994). Los agentes SPECT de la barrera hematoencefálica, tales como $^{99m}\text{TcO}_4\text{-DTPA}$, ^{201}Tl y ^{67}Ga citrato, se excluyen por células normales del cerebro, pero entran en las células tumorales debido a la BBB alterada. Los agentes de perfusión SPECT tales como ^{123}I IMP, ^{99m}Tc HMPAO, ^{99m}Tc ECD son agentes lipofílicos y, por lo tanto, difunden al cerebro normal. Los radioproductos farmacéuticos SPECT de unión al receptor importantes incluyen ^{123}I QNE, ^{123}I IBZM y ^{123}I iomazenil. Estos trazadores se unen a receptores específicos y son de importancia en la evaluación de enfermedades relacionadas con los receptores.

30

35

3. Tomografía computarizada (CT)

40

La tomografía computarizada (CT) se contempla como una modalidad de diagnóstico por imágenes en el contexto de la presente invención. Tomando una serie de rayos x, en ocasiones más de mil, desde diversos ángulos y luego combinándolas con un ordenador, la CT hizo posible construir una imagen tridimensional de cualquier parte del organismo. Se programa un ordenador para que muestre dos cortes bidimensionales desde cualquier ángulo y a cualquier profundidad.

45

En la CT, la inyección intravenosa de un agente de contraste radiopaco puede ayudar a la identificación y delineación de masas de tejido blando cuando las exploraciones CT iniciales no son diagnósticas. De manera similar, los agentes de contraste ayudan a evaluar la vascularidad de un tejido blando o una lesión ósea. Por ejemplo, el uso de agentes de contraste puede ayudar a la delineación de la relación de un tumor y estructuras vasculares adyacentes.

50

Los agentes de contraste de CT incluyen, por ejemplo, medios de contraste yodados. Los ejemplos de estos agentes incluyen iotalamato, iohexol, diatrizoato, iopamidol, etiodol e iopanato. También se ha notificado la utilidad de agentes de gadolinio como agentes de contraste CT (véase, *p. ej.*, Henson *et al.*, 2004). Por ejemplo, se han utilizado como agente de contraste CT agentes de gadopentato (descrito en Strunk y Schild, 2004).

55

4. Diagnóstico por imágenes de resonancia magnética (MRI)

El diagnóstico por imágenes de resonancia magnética (MRI) es una modalidad de diagnóstico por imágenes más reciente que la CT que usa un imán de alta potencia y señales de radiofrecuencia para producir imágenes. La especie molecular más abundante en los tejidos biológicos es el agua. En última instancia, es el "espín" mecánico cuántico de los núcleos de protones del agua lo que genera la señal en los experimentos de diagnóstico por imágenes. En la MRI, la muestra de la que se debe tomar la imagen se coloca en un campo magnético estático fuerte (1-12 tesla) y los espines se excitan con un pulso de radiación de radiofrecuencia (RF) para producir una magnetización neta en la muestra. Diversos gradientes del campo magnético y otros pulsos de RF actúan entonces sobre los espines para

65

codificar la información espacial en las señales registradas. Recogiendo y analizando estas señales, es posible calcular una imagen tridimensional que, como una imagen de CT, se muestra normalmente en cortes bidimensionales.

5 Los agentes de contraste que se utilizan en el diagnóstico por imágenes de MR difieren de los usados en otras técnicas de diagnóstico por imágenes. Su propósito es ayudar a distinguir entre componentes de tejidos con características de señal idénticas y acortar los tiempos de relajación (que producirán una señal más fuerte en las imágenes de RM de eco de espín ponderadas en T1 y una señal menos intensa en las imágenes ponderadas en T2). Los ejemplos de agentes de contraste de MRI incluyen quelatos de gadolinio, quelatos de manganeso, quelatos de cromo y partículas de hierro.

10 Tanto la CT como la MRI proporcionan información anatómica que ayuda a distinguir los límites de los tejidos y la estructura vascular. En comparación con la CT, las desventajas de la MRI incluyen menor tolerancia del paciente, contraindicaciones para los marcapasos y otros dispositivos metálicos implantados, así como aparatos relacionados con múltiples causas, entre ellas el movimiento (Alberico *et al.*, 2004). La CT, por otra parte, es rápida, se tolera bien y es de fácil disponibilidad, pero tiene una resolución de contraste menor que la MRI y requiere contraste yodado y radiación ionizante (Alberico *et al.*, 2004). Una desventaja de la CT y la MRI es que ninguna de estas modalidades de diagnóstico por imágenes proporciona información funcional a nivel celular. Por ejemplo, ninguna modalidad proporciona información relativa a la viabilidad celular.

20 *5. Diagnóstico por imágenes ópticas*

El diagnóstico por imágenes ópticas es otra modalidad de diagnóstico por imágenes que ha ganado una amplia aceptación en áreas concretas de la medicina. Los ejemplos incluyen el marcado óptico de componentes celulares y la angiografía, tal como angiografía con fluoresceína y angiografía con verde de indocianina. Los ejemplos de agentes para diagnóstico por imágenes ópticas incluyen, por ejemplo, fluoresceína, un derivado de la fluoresceína, verde de indocianina, verde Oregón, un derivado del verde Oregón, verde de rodamina, un derivado de verde de rodamina, eosina, eritrosina, rojo Texas, un derivado de rojo Texas, verde malaquita, éster de sulfosuccinimidilo Nanogold, azul cascada, un derivado de cumarina, un naftaleno, un derivado de piridiloxazol, colorante amarillo cascada y colorante dapoxil.

30 *6. Ultrasonido*

Otra modalidad de diagnóstico por imágenes biomédico que ha ganado una amplia aceptación es el ultrasonido. El diagnóstico por imágenes mediante ultrasonido se ha utilizado de forma no invasiva para proporcionar imágenes de secciones transversales en tiempo real e incluso imágenes tridimensionales de estructuras de tejido blando, así como información del flujo sanguíneo en el organismo. Ondas de sonido de alta frecuencia y un ordenador para crear imágenes de vasos sanguíneos, tejidos y órganos.

Las imágenes por ultrasonido del flujo sanguíneo pueden estar limitadas por una serie de factores tales como el tamaño y la profundidad del vaso sanguíneo. Los agentes de contraste ultrasónicos, un desarrollo relativamente reciente, incluyen perfluorina y análogos de perfluorina, los cuales están diseñados para superar estas limitaciones ayudando a mejorar las imágenes en escala de grises y las señales Doppler.

40 *7. Procedimiento para el diagnóstico por imágenes dual*

Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a métodos de diagnóstico por imágenes de un sitio de un sujeto usando dos modalidades de diagnóstico por imágenes que implican la medición de una primera señal y una segunda señal a partir del complejo resto-quelante-ion metálico para el diagnóstico por imágenes. La primera señal deriva del ion metálico y la segunda señal deriva del resto para el diagnóstico por imágenes. Como se ha expuesto anteriormente, cualquier modalidad de diagnóstico por imágenes conocida por los expertos en la técnica puede aplicarse en estas realizaciones de los presentes métodos de diagnóstico por imágenes.

50 Las modalidades de diagnóstico por imágenes se realizan en cualquier momento durante o después de la administración de la composición que comprende la cantidad diagnósticamente eficaz de la composición de la presente invención. Por ejemplo, los estudios de diagnóstico por imágenes pueden realizarse durante la administración de la composición para diagnóstico por imágenes dual de la presente invención o en cualquier momento posterior. En algunas realizaciones, la primera modalidad de diagnóstico por imágenes se lleva a cabo al mismo tiempo que la administración del agente para diagnóstico por imágenes dual, o aproximadamente 1 segundo, 1 hora, 1 día o cualquier período de tiempo más largo tras la administración del agente para diagnóstico por imágenes dual, o en cualquier momento entre cualquiera de estos tiempos indicados.

60 La segunda modalidad de diagnóstico por imágenes se puede realizar simultáneamente a la primera modalidad de diagnóstico por imágenes, o en cualquier momento después de la primera modalidad de diagnóstico por imágenes. Por ejemplo, la segunda modalidad de diagnóstico por imágenes se puede llevar a cabo de aproximadamente 1 segundo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1 día, o cualquier período de tiempo más largo después de la finalización de la primera modalidad de diagnóstico por imágenes, o en cualquier momento entre cualquiera de estos tiempos indicados. En ciertas realizaciones de la presente invención, la primera y segunda modalidades de diagnóstico por imágenes se realizan simultáneamente, de tal manera que empiezan al mismo tiempo después de la

administración del agente. Un experto en la técnica estará familiarizado con la ejecución de las diversas modalidades de diagnóstico por imágenes contempladas por la presente invención.

5 En algunas realizaciones de los presentes métodos de diagnóstico por imágenes dual, se usa el mismo dispositivo de diagnóstico por imágenes para realizar una primera modalidad de diagnóstico por imágenes y una segunda modalidad de diagnóstico por imágenes. En otras realizaciones, se utiliza un dispositivo de diagnóstico por imágenes diferente para realizar la segunda modalidad de diagnóstico por imágenes. Un experto en la técnica estará familiarizado con los dispositivos de diagnóstico por imágenes disponibles para la ejecución de una primera modalidad de diagnóstico por imágenes y una segunda modalidad de diagnóstico por imágenes, y el experto en la técnica estará familiarizado con el uso de estos dispositivos para generar imágenes.

G. Agentes radiomarcados

15 Como se ha expuesto anteriormente, ciertas realizaciones de las composiciones de la presente invención incluyen un ion metálico quelado a un quelante como se ha expuesto anteriormente. En algunas realizaciones, el ion metálico es un radionúclido. Los agentes radiomarcados, compuestos y composiciones proporcionados por la presente invención se proporcionan con una cantidad adecuada de radiactividad. Por ejemplo, en la formación de complejos radiactivos de ^{99m}Tc, generalmente se prefiere formar complejos radiactivos en soluciones que contienen radioactividad en concentraciones de aproximadamente 0,0004 gigabecquerel (GBq) a aproximadamente 11 GBq por ml (de aproximadamente 0,01 milicurios (mCi) a aproximadamente 300 mCi por ml).

20 Los agentes para el diagnóstico por imágenes radiomarcados proporcionados por la presente invención pueden utilizarse para visualizar sitios en el organismo de un mamífero. De conformidad con esta invención, los agentes para diagnóstico por imágenes se administran mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la administración puede ser en una única dosis unitaria inyectable. Cualquiera de los vehículos habituales conocidos por los expertos en la técnica, tal como solución salina estéril o plasma, puede utilizarse después del radiomarcado para preparar los compuestos para inyección. Generalmente, una dosis unitaria para administrar tiene una radioactividad de aproximadamente 0,0004 GBq a aproximadamente 11 GBq (de aproximadamente de 0,01 mCi a aproximadamente 300 mCi), preferiblemente de 0,4 a aproximadamente 7,4 GBq (de 10 mCi a aproximadamente 200 mCi). La solución que se va a inyectar en dosis unitaria es de aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 10 ml.

25 Después de la administración intravenosa de una cantidad diagnósticamente eficaz de una composición de la presente invención, se puede realizar el diagnóstico por imágenes. El diagnóstico por imágenes de un sitio en un sujeto, tal como un órgano o tumor, puede tener lugar, si se desea, en horas o incluso más tiempo después de introducir el reactivo radiomarcado en un paciente. En la mayoría de los casos, se acumulará una cantidad suficiente de la dosis administrada en el área que se va a someter a diagnóstico por imágenes en aproximadamente 0,1 de una hora. Como se ha expuesto anteriormente, el diagnóstico por imágenes se puede realizar usando cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen PET, SPECT y escintigrafía gamma. En la escintigrafía gamma, el radiomarcador es un radionúclido emisor de radiación gamma y el radiotrazador se ubica usando una cámara de detección de radiación gamma. El sitio sometido a diagnóstico por imágenes se detecta porque el radiotrazador se elige para que se ubique en un sitio patológico (denominado contraste positivo) o, alternativamente, el radiotrazador se elige específicamente para que no se ubique en dichos sitios patológicos (denominado contraste negativo).

H. Kits

45 Por lo general, ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a kits para preparar un agente diagnóstico o para el diagnóstico por imágenes. Por ejemplo, en algunas realizaciones el kit incluye uno o más recipientes sellados que contienen una cantidad predeterminada de un conjugado quelante-ligando de afinidad específica. En algunas realizaciones, el kit incluye además un recipiente sellado que contiene un ion metálico. Por ejemplo, el ion metálico puede ser un radionúclido o un ion metálico frío.

50 Un kit de la presente invención puede incluir un vial sellado que contiene una cantidad predeterminada de un quelante de la presente invención y una cantidad suficiente de agente reductor para marcar el compuesto con un ion metálico. En algunas realizaciones de la presente invención, el kit incluye un ion metálico que es un radionúclido. En ciertas realizaciones adicionales, el radionúclido es ^{99m}Tc. En otras realizaciones de la presente invención, el quelante se conjuga a un ligando de afinidad específica que puede ser cualquiera de los ligandos de afinidad específica mencionados en cualquier otra parte de esta solicitud.

60 El kit también puede contener materiales adyuvantes farmacéuticos convencionales tales como, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la presión osmótica, tampones, conservantes y similares.

65 En ciertas realizaciones, se incluye un antioxidante en la composición para evitar la oxidación del resto quelante. En ciertas realizaciones, el antioxidante es vitamina C (ácido ascórbico). Sin embargo, se contempla que también puede usarse cualquier otro antioxidante conocido por los expertos en la técnica, tal como tocoferol, piridoxina, tiamina o rutina. Los componentes del kit pueden estar en forma líquida, congelada o seca. En una realización preferida, los componentes del kit se proporcionan en forma liofilizada.

El kit instantáneo frío (es decir, que no contiene radioactividad) se considera un producto comercial. El kit instantáneo frío podría servir para propósitos de radiodiagnóstico añadiendo pertecnetato al vial con IFA y agentes volumétricos (agentes que no se han sometido todavía a pruebas). Los expertos en la técnica conocen la tecnología como el método de “agitar y aplicar”. El tiempo de preparación de radioproductos farmacéuticos sería inferior a 15 min. El mismo kit también podría abarcar quelantes o conjugados quelante-ligando de afinidad específica que podrían quelarse con diferentes metales para diferentes aplicaciones de diagnóstico por imágenes. Por ejemplo, cobre-61 (3,3 horas de semivida) para PET; gadolinio para MRI. El propio kit de frío se podría utilizar para fines de profármacos para tratar la enfermedad. Por ejemplo, el kit podría aplicarse en el diagnóstico por imágenes y la terapia dirigida específicamente a tejidos.

I. Enfermedad hiperproliferativa

Ciertos aspectos de la presente invención se refieren a composiciones en donde un resto terapéutico se conjuga a un quelante de la presente invención. Cuando un ion metálico se quela a un quelante o a ambos, un quelante y su ligando de afinidad específica conjugado, la composición de la presente invención puede, en ciertas realizaciones, ser útil en el diagnóstico por imágenes dual y la terapia. En ciertas realizaciones concretas, el resto terapéutico es un resto que es un agente que se sabe o que se sospecha que beneficia al tratamiento o la prevención de enfermedad hiperproliferativa en un sujeto. El sujeto puede ser un animal, tal como un mamífero. En ciertas realizaciones concretas, el sujeto es un humano.

En otras realizaciones de la presente invención, el ion metálico es un ion metálico terapéutico (*p. ej.*, Re-188, Re-187, Re-186, Ho-166, Y-90, Sr-89 y Sm-153), y el quelato quelante-ion metálico es un agente que es un agente terapéutico (en lugar de un agente para diagnóstico por imágenes) que puede aplicarse en el tratamiento o la prevención de una enfermedad hiperproliferativa.

En la presente memoria, una enfermedad hiperproliferativa se define como cualquier enfermedad asociada a un crecimiento celular anómalo o a un recambio celular anómalo. Por ejemplo, la enfermedad hiperproliferativa puede ser cáncer. El término “cáncer”, como se utiliza en la presente memoria, se define como un crecimiento incontrolado y progresivo de células en un tejido. Un experto en la técnica sabe que existen otros términos sinónimos, tales como neoplasia, malignidad o tumor. Se contempla cualquier tipo de cáncer para el tratamiento mediante los métodos de la presente invención. Por ejemplo, el cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer de hígado, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de huesos, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer de testículo, linfoma o leucemia. En otras realizaciones de la presente invención, el cáncer es cáncer metastásico.

J. Terapia por quimioterapia y radiación dual (“radioquimioterapia”)

En ciertas realizaciones de la presente invención, las composiciones de la presente invención son adecuadas para la terapia por quimioterapia y radiación dual (radioquimioterapia). Por ejemplo, el quelante descrito en la presente memoria puede ser quelado a un ion metálico que es un ion metálico terapéutico, así como a un ligando de afinidad específica que es un resto terapéutico (tal como un resto anticancerígeno). Como otro ejemplo, un ion metálico terapéutico puede quelarse tanto a un quelante como a su conjugado de ligando de afinidad específica.

Por ejemplo, el ion metálico puede ser un emisor beta. Según se define en la presente memoria, un emisor beta es cualquier agente que emite energía beta de cualquier intervalo. Los ejemplos de emisores beta incluyen Re-188, Re-187, Re-186, Ho-166, Y-90 y Sn-153. Un experto en la técnica estará familiarizado con estos agentes para uso en el tratamiento de enfermedad hiperproliferativa, tal como cáncer.

Un experto en la técnica estará familiarizado con el diseño de protocolos quimioterapéuticos y protocolos de terapia de radiación que se pueden aplicar en la administración de los compuestos. Como se expone a continuación, estos agentes se pueden usar en combinación con otras modalidades terapéuticas dirigidas al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa, tal como cáncer. Además, un experto en la técnica estará familiarizado con la selección de una dosis adecuada para administración al sujeto. El protocolo puede involucrar una única dosis o múltiples dosis. Se supervisará la toxicidad y respuesta del paciente al tratamiento usando protocolos conocidos por los expertos en la técnica.

K. Preparaciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz de una composición de la presente invención. Las frases “farmacéutica o farmacológicamente aceptable” o “terapéuticamente eficaz” o “diagnósticamente eficaz” se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desfavorable cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un humano, según corresponda. La preparación de composiciones terapéuticamente eficaces o diagnósticamente eficaces será conocida por los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para administración a animales (*p. ej.*, humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir la normativa de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza tal como requiere la Oficina de la FDA de Estándares Biológicos.

- Como se utiliza en la presente memoria, “una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz” o “una composición que comprende una cantidad diagnósticamente eficaz” incluye cualquiera de y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (*p. ej.*, agentes antibacterianos, agentes fungicidas), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como sabrá un experto en la técnica. Salvo en caso de que un vehículo convencional cualquiera sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las presentes composiciones.
- Las composiciones de la presente invención pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol, y de si debe ser estéril para vías de administración tales como inyección. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada, baño directo de células diana, mediante un catéter, mediante un lavado, en composiciones lipídicas (*p. ej.*, liposomas), o por otro método o cualquier combinación de las anteriores, como sabrá un experto en la técnica.
- La cantidad real necesaria de una composición de la presente invención administrada a un paciente puede determinarse por factores físicos y fisiológicos, tales como peso corporal, gravedad de la afección, el tejido que se va a someter a diagnóstico por imágenes, el tipo de enfermedad que se está tratando, las intervenciones terapéuticas o de diagnóstico por imágenes previas o simultáneas, idiopatía del paciente y la vía de administración. El médico responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingrediente o ingredientes activos en una composición y la o las dosis adecuadas para el sujeto en concreto.
- En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 % del quelato quelante-ion metálico. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25 % y aproximadamente 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable de los mismos. En otros ejemplos no limitativos, una dosis puede comprender también de aproximadamente 0,1 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o cualquier cantidad comprendida en este intervalo, o cualquier cantidad superior a 1000 mg/kg/peso corporal por administración.
- En cualquier caso, la composición puede comprender varios antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Además, la prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y fungicidas que incluyen, aunque no de forma limitativa, parabenos (*p. ej.*, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.
- Las composiciones de la presente invención pueden formularse en forma de base libre, neutra o sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales formadas con los grupos carboxilo libres derivados de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.
- En realizaciones en las que la composición está en forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, aunque no de forma limitativa, agua, etanol, poliol (*p. ej.*, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, *etc.*), lípidos (*p. ej.*, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido por la dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; mediante el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa o combinaciones de dichos métodos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o combinaciones de los mismos.
- Las soluciones estériles inyectables se pueden preparar usando técnicas tales como la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de un medio líquido de los mismos filtrados previamente estériles. El medio líquido debe tamponarse adecuadamente si fuera necesario y el diluyente líquido debe hacerse isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones muy concentradas para inyección directa, en donde se prevé el uso de DMSO (dimetilsulfóxido) como disolvente para provocar una penetración extremadamente rápida, entregando así altas concentraciones de los agentes activos a un área pequeña.
- La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe proteger contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas se deberá mantener mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, inferior 0,5 ng/mg de proteína.

En realizaciones concretas, la absorción prolongada de una composición inyectable puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

5 L. Terapia combinada

Ciertos aspectos de la presente invención se refieren a composiciones que comprenden un quelante que está conjugado a un ligando de afinidad específica que es un resto terapéutico. En otras realizaciones, el quelante incluye una secuencia de aminoácidos que es una secuencia de aminoácidos terapéutica.

10 Estas composiciones pueden aplicarse en el tratamiento de enfermedades, tales como cáncer y enfermedad cardiovascular, junto con otro agente o método de terapia. El tratamiento con estas composiciones de la presente invención puede preceder o seguir al otro método de terapia en intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones en las que se administra otro agente, se garantizará de forma general que un período de tiempo significativo no expire entre el tiempo de cada entrega, de modo que los agentes sigan siendo capaces de ejercer un efecto combinado de forma ventajosa en la célula. Por ejemplo, se contempla que uno pueda administrar dos, tres, tres o más dosis de un agente de forma sustancialmente simultánea (*es decir*, en menos de aproximadamente un minuto) a las composiciones de la presente invención. En otros aspectos, un agente o método terapéutico puede administrarse en un plazo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 48 horas o más antes y/o después de administrar una cantidad terapéutica de una composición de la presente invención, o antes y/o después de cualquier cantidad de tiempo no mencionada en la presente memoria. En ciertas otras realizaciones, una composición de la presente invención puede administrarse en un plazo de aproximadamente 1 día a aproximadamente 21 días antes y/o después de administrar otra modalidad terapéutica, tal como cirugía o terapia génica. En algunas situaciones, puede ser deseable prolongar el período de tiempo de tratamiento de forma significativa, sin embargo, con un lapso de varias semanas (*p. ej.*, de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 semanas o más) entre las respectivas administraciones.

Pueden emplearse diversas combinaciones, como se demuestra más adelante, en donde un conjugado de la presente invención se denomina "A" y el agente secundario, que puede ser cualquier otro agente terapéutico o método, es "B":

30 A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

35 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración de las composiciones de la presente invención a un paciente seguirá los protocolos generales para la administración de quimioterapéuticos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, de estos agentes. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. Además, se contempla que pueden aplicarse varias terapias convencionales, así como la intervención quirúrgica, en combinación con el agente descrito. Estas terapias incluyen, aunque no de forma limitativa, farmacoterapia adicional (tal como quimioterapia para el cáncer), radioterapia adicional, inmunoterapia, terapia génica y cirugía.

45 1. *Quimioterapia*

Las terapias contra el cáncer incluyen también una variedad de terapias combinadas con tratamientos químicos y de radiación. Las quimioterapias combinadas incluyen, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes aglutinantes receptores de estrógenos, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesiltransferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier variante análoga o derivada de los anteriores.

55 2. *Radioterapia*

Otros factores que causan daño al ADN y han sido utilizados ampliamente incluyen los que se conocen comúnmente como rayos γ , rayos X y/o la entrega dirigida de radioisótopos a células tumorales. También se contemplan otras formas de factores dañinos para el ADN tales como microondas e irradiación UV. Lo más probable es que todos estos factores produzcan una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de cromosomas. Los intervalos de dosificación para los rayos X varían de dosis diarias de 0,01 a 0,05 C/kg (50 a 200 roentgens para períodos de tiempo prolongados (de 3 a 4 semanas), a dosis únicas de 0,5 C/kg a 1,55 C/kg (2000 a 6000 roentgens). Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la semivida del isótopo, la resistencia y el tipo de radiación emitida, así como de la absorción por parte de células neoplásicas. Los términos "puesto en contacto" y "expuesto" cuando se aplican a una célula se usan en la presente memoria para describir el proceso mediante el cual un constructo terapéutico y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se entregan a una célula diana o se colocan

en yuxtaposición directa con la célula diana. Para lograr una muerte celular o estasis, ambos agentes se suministran a una célula en una cantidad combinada eficaz para destruir la célula o evitar que se divida.

3. Inmunoterapia

5 Los agentes inmunoterapéuticos, generalmente, se basan en el uso de células y moléculas efectoras de la respuesta inmune que se dirigen a las células cancerosas y las destruyen. Los efectores de la respuesta inmune pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo por sí solo puede servir como un efector de terapia o puede reclutar otras células para que realmente efectúen la destrucción celular. El anticuerpo también se puede conjugar a una toxina o fármaco (quimioterapéutico, radionucleótido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina pertussis, etc.) y servir simplemente como agente de direccionamiento. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interactúa, directa o indirectamente, con una célula tumoral diana. Las diversas células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK.

15 La inmunoterapia, por lo tanto, podría usarse como parte de una terapia combinada, junto con la terapia génica. La estrategia general para la terapia combinada se describe a continuación. Generalmente, la célula tumoral debe llevar algún marcador que sea susceptible de direccionamiento, es decir, que no está presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para el direccionamiento en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígenos carcinoembrionarios, antígenos prostáticos específicos, antígenos asociados a tumor del tracto urinario, antígenos fetales, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, *erb B* y P155.

4. Genes

25 En otra realización más, el tratamiento secundario es una terapia génica en la que se administra una composición terapéutica antes, después o al mismo tiempo que los agentes terapéuticos de la presente invención. La entrega de una cantidad terapéutica de una composición de la presente invención junto con un vector que codifica un producto génico tendrá un efecto antihiperproliferativo combinado en los tejidos diana.

5. Cirugía

Aproximadamente 60 % de las personas con cáncer se someterán a cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, diagnóstica o de estadiaje, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento del cáncer que se puede usar junto con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas. La cirugía curativa incluye resección, en la que todo o parte del tejido canceroso se elimina físicamente, se extirpa y/o se destruye. La resección tumoral se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento mediante cirugía incluye cirugía láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Se contempla además que la presente invención puede usarse junto con la eliminación de cánceres, precánceres o cantidades incidentales de tejido normal superficiales.

M. Otras realizaciones de la presente invención

45 En un aspecto, la presente invención se refiere, generalmente, a un método de sintetizar un quelante, tal como EC, que comprende al menos tres grupos funcionales; comprendiendo el método la obtención de un quelante y:

- (a) proteger al menos un primer grupo funcional del quelante con un primer agente protector para generar un quelante protegido en primer lugar; o
- (b) quelar el quelante a un ion metálico para generar un quelante marcado con ion metálico.

50 Cualquier método de síntesis como se describe en la presente memoria, tal como este, puede tener lugar en un medio orgánico, como se describe en la presente memoria. El método puede también comprender al menos una etapa de purificación, como se describe en la presente memoria. Los agentes quelantes, grupos funcionales, iones metálicos y modos de quelación y conjugación que pueden usarse en los métodos de la presente invención resultan familiares a los expertos en la técnica y se describen en la presente memoria. El quelante puede también comprender un espaciador como se describe en la presente memoria, tal como etileno. Dichos agentes quelantes son productos intermedios útiles para la preparación de conjugados quelante-ligando de afinidad específica.

60 En algunas realizaciones, el método comprende proteger al menos un primer grupo funcional del quelante con un primer agente protector para generar un quelante protegido en primer lugar. En determinadas realizaciones, el primer grupo funcional es un grupo funcional tiol. En determinadas realizaciones, el primer agente protector es un agente protector tiol. En otras realizaciones, el agente protector tiol se selecciona de un grupo que consiste en un haluro de alquilo, un haluro de bencilo, un haluro de benzoilo, un haluro de sulfonilo, un haluro de trifenilmetilo, un haluro de metoxitriphenilmetilo y cisteína.

65 El método puede, en algunas realizaciones, comprender la protección de un segundo grupo funcional con un segundo agente protector para generar un quelante protegido en segundo lugar. En determinadas realizaciones, el primer grupo

funcional comprende al menos un grupo funcional tiol y el segundo grupo funcional comprende al menos un grupo funcional amina. En algunas realizaciones, un grupo funcional tiol se protege primero con un agente protector de tiol y después un grupo funcional amina se protege con un agente protector de amina. En otras realizaciones, un agente protector de amina se selecciona del grupo que consiste en cloroformiato de bencilo, formiato de *p*-nitro-clorobencilo, cloroformiato de etilo, dicarbonato de di-terc-butilo, cloruro de trifenilmetilo y cloruro de metoxitriphenilmetilo. Un ejemplo de quelante que se puede preparar comprende etilendicisteína, en donde los dos grupos tiol de la etilendicisteína se protegen con dos equivalentes de un agente protector de tiol seguido por la protección de los dos grupos amina de la etilendicisteína con dos equivalentes de un agente protector de amina. Dado que los grupos tiol son más reactivos que los grupos amino, los grupos tiol se protegerán habitualmente antes de proteger los grupos amino.

En otras realizaciones, el método además comprende eliminar uno o más grupos protectores de cualquier composición descrita en la presente memoria que comprende uno o más grupos protectores. Los grupos protectores se pueden eliminar, por ejemplo, del resto quelante, el resto de ligando de afinidad específica o ambos restos en una o más etapas antes o después de que un conjugado quelante-ligando de afinidad específica se quele a un ion metálico, como se describe en la presente memoria. Los grupos protectores se describen con más detalle en la presente memoria, incluida su instalación y eliminación.

Cualquier composición de la presente invención puede purificarse a través de cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación se describen con más detalle en la presente memoria. En algunas realizaciones, el quelante protegido en primer lugar es entre aproximadamente 90 % y aproximadamente 99,9 % puro. En algunas realizaciones, el quelante protegido en segundo lugar es entre aproximadamente 90 % y aproximadamente 99,9 % puro.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención además comprenden la conjugación de un quelante a un ligando de afinidad específica, en donde el ligando de afinidad específica y/o el quelante comprenden al menos un grupo funcional para formar un conjugado quelante-ligando de afinidad específica. En algunas realizaciones, un grupo funcional del ligando de afinidad específica está protegido por al menos un agente protector antes de la conjugación al quelante. En algunas realizaciones, al menos un grupo funcional es un grupo funcional ácido carboxílico. En algunas realizaciones, los grupos funcionales del quelante y el ligando de afinidad específica forman juntos un quelato. La quelación del ion metálico al quelante puede realizarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

Un conjugado quelante-ligando de afinidad específica de la presente invención puede también comprender un conector entre el quelante y el ligando de afinidad específica, como se describe en la presente memoria. Como se ha mencionado, el ligando de afinidad específica puede ser de cualquier tipo conocido por los expertos en la técnica, y dichos ligandos se comentan con mayor detalle en la presente memoria.

Otros aspectos generales de la presente invención contemplan un método de sintetizar un conjugado de quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica, que comprende:

- (a) obtener un quelante protegido que comprende al menos tres grupos funcionales protegidos por al menos un agente protector;
- (b) conjuguar el quelante protegido a un ligando de afinidad específica para generar un conjugado quelante-ligando de afinidad específica;
- (c) eliminar al menos un grupo protector del conjugado quelante-ligando de afinidad específica;
- (d) quelar un ion metálico al quelante del conjugado quelante-ligando de afinidad específica, y
- (e) eliminar cualquier grupo protector restante.

El quelante, los agentes protectores, los grupos funcionales, el modo de conjugación, el ligando de afinidad específica, el método de eliminar un grupo protector, el modo de quelación y el ion metálico pueden ser de cualquier tipo descrito en la presente memoria. El método puede tener lugar en un medio orgánico, como se describe en la presente memoria. El método puede comprender una o más etapas de purificación, como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, al menos un grupo funcional del ligando de afinidad específica está protegido por al menos un agente protector antes de la conjugación. En realizaciones preferidas, hay disponibles tres o cuatro átomos del quelante para la quelación.

Otros aspectos generales de la presente invención contemplan un método de sintetizar un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica, que comprende:

- (a) obtener un quelante que comprende al menos tres grupos funcionales;
- (b) quelar un ion metálico al quelante para generar un quelante marcado con ion metálico;
- (c) conjuguar el quelante marcado con ion metálico a un ligando de afinidad específica

El quelante, los grupos funcionales, el modo de conjugación, el ligando de afinidad específica, el modo de quelación y el ion metálico pueden ser de cualquier tipo descrito en la presente memoria. El método puede tener lugar en un medio orgánico, como se describe en la presente memoria. El método puede comprender una o más etapas de purificación, como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, al menos un grupo funcional del ligando de afinidad específica está protegido por al menos un agente protector antes de la conjugación. El método puede también

comprender la eliminación de todos los grupos protectores del conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica. El método también contempla, en ciertas realizaciones, al menos un grupo funcional del ligando de afinidad específica que está protegido por al menos un agente protector antes de la conjugación.

5 La presente invención también contempla kits para preparar un agente para diagnóstico por imágenes, un agente quimioterapéutico o un agente radio/quimioterapéutico que comprende uno o más recipientes sellados y una cantidad predeterminada de cualquier composición, como se describe en la presente memoria, en uno o más de los recipientes sellados. La presente invención también contempla, en algunas realizaciones, un agente para diagnóstico por imágenes, quimioterapéutico o radio/quimioterapéutico que comprende cualquier composición como se describe en la presente memoria.

10 En algunas realizaciones, la presente invención contempla un método de diagnóstico por imágenes o tratamiento de un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de cualquier composición como se describe en la presente memoria. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un humano.

15 N. Métodos de diagnóstico, tratamiento o diagnóstico por imágenes en un sujeto con enfermedad cardíaca conocida o sospechada

20 Las realizaciones de la presente invención también se refieren generalmente a métodos de diagnóstico, tratamiento o diagnóstico por imágenes en un sujeto con enfermedad cardíaca conocida o sospechada. El sujeto puede ser cualquier sujeto, tal como un mamífero o una especie aviar. El mamífero, por ejemplo, puede ser un perro, un gato, una rata, un ratón o un humano. En realizaciones preferidas, el sujeto es un humano con enfermedad cardiovascular conocida o sospechada.

25 La enfermedad cardiovascular puede ser cualquier enfermedad del corazón o de un vaso sanguíneo. El vaso sanguíneo puede ser un vaso coronario o puede ser un vaso que no sea un vaso coronario. El vaso puede ser una arteria, vena, arteriola, vénula o capilar.

30 Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares incluyen enfermedades del corazón, tales como infarto de miocardio, isquemia miocárdica, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardiopatía (congénita o adquirida), arritmia o enfermedad cardíaca valvular. En realizaciones concretas, se sabe o se sospecha que el sujeto tiene isquemia miocárdica.

35 El sujeto, por ejemplo, puede ser un paciente que se presenta a un clínico con signos o síntomas que sugieren isquemia miocárdica o infarto de miocardio. El diagnóstico por imágenes del corazón del sujeto para diagnosticar enfermedad puede implicar administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un conjugado quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica sintetizado usando cualquiera de los métodos expuestos en la presente memoria. El diagnóstico por imágenes se puede realizar utilizando cualquier modalidad de diagnóstico por imágenes conocida por los expertos en la técnica. En realizaciones concretas, el diagnóstico por imágenes implica el uso de tecnología de diagnóstico por imágenes con radionúclidos, tal como PET o SPECT. En realizaciones concretas, el conjugado radionúclido marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica es $^{99m}\text{Tc-EC-glucosamina}$. La glucosamina es absorbida activamente por el tejido miocárdico viable. Las áreas de miocardio isquémico absorberán menos o nada de conjugado. La gravedad de la isquemia puede evaluarse visualmente o clasificarse en función de la magnitud de la señal que se mide utilizando cualquier método conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el diagnóstico por imágenes usando cualquiera de los conjugados expuestos en la presente memoria se realiza antes, durante o después del diagnóstico por imágenes del corazón mediante una segunda modalidad de diagnóstico por imágenes. Por ejemplo, la segunda modalidad de diagnóstico por imágenes puede ser una escintigrafía con talio.

50 La SPECT de la perfusión miocárdica (MPS) consiste en una combinación de una modalidad de esfuerzo (ejercicio o farmacológico) con administración en descanso y en esfuerzo y diagnóstico por imágenes de radioproductos farmacéuticos. El talio tiene excelentes propiedades fisiológicas para el diagnóstico por imágenes de la perfusión miocárdica. Al extraerse a un alto nivel durante el primer paso a través de la circulación coronaria, se ha demostrado una relación lineal entre flujo sanguíneo y miocardio viable y la absorción de talio se ha demostrado durante el ejercicio; sin embargo, a niveles de flujo muy altos, se produce una "caída" de la absorción. Como análogo de potasio no unido, el talio se redistribuye con el tiempo. Su distribución inicial es proporcional a la perfusión miocárdica regional y en equilibrio, la distribución de talio es proporcional a la reserva de potasio regional, lo que refleja un miocardio viable. Los mecanismos de redistribución del talio son velocidades de lavado diferenciales entre las zonas normales y de miocardio con hipoperfusión pero viables y la entrada a las zonas con hipoperfusión inicial. La velocidad de lavado del talio es el gradiente de concentración entre la célula miocárdica y la sangre. Después del descanso o la inyección de ejercicio de bajo nivel, hay una eliminación del talio de la sangre más lenta. En pacientes normales que no alcanzan los niveles adecuados de esfuerzo se pueden observar velocidades de lavado lentas difusas, que simulan la isquemia difusa. Los estados hiperinsulinémicos ralentizan la redistribución, lo que conduce a una subestimación del miocardio viable; por tanto, se recomienda el ayuno antes de, y durante 4 horas después de, la inyección de talio. Esta es la razón por la que si se usa EC-G como un agente viable en combinación con talio, este se dirigirá al área exacta de interés que sería el área viable (Angello *et al.*, 1987; Gutman *et al.*, 1983; Pohost *et al.*, 1977).

El diagnóstico por imágenes usando cualquiera de los conjugados quelante marcado con ion metálico-ligando de afinidad específica de la presente invención también puede realizarse en conjunción con otros métodos de diagnóstico, tales como la medición de isoenzimas cardíacas o la cateterización cardíaca. El diagnóstico por imágenes puede realizarse en diversos intervalos después del inicio de los síntomas o puede realizarse para evaluar los cambios de perfusión miocárdica con el tiempo.

O. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertos aspectos no limitativos de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas descritas en los ejemplos que se muestran a continuación representan técnicas descubiertas por el inventor para que funcionen correctamente en la puesta en práctica de la invención.

Las siguientes figuras, estructuras químicas y detalles sintéticos proporcionan ciertos compuestos.

Ejemplo 1

Ejemplo no limitativo de una síntesis orgánica de N,N-etilendicisteína-glucosamina (EC-G). Véase la Fig. 1.

Etapa 1: Síntesis de S,S'-bis-bencil-N,N'-etilendicisteína (Bz-EC)

Se disolvió cisteína-HCl (30 g) en agua (100 ml). A esto, se añadió formaldehído a 37 % (22,3 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, se añadió piridina (25 ml) y se formó un precipitado. Los cristales se separaron y lavaron con etanol (50 ml); después se filtraron con un embudo Buchner. Los cristales se trituraron con éter de petróleo (150 ml), se filtraron de nuevo y se secaron. El precursor, ácido L-tiazolidina-4-carboxílico (p.f. 195 °C, presentado como 196-197 °C) pesó 23,408 g. El precursor (22 g) se disolvió en amoniaco líquido (200 ml) y se calentó a reflujo. Se añadió metal de sodio hasta que apareció un color azul persistente durante 15 min. Se añadió cloruro de amonio a la solución azul y los disolventes se evaporaron hasta sequedad. El residuo se disolvió en agua (200 ml) y el pH se ajustó a 2 con HCl concentrado. Se formó un precipitado, se filtró y se lavó con agua (500 ml). El sólido se secó en un desecador de cloruro de calcio. A continuación, se prepararon 10,7 g de EC (p.f. 237 °C, presentado 251-253 °C). La estructura de la EC se confirmó mediante RMN 1H y 13C. Se disolvió EC (2,684 g, 10 mmol) en NaOH 1 N (40 ml). Se disolvió cloruro de bencilo (5,063 g, 40 mmol) en dioxano (30 ml) y se agitó. La reacción se agitó durante 30 min. El pH de la solución se ajustó a 2 con HCl concentrado. El precipitado se filtró y lavó con agua y se recristalizó del ácido trifluoroacético, dando un rendimiento de 79,0 % (3,5454 g), p. f. 227 - 229 °C (dec.) (presentado 229 - 230 °C). La estructura de Bz-EC se confirmó mediante RMN 1H y 13C.

Etapa 2: Síntesis de S,S'-bis-bencil-N,N'-bis-CBZ-etilendicisteína (Cbz-Bz-EC)

Se disolvió Bz-EC (2,243 g, 5 mmol) en una solución de carbonato sódico (1,20 g, 11,2 mmol) y se ajustó el pH a 10 usando NaOH 1 N. El volumen acuoso final fue 30 ml. Se disolvió cloroformiato de bencilo (233 ml, 16,5 mmol) en dioxano (0,75 ml) y se agitó. El pH se ajustó a 10 añadiendo Na₂CO₃ sólido. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas, y se extrajo con éter dietílico para retirar el exceso de cloroformiato de bencilo (CBZ). El pH de la capa acuosa se ajustó a 2 con HCl 1 N y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y el disolvente se evaporó. El residuo se cromatografió en una columna columna de gel de sílice eluida con CH₂Cl₂:ácido acético (99:1) a CH₂Cl₂:metanol:ácido acético (94:5:1) para dar un rendimiento del producto deseado de 87,2 % (3,127 g). La estructura de Cbz-Bz-EC se confirmó mediante RMN 1H y 13C.

Etapa 3: Síntesis de conjugado S,S'-bis-bencilo-N,N'-bis-CBZ-etilendicisteína-glucosamina (tetraacetato) (Cbz-Bz-EC-G-4-Ac)

A un matraz agitado de diclorometano (22 ml), se añadió Cbz-Bz-EC (2,1467 g, 3 mmol). Esto fue seguido de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (2,476 g, 12 mmol) y la dimetilaminopiridina (1,466 g, 12 mmol). El clorhidrato de glucosamina tetraacetilada (2,533 g, 6,6 mmol) (4-Ac-G-HCl) (Oakwood Products Inc., West Columbia, SC) se añadió a la mezcla y se agitó hasta que se disolvió completamente. La estructura de 4-Ac-G-HCl se confirmó mediante RMN 1H y 13C. La reacción se agitó temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua (0,5 ml) y se filtró el sólido. Se secó el filtrado sobre sulfato de magnesio y se evaporó el disolvente. El producto se purificó mediante cromatografía en columna columna de gel de sílice usando diclorometano: metanol: ácido acético (9,9:0:0,1) a 56,4:3:0,6 como fase móvil. El producto se aisló con un rendimiento de 66,4 % (2,7382 g). La RMN 1H y 13C de Cbz-Bz-EC-G-4-Ac proporcionó confirmación, así como la espectrometría de masas.

Etapa 4: Síntesis de N,N'-etilendicisteína-glucosamina (EC-G)

Se disolvió Cbz-Bz-EC-G-4-Ac (687,7 mg, 0,5 mmol) en amoniaco líquido (20 ml) y se añadieron trozos de sodio (223 mg, 10 mmol). Después de añadir todo el sodio, la mezcla de reacción mantuvo un color azul oscuro durante 20 minutos. Se añadió cloruro de amonio (641,9 mg, 12 mmol) lentamente y la solución de color azul oscuro se volvió incolora. El amoniaco líquido se eliminó mediante nitrógeno. El sólido residual se disolvió en agua y se dializó durante la noche usando

PM < 500. El peso del producto crudo fue 206,7 mg (rendimiento: 70 %). Se obtuvo RMN 1H y 13C del compuesto EC-G bis-acetilado junto con espectros de masas. El ion molecular fue 861, que contiene la matriz 187 y el ion precursor 674 (EC-G bis-acetilada). El ion principal (100 %) fue 656, debido a la pérdida de agua. Se purificó adicionalmente la EC-G bis-acetilada (200 mg) disolviendo en carbonato sódico y agitando durante 2 horas. A continuación, se liofilizó el producto, EC-G, dando un peso de 70 mg y después se obtuvo la RMN 1H y 13C de EC-G. La RMN 13C de EC-G mostró 16 picos de carbono principales. El espectro de masas de EC-G fue difícil de obtener debido a su hidrofiliidad y su tendencia a quedar retenida en la columna de espectrometría de masas. Sin embargo, el compuesto EC-G bis-acetilado es menos hidrofílico que EC-G; así, podrían obtenerse espectros de masas de EC-G-bis-acetilada. Los espectros de masa de EC-G mostraron que había una pequeña impureza del compuesto EC-G bis-acetilado resultante del procedimiento de hidrólisis incompleto. La RMN 1H y 13C se acercaron a los valores previstos de EC-G. Aunque se esperaban 10 picos de carbono para la estructura simétrica de EC-G, la glucosamina tiene 12 carbonos en lugar de 6 carbonos, lo que sugiere que la glucosamina tiene dos configuraciones. Los valores experimentales RMN 1H parecen tener un perfil algo diferente de los valores previstos; sin embargo, los valores experimentales de RMN 13C de glucosamina fueron cercanos a los valores previstos de glucosamina. Por lo tanto, EC-G parece tener dos configuraciones.

Ejemplo 2

Ejemplo no limitativo de una síntesis orgánica de $^{187}\text{Re-EC-G}$ usando Re-EC y glucosamina protegida.

Véase la Fig. 2.

$^{187}\text{Re-EC-G}$ se usó como patrón de referencia para $^{99m}\text{Tc-EC}$ debido a la similitud de estructura y lipofiliidad. La síntesis de Re-EC-G frío se muestra en la Fig. 2. A una solución de etanol agitada, se añadieron lentamente pequeñas virutas de sodio metal (144,8 mg, 6,3 mmol) en 10 ml de etanol en una botella de 50 ml bajo nitrógeno. Después de que se disolvió el metal de sodio, se añadió EC (536,8 mg, 2,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente para formar la sal EC-Na. Se añadió cloruro de renio trifenilfosfina ($\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2$, 1,8329 g, 2,2 mmol). El color verde oliva de $\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2$ cambió a un color verde bosque. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora y, a continuación, se calentó a reflujo durante 30 min. Después, se filtró la mezcla de reacción y se evaporó el filtrado hasta sequedad, lo que generó un polvo gris-púrpura de Re-EC (818,4 mg, 80 % de rendimiento). La estructura de Re-EC se confirmó mediante RMN 1H y 13C y espectrometría de masas. El Re tiene dos pesos moleculares isoméricos, que son 185 y 187. Por lo tanto, muestra distintivamente dos iones precursores con proporciones 40:60.

A un disolvente de dimetilformamida agitada (4 ml), se añadió Re-EC (116,9 mg, 0,25 mmol) seguido de 1,8 diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno (DBU) (150 ml, 1,0 mmol). A continuación, se añadió diciclohexilcarbodiimida (DCC) (123,8 mg, 0,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. Se añadió glucosamina tetraacetilada (4-Ac-G-HCl) (184,9 mg, 0,5 mmol) y, después, se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua (1 ml) y la reacción se agitó durante 1 hora más a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida. Se añadió agua (5 ml), seguida de cloroformo (5 ml). La capa acuosa se separó y liofilizó para producir un sólido crudo marrón oscuro. El sólido se purificó por cromatografía en columna usando Sephadex G-50 para producir Re-EC-G frío (128,4 mg, 65 % de rendimiento). La estructura de Re-EC-G frío se confirmó mediante RMN 1H y 13C y espectrometría de masas. De nuevo, el complejo Re muestra distintivamente dos iones precursores con proporciones 40:60.

El análisis elemental del Re-EC-G frío mostró $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{ReS}_2$ (C, H, N) con el valor calculado C:30,41, H:4,47, N:7,09; valor encontrado C:30,04, H:4,93, N:6,09. La RMN 1H y 13C de Re-EC-G fue similar a la espectrometría RMN prevista. Se marcó EC-G (5 mg) con ^{99m}Tc (pertenecetato) (0,037 GBq (1 mCi)) en presencia de cloruro de estaño (II) (0,1 mg). El análisis HPLC mostró que el Re-EC-G frío tuvo un tiempo de retención similar al de $^{99m}\text{Tc-EC-G}$.

Ejemplo 3

Síntesis de EC-G usando EC y glucosamina en una reacción acuosa

Se disolvió EC (107 mg, 0,4 mmol) en NaHCO_3 (1 N, 12 ml). A esta solución incolora se añadió N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS, 173,7 mg, 0,8 mmol) y 1 etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida HCL (EDAC) (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, WI) (153,4 mg, 0,8mmoles). Se añadió sal de clorhidrato de D-glucosamina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) (345 mg, 1,6 mmol). Se midió un pH de 8. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y, después, se dializó durante 24 horas usando membrana porosa molecular Spectra/POR con corte a 500 (Spectrum Medical Industries Inc., Houston, TX). Después de la diálisis, el producto se filtró mediante un filtro de nailon de 0,45 μm y después se liofilizó usando un liofilizador (Labconco, Kansas City, MO). El producto crudo pesó 300-400 mg. La NMR 1H de EC-G mostró patrones similares; sin embargo, parece que la mezcla no es tan pura como la EC-G orgánica. El análisis elemental mostró que la pureza de EC-G fue de 63-77 % usando diferentes proporciones de reacción entre EC y glucosamina. Se usó HPLC preparativa (columna C-18 de 7,8 x 300 mm, Waters) (velocidad de flujo: 0,5 cm^3/min (0,5 ml/min), 100 % de agua, UV 235 nm) para purificar el producto crudo, 180 - 240 mg (rendimiento de 60 %). La RMN 1H y 13C de EC-G después de la HPLC preparativa mostró picos adicionales que sugieren impurezas de mono EC-G o EC-glucosamina, sulfo-NHS y EDAC. La purificación por HPLC preparativa de la EC-G cruda produjo alguna mejora incremental en la pureza química; sin embargo, cuando la EC-G cruda se marca con ^{99m}Tc

en presencia de cloruro de estaño (II), puede conseguirse una pureza radioquímica superior a 95 % de ^{99m}Tc -EC-G usando gluconato como transquelante (como se muestra en los análisis de radio-TLC y HPCL).

Ejemplo 4

Estudio de absorción celular comparando productos sintetizados mediante el método acuoso y el método orgánico

Para validar aún más la actividad biológica de EC-G, se realizaron ensayos de cultivo celular *in vitro*. En resumen, la absorción celular se determinó en células tumorales (50 000 células/pocillo) incubadas con ^{99m}Tc -EC-G (0,07 MBq/pocillo (2 μCi /pocillo) en diversos intervalos temporales. El ensayo de absorción celular no mostró una diferencia marcada entre la EC-G cruda (sin purificar) y la EC-G purificada por HPLC preparativa (Fig. 4) Los estudios de estabilidad *in vitro* se determinaron usando cultivo celular o disolviendo EC-G en agua. Hubo una reducción del 10-15 % en la absorción celular usando ^{99m}Tc -EC-G después de 2-4 semanas La vida útil de la EC-G en agua parece ser de 17,26 días. Los estudios de diagnóstico por imágenes *in vivo* no mostraron una diferencia marcada entre la EC-G sintetizada a partir de reacciones acuosas y orgánicas.

Ejemplo 5

Síntesis de Re-EC-G frío usando Re-EC y glucosamina en una reacción acuosa

Se disolvió Re-EC (255,8 mg, 0,5 mmol) (del ejemplo 2) en NaOH (1 N, 4,5 ml). A esta solución de color púrpura oscuro se añadió sulfo-NHS (217,1 mg, 1 mmol) y sal de clorhidrato de D-glucosamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (431,3 mg, 2 mmol). A continuación, se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (EDAC) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) (191,7 mg, 1 mmol). El pH medido fue superior a 8. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se dializó durante 24 horas usando membrana porosa molecular Spectra/POR con corte a 500 (Spectrum Medical Industries Inc., Houston, TX). Después de la diálisis, el producto se filtró y después se liofilizó usando un liofilizador (Labconco, Kansas City, MO). El producto crudo pesó 276 mg. La RMN 1H de Re-EC-G acuosa mostró un patrón similar; sin embargo, parece haber algún indicio de impurezas si se compara con el compuesto de RE-EC-G orgánico. El análisis por HPLC del compuesto orgánico de Re-EC-G frío mostró un pico a 272 nm; sin embargo, la Re-EC-G acuosa en frío tuvo dos picos. Uno de los picos de la Re-EC-G fría acuosa corresponde al compuesto orgánico Re-EC-G frío (picos a 12,216 y 12,375, respectivamente). Los picos restantes fueron sulfo-NHS y otras impurezas menores.

Ejemplo 6

Análisis cuantitativo de la glucosamina (ingrediente farmacéutico activo)

La D-glucosamina se derivatizó para ensayos colorimétricos. En resumen, a una solución de clorhidrato de D-glucosamina (25 g, 0,12 mol) en una solución acuosa recién preparada de NaOH 1 N (120 ml) se añadió con agitación *p*-anisaldehído (17 ml, 0,14 mol). Después de 30 min comenzó la cristalización y la mezcla se refrigeró durante la noche. El producto precipitado se filtró a continuación y se lavó con agua fría (60 ml), seguida de una mezcla de EtOH-Et₂O (1:1) para obtener 2-desoxi-2-[*p*-metoxibenzilideno(amino)]-D-glucopiranososa (D-glucosamina-anisaldehído, 32,9408 g, 110,8 mmol, rendimiento del 95,5 %) p. f. 165 - 166 °C. La RMN 1H confirmó la estructura.

La EC-G (50 mg) cruda se liofilizó usando NaOH 1 N. Se añadió anisaldehído a la solución de reacción. Después de 2 horas, se extrajo la mezcla de reacción con cloroformo. La capa de cloroformo, que contenía anisaldehído sin reaccionar, se evaporó en nitrógeno. El peso del anisaldehído reaccionado se usó para determinar la cantidad de glucosamina en el aducto D-glucosamina-anisaldehído.

Ejemplo 7

Análisis cuantitativo de EC en EC-G

La EC-G (50 mg) cruda se liofilizó usando NaOH 1 N. Se disolvió cloruro de bencilo en dioxano (30 ml) y después se añadió a la mezcla agitada. La reacción se agitó durante 2 horas y, después, se extrajo con cloroformo. La capa de cloroformo, que contenía cloruro de bencilo sin reaccionar, se evaporó en nitrógeno. El peso del cloruro de bencilo reaccionado se usó para determinar la cantidad de EC en EC-G (Tabla 3).

Ejemplo 8

Análisis cuantitativo de sulfo-NHS y EDAC en EC-G

Se generó una curva normalizada de sulfo-NHS en UV 272 nm. Se disolvió EC-G cruda en agua. A partir de la curva normalizada, se determinó la cantidad de sulfo-NHS en EC-G en UV 272 nm. La cantidad de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (EDAC) se calculó restando la EC, glucosamina y sulfo-NHS del peso total de EC-G mostrado en la Tabla 3.

Ejemplo 9

Análisis cuantitativo del ensayo de fosforilación de glucosa

5 Se usó un ensayo de hexoquinasa *in vitro* para evaluar el proceso de fosforilación de la glucosa de la EC-G. Usando un kit (Sigma Chemical Company, MO), se disolvió fluorodesoxiglucosa (FDG, 1,0 mg), EC-G (1,0 mg), D-glucosamina (G, 1,0 mg) y D-glucosa (2,5 mg) en 1 ml (EC-G, G) o 2,5 ml (D-glucosa) de agua. A continuación, se retiraron 200 µl y se diluyeron en 2,5 ml de agua. Después, se retiró una alícuota de 100 µl y se combinó en solución con 900 µl de reactivo de glucosa Infinity™ y se incubó a 37 °C durante tres min. A continuación, la glucosa fosforilada y el NADH se analizaron a una longitud de onda de 340 nm. Se obtuvieron los picos de FDG (340 y 347 nm), glucosa (301 y 342 nm), EC-G (303 y 342 nm) y G (302 y 342 nm).

Ejemplo 10

15 Ensayo de identidad química de la glucosamina (ingrediente farmacéutico activo) en EC-G (sintetizada a partir de la reacción acuosa)

20 Se usó un ensayo colorimétrico para determinar la cantidad de glucosamina. Se preparó una solución de sulfato de cobre (6,93 g en 100 ml de agua) y tartrato de sodio y potasio (34,6 g en 100 ml de agua que contiene 10 g de NaOH). Se añadió EC-G (25 mg) y glucosamina (patrón) con solución de tartrato de cobre básica hasta que no existió visualización de precipitado rojo de óxido de cobre. La cantidad de glucosamina en la EC-G fue 8,7 mg (35 % p/p) determinada a partir de la valoración volumétrica (Tabla 3).

25 De forma alternativa, como se describe en el Ejemplo 5, se añadió clorhidrato de D-glucosamina (25 g, 0,12 moles) a una solución acuosa recién preparada de NaOH 1 N (120 ml) con agitación y después se añadió *p*-anisaldehído (17 ml, 0,14 mol) a la mezcla. Después de 30 min, comenzó la cristalización y la mezcla se refrigeró durante la noche. El producto precipitado se filtró y lavó con agua fría (60 ml), seguida de una mezcla de EtOH-Et₂O (1:1) para producir 2-desoxi-2-[*p*-metoxibenzilideno(amino)]-D-glucopiranososa (D-glucosamina-anisalaldehído, 32,9408 g, 110,8 mmol, rendimiento del 95,5 %) p. f. 165 - 166 °C. La EC-G cruda (50 mg) se hidrolizó usando NaOH 1 N. Se añadió anisalaldehído a la solución de reacción. Después de 30 min, comenzó la cristalización y la mezcla se refrigeró durante la noche. El producto precipitado se filtró y lavó con agua fría y se determinó que el punto de fusión era 165 - 166 °C (que contiene 18 mg de glucosamina).

Tabla 3

35 Análisis cualitativo de glucosamina y EC en EC-G (sintetizada a partir de la reacción acuosa)

Valor teórico

| Compuesto | Peso molecular | Porcentaje (peso/peso) | |
|-----------------|----------------|------------------------|--------|
| | | (100 %) | (65 %) |
| EC-G | 591 | | |
| EC | 268 | | |
| Glucosamina (G) | 179 | | |
| EC en EC-G | | 39 % (234/591) | 25 % |
| G en EC-G | | 60 % (356/591) | 39 % |

Valor Experimental

| Compuesto | Porcentaje (peso/peso) | Método |
|-------------------|------------------------|---------------|
| EC en EC-G | 30 % | colorimétrico |
| G en EC-G | 35 % | colorimétrico |
| Sulfo-NHS en EC-G | 34 % | UV (268 nm) |
| EDAC | 1 % | cálculo |

Ejemplo 11

45 Ensayo de identidad química de la etilendicisteína (quelante) en EC-G (sintetizada a partir de la reacción acuosa)

50 Se utilizaron dos métodos para determinar la pureza de la EC-G. En el primer método, se usó un ensayo colorimétrico para determinar la cantidad de EC. Se preparó una solución de yodo (0,1 mol/L) (13 g junto con 36 g de KI en 1000 ml de agua) y se añadió EC-G (25,2 mg) y EC (25 mg) (patrón) a la solución de yodo. En la EC

patrón, precipitó un sólido blanco pálido, pero no se observó ningún precipitado en la EC-G. Se usó un método de valoración (color amarillento (persiste más de 5 min)) para determinar la cantidad de EC en la EC-G. Cada 1 ml de solución de yodo que se utilizó equivale a 13,4 mg de EC. La cantidad de EC en la EC-G fue 7,6 mg (30,2 % p/p).

5 En el segundo método, se realizó la medición del punto de fusión de un aducto tiol-EC-G. En el Ejemplo 1 se describe la síntesis de S,S'-bis-bencil-N,N'-etilendicisteína (Bz-EC). En resumen, se disolvió EC (2,684 g, 10 mmol) en NaOH 1 N (40 ml). Se disolvió cloruro de bencilo (5,063 g, 40 mmol) en dioxano (30 ml) y se añadió a una mezcla agitada. Después de 30 min, el pH de la solución se ajustó a 2 con HCl concentrado. El precipitado se filtró y lavó con agua y se recristalizó del ácido trifluoroacético. El rendimiento fue 79,0 % (3,5454 g), p.f. 227 - 229 °C (dec.) (presentado 229 - 10 230 °C). La EC-G cruda (50 mg) se hidrolizó posteriormente usando NaOH 1 N y se añadió cloruro de bencilo (40 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. El pH de la solución se ajustó a 2 con HCl concentrado. El precipitado se filtró y lavó con agua para producir aducto EC-bencilo, p.f. 227 - 229 °C (que contiene 16 mg de EC).

15 Ejemplo 12

Ensayo de identidad química de la N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) en EC-G (sintetizada a partir de la reacción acuosa)

20 El ensayo para N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) se determinó mediante UV (268 nm). Se generó una curva normalizada de sulfo-NHS en UV 268 nm. Bajo esta absorbancia UV, se observó una absorbancia pobre para EC-G y EDAC. Se disolvió EC-G cruda (50 µg/ml) en agua y se midió la absorbancia a 268 nm. El sulfo-NHS estimado fue 35 ± 5 % (p/p).

25 Ejemplo 13

Pureza radioquímica y ensayo de identidad

30 Se usó cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la identidad radioquímica. Para el ensayo de TLC, la EC-G de síntesis acuosa y de síntesis orgánica se marcó con ^{99m}Tc y se detectaron sobre una tira de TLC impregnada con columna de gel de sílice (ITLC SG) y se escanearon usando un escáner de radio-TLC. Los valores del factor de retención (Rf) de ^{99m}Tc-EC-G (procedente de la síntesis acuosa) y del patrón de referencia (^{99m}Tc-EC-G procedente de la síntesis orgánica) fueron 0,8 (determinados mediante acetato de amonio (1M):metanol; 4:1) o solución salina. Para el ensayo de HPLC, la pureza química de la EC-G de síntesis acuosa y de síntesis orgánica fue 95,64 % y 90,52 %, respectivamente. La EC-G sintetizada a partir de la reacción orgánica fue 35 más pura que la EC-G sintetizada a partir de la reacción acuosa. La EC-G de síntesis orgánica y de síntesis acuosa se marcaron con ^{99m}Tc y se cargaron (20 µl, 1 mg/ml EC-G) en una columna de fase reversa C-18 (Waters, semiprep., 7,8 × 300 mm). Los valores del tiempo de retención (Rt) de ^{99m}Tc-EC-G y Re-EC-G frías (patrón de referencia de la síntesis orgánica) estuvieron entre 11,7-13,5 min (determinados mediante 100 % de agua a 0,5 cm³/minuto (0,5 ml/min), UV a 210 nm). Tanto la ^{99m}Tc-EC-G de síntesis orgánica como la de síntesis acuosa se detectaron mediante longitud de 40 onda UV (210 nm) y los hallazgos de detector radioactivo correspondientes estuvieron comprendidos dentro de los intervalos establecidos anteriormente. Los ensayos de cultivo celular *in vitro* mostraron que la Re-EC-G producía una curva dosis-respuesta (Fig. 3) y era eficaz contra las células de linfoma humanas.

45 *Resumen:*

•La pureza radioquímica de la ^{99m}Tc-EC-G medida por HPLC y TLC es superior a 95 % para la EC-G sintetizada en medio acuoso, la cual se aproxima estrechamente a la pureza radioquímica de la EC-G sintetizada en medio orgánico.

50 •La pureza química de la EC-G acuosa no marcada medida mediante análisis colorimétrico y elemental se encuentra en el intervalo de 60-70 %. Todas las impurezas contenidas en el compuesto EC-G (ya sea la síntesis acuosa u orgánica) se han identificado claramente mediante ensayos colorimétricos y espectrometría UV como glucosamina (35 %), EC (30 %), sulfo-NHS (34 %) y EDAC (1 %) con porcentajes % p/p.

55 •Cuando se mide mediante HPLC en UV 210 nm, la pureza química de la EC-G acuosa no marcada se compara muy favorablemente con la de la EC-G orgánica no marcada, 90,52 % frente a 95,64 %, respectivamente.

•El tiempo de retención de la ^{99m}Tc-EC-G acuosa se encuentra en el intervalo de la Re-EC-G fría medida mediante HPLC a 272 nm.

60 •La RMN (¹H, ¹³C) de la EC-G acuosa está en el intervalo de la Re-EC-G fría.

•La EC-G orgánica no marcada, la EC-G orgánica marcada y la Re-EC-G fría se usan como patrones de referencia.

65 •Los ensayos biológicos (absorción *in vitro* y diagnóstico por imágenes *in vivo*) no mostraron una diferencia marcada entre la EC-G sintetizada en medio acuoso y orgánico.

Ejemplo 14

Análisis de pureza de ^{68}Ga -EC-G

- 5 Se analizó ^{68}Ga -EC-G sintetizada por medios tanto orgánicos como acuosos mediante radio-TLC. La Fig. 6 muestra la pureza mejorada del producto orgánico (a) sobre el producto acuoso (b). La Fig. 7 representa la purificación realizada en una columna C 18 (Puresil, 4,6 x 150 mm, Waters, Milford, Ma) y eluída con agua utilizando una velocidad de flujo de 0,5 cm³/min (0,5 ml/min). La detección se realizó mediante UV y Nal.

10 Ejemplo 15

Análisis de estabilidad de ^{68}Ga -EC-G

- 15 La Fig. 8 describe los resultados de un estudio de la estabilidad de ^{68}Ga -EC-G en suero de perros, como se muestra por medio de radio-TLC. Se añadieron 100 μl de ^{68}Ga -EC-G (0,7 mg/0,7 ml, pH 7,5, 32 MBq (865 μCi)) a 100 μl de suero de perro y se incubaron durante 0, 30, 60 y 120 minutos. A continuación, se añadieron 200 μl de MeOH a cada muestra y se agitaron en vórtice antes de la elución con el uso de un sistema que comprende piridina:EtOH:agua = 1:2:4; papel Whatman n.º 1. (a) ^{68}Ga -EC-G (0,7 mg/0,7 ml, pH 7,5, 32 MBq (865 μCi)); (b) 100 μl ^{68}Ga -EC-G en 100 μl de suero de perro, tiempo = 0; (c) tiempo = 30 min; (d) tiempo = 60 min; (e) tiempo = 120 min; (f) ^{68}Ga -EC-BSA.

- 20 La Fig. 9 muestra los resultados de un estudio de la estabilidad de ^{68}Ga -EC-G en suero de perro como se analizó en un ensayo de unión de proteínas. Se incubó una muestra de control con ^{68}Ga -EC-albúmina sérica bovina (BSA) en suero de perro. Se añadieron 100 μl de ^{68}Ga -EC-G (0,7 mg/0,7 ml, pH 7,5, 32 MBq (865 μCi)) a 100 μl de suero de perro y se incubaron durante 0, 30, 60 y 120 minutos, se contabilizó la actividad, a continuación, se añadieron 200 μl de MeOH y la muestra se agitó en vórtice, se centrifugó durante 1 minuto y después se contabilizó el sobrenadante y el precipitado. Los recuentos determinados en el precipitado son indicativos del grado de unión entre ^{68}Ga -EC-G y las proteínas del suero de perro.

- 25 La velocidad de unión de proteínas aumentó de 18,6 % a 51,5 % después de 2 horas, lo que sugiere el potencial direccionamiento de ^{68}Ga -EC-G.

30 Ejemplo 16

Estudio de actualización *in vitro* de compuestos marcados con ^{68}Ga en la línea celular de cáncer de mama 13762

- 35 La Fig. 10 muestra los resultados de un estudio de absorción *in vitro* de compuestos marcados con ^{68}Ga en la línea celular del cáncer de mama 13762. Absorción celular de ^{68}Ga -EC y ^{68}Ga -EC-G en células 13762 (0,04 MBq (1 μCi)/50 000 células por pocillo). La absorción celular de ^{68}Ga -EC-G fue significativamente superior ($p < 0,01$) al control ^{68}Ga -EC a 0,5-2 h.

40 Ejemplo 17

Imágenes de enfermedad cardiovascular

- 45 La Fig. 11 muestra imágenes de escintigrafía planar de un derivado de ^{99m}Tc -EC-ESMOLOL (11 MBq/rata (300 μCi /rata)) en ratas con cáncer de mama. Los números son proporciones de densidad de recuento (recuento/píxel) corazón/mediastino superior (H/UM) a 15-45 minutos. El perfil de la línea de la Fig. 11 muestra una proporción recuento/píxeles en la región cardíaca alta en comparación con los tejidos localizados lateralmente. Estos resultados demuestran que ^{99m}Tc -EC-ESMOLOL es sorprendentemente eficaz en el diagnóstico por imágenes de la región cardíaca.
- 50 La Fig. 12 muestra los resultados del diagnóstico por imágenes de ^{68}Ga -EC-TML PET en un conejo blanco de Nueva Zelanda. Se administró a un conejo ^{68}Ga -EC-trimetil-lisina (EC-TML). Las imágenes coroneales PET se adquirieron 45 minutos después de la inyección de 0,02 GBq (0,66 mCi) de ^{68}Ga -EC-TML (orden dorsal a ventral). Se observó una alta absorción en el corazón, lo que sugiere que la EC-TML estuvo implicada en el metabolismo de los ácidos grasos.

55 Ejemplo 18

Ejemplo no limitativo de síntesis orgánica de EC-G mediante un producto intermedio de EC-benzhidrol-Cbz-glucosamina (véase la Fig. 13)

- 60 La EC-benzhidrol-Cbz-glucosamina puede disolverse en acetato de etilo y precipitar añadiendo MTBE o n-hexano. Esto se ha contemplado como un método de obtención de especies de puras a penúltimas en un método de obtener EC-G. La pureza (HPLC) de la EC-benzhidrol-Cbz-glucosamina antes de este tratamiento de trituración fue aproximadamente 64 %. Después de la trituración, la pureza fue aproximadamente 68 % (MTBE) o 65 %-80 % (n-hexano). Otro método contemplado para purificar el producto es mediante el uso de un cartucho de Biotage, ya que el gel de sílice de estos cartuchos es más activo que el gel de sílice de grado instantáneo.

65

También se intentaron otras técnicas y procedimientos de purificación usando diferentes sistemas disolventes como una alternativa a la cromatografía; el resultado se muestra en la Tabla 4 a continuación. La precipitación se intentó en diferentes sistemas disolventes. La EC-benzhidrol-Cbz se disolvió en un disolvente seleccionado (A) y se cargó lentamente a un volumen mayor de codisolvente (B). Sin embargo, los resultados no indicaron que esta estrategia fuera tan eficaz como otros métodos, ya que los cambios en la pureza fueron insignificantes. También se intentaron trituraciones usando los sistemas disolventes seleccionados en varias proporciones para la precipitación. Los resultados para las trituraciones también sugieren que el material no es lo suficientemente puro para ciertas aplicaciones. También se intentó la cromatografía en columna, y las condiciones se modificaron desde la semana previa (15:1 sílice: crudo, cargado en seco en sílice). Este método permitió una limpieza moderada del material (de 55A % en peso a 75A % en peso).

Tabla 4

Purificación de EC-Benzhidrol-Cbz mediante precipitación y trituración

| Disolvente A | Disolvente B | Resultado de la precipitación | Resultado de la trituración |
|------------------|--------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Acetato de etilo | Hexano | Sólido pegajoso | Aceite |
| Metanol | Agua | Aceite pegajoso | Aceite |
| DCM | Hexano | Aceite pegajoso | Aceite |
| Etanol | Agua | Aceite pegajoso | Aceite |

Referencias

U.S. Patent 5,605,672

U.S. Patent 6,692,724

U.S. Patent 6,737,247

U.S. Patent Appln. 09/599,152

U.S. Patent Appln. 10/627,763

U.S. Patent Appln. 10/672,142

U.S. Patent Appln. 10/703,405

U.S. Patent Appln. 10/732,919

Alauddin and Conti, *Nucl. Med. Biol.*, 25(3):175-180, 1998.

Alauddin *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 23:787-792, 1996.

Alauddin *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 26:371-376, 1999.

Alberico *et al.*, *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 13(1):13-35, 2004.

Angello *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 60:528-533, 1987.

Benveniste and Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70(8):2276-2280, 1973.

Blondeau *et al.*, *Can. J. Chem.*, 45:49-52, 1967.

Bodansky, In: *Peptide Chemistry*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, 1993.

Bolhuis *et al.*, *Int. J. Cancer Suppl.*, 7:78-81, 1992.

Borodina *et al.*, *Appl. Environ. Microb.*, 71(5):2294-302, 2005.

Bush *et al.*, *Br. J. Cancer Suppl.*, 37(3):302-306, 1978.

Campbell *et al.*, *Cancer Res.*, 51(19):5329-5338, 1991.

Canevari *et al.*, *Hybridoma*, 12(5):501-507, 1993.

Chasselle *et al.*, *Lancet*, 34B:143, 1995.

Coney *et al.*, *Cancer Res.*, 54(9):2448-2455, 1994.

Diamond *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253(3):866-871, 1978.

Dische, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 20(1):147-152, 1991.

Franklin *et al.*, *Int. J. Cancer Suppl.*, 8:89-95, 1994.

Gambhir *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 39(11):2003-2011, 1998.

Gambhir *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(5):2333-2338, 1999.

Gambhir *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:2785-2790, 2000.

Gatenby *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 14(5):831-838, 1988.

Ginobbi *et al.*, *Anti-cancer Res.*, 17(1A):29-35, 1997.

Grant, In: *Synthetic Peptides*, Freeman & Co., New York, 1992.

Gray *et al.*, *Nature*, 182(4640):952-953, 1958.

Greene and Wuts, In: *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1999.

Gutman *et al.*, *Am. Heart J.*, 106:989-995, 1983.

Hall *et al.*, *Radiat. Res.*, 114(3):415-424, 1988.

Henson *et al.*, *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, 25(6):969-972, 2004.

Hoelscher *et al.*, *Spine*, 25(15):1871-7, 2000.

Holm, *et al.*, *APMIS*, 102(11):828-836, 1994.

Hostettler and Hall, *PNAS*, 79:1663-1667, 1982.

Hsueh and Dolnick, *Biochem. Pharmacol.*, 45(12):2537-2545, 1993.

Hu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:9791-95, 1998.

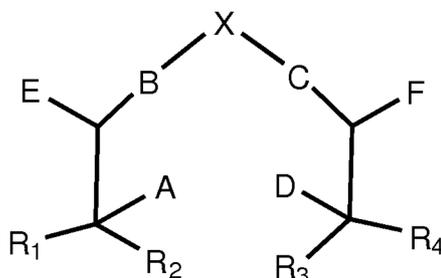
- Iyer *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 42(1):96-105, 2001.
 Koh *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22:199-212, 1992.
 Kranz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92(20):9057-61, 1995.
 Kundra *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 43(3):406-412, 2002.
 5 Leamon and Low, *Biochem. J.*, 291 (Pt 3):855-60, 1993.
 Leamon and Low, *J. Biol. Chem.*, 267(35):24966-71, 1992.
 Leamon and Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(13):5572-76, 1991.
 Lee and Low, *J. Biol. Chem.*, 269(5):3198-3204, 1994.
 Martin *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 30:194-201, 1989.
 10 Medical Letter, 34:78, 1992.
 Michalik *et al.*, *Pharmacol Res.* 21(4):405-414, 1989.
 Murakami *et al.*, *J Orthop Res.*, 14(5):742-8, 1996.
 Murakami *et al.*, *Bone*, 21(5):411-418, 1997.
 Myszka *et al.*, *Carb. Res.*, 338:133-141, 2003.
 15 Nakae and Nakae, *Antimicrobial Agents and Chemo.*, Oct;22(4):554-59, 1982.
 Namavari *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 27(2):157-62, 2000.
 Nordmark *et al.*, *Radiother. Oncol.*, 41(1):31-39, 1996.
 Orr *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 87(4):299-303, 1995.
 Ozmen *et al.*, *Drug Chem Toxicol.*, 28(4):433-45, 2005.
 20 Patrick *et al.*, *J. Neurooncol.*, 32(2):111-23, 1997.
 Pohost *et al.*, *Circulation*, 55:294-302, 1977.
 Rasey *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 17(5):985-91, 1989.
 Rasey *et al.*, *Radiother. Oncol.*, 17(2):167-73, 1990.
 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
 25 Ross *et al.*, *Cancer*, 73(9):2432-43, 1994.
 Saha *et al.*, *Semin. Nucl. Med.*, 24(4):324-49, 1994.
 Strunk and Schild, *Eur. Radiol.*, 14(6):1055-1062, 2004.
 Tachibana *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 25(20):2297-301, 1976.
 Tod *et al.*, *Clin Pharmacokinet.*, Mar;38(3):205-223, 2000.
 30 Tjuvajev *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 43(8):1072-1083, 2002.
 Valk *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 33(12):2133-2137, 1992.
 Verbruggen *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 33:551-557, 1992.
 Warrell, Jr *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 329(3):177-189, 1993.
 Weitman *et al.*, *Cancer Res.*, 52(12):3396-3401, 1992b.
 35 Weitman *et al.*, *Cancer Res.*, 52(23):6708-6711, 1992a.
 Weitman *et al.*, *J Neurooncol.*, 21(2):107-112, 1994.
 Westerhof *et al.*, *Cancer Res.*, 51(20):5507-5513, 1991.
 Yaghoubi *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 42:1225-1234, 2001.
 Yanai *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103(25):9661-9666, 2006.
 40 Yang *et al.*, *Diabetes*, 53:67-73, 2004.

REIVINDICACIONES

1. Un método de sintetizar un conjugado quelante-ligando de afinidad específica, comprendiendo el método la etapa de:

5

- (a) conjugar, en un medio orgánico, un quelante de la fórmula:



10

a al menos un ligando de afinidad específica que comprende al menos un grupo funcional, en donde el quelante es etilendicisteína (EC), y en donde los dos grupos tiol y los dos grupos amina de la etilendicisteína están protegidos; es decir, en donde:

15

- A y D son cada uno un tiol protegido;
- B y C son cada uno una amina terciaria;
- E y F son cada uno -COOH;
- R₁, R₂, R₃ y R₄ son cada uno H;
- X es -CH₂-CH₂-; y
- la conjugación es entre A, D, E, o F del quelante y al menos un grupo funcional desprotegido de cada ligando de afinidad específica;
- al menos uno de A, D, y el ligando de afinidad específica comprende un grupo funcional protegido,
- al menos un grupo funcional del ligando de afinidad específica está desprotegido,
- el ligando de afinidad específica es un agente que simula glucosa.

25

2. El método de la reivindicación 1, en donde el medio orgánico comprende un disolvente polar o no polar, en particular en donde el medio orgánico comprende dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dioxano, metanol, etanol, hexano, cloruro de metileno, acetonitrilo, tetrahidrofurano, o una mezcla de los mismos.

30

3. El método de la reivindicación 1, comprendiendo el método además al menos una etapa de purificación (b), en donde la etapa de purificación (b) comprende cromatografía en columna de gel de sílice, HPLC, o una combinación de las mismas, comprendiendo el método además opcionalmente además una cualquiera de las etapas siguientes:

35

- (c) quelar un ion metálico al quelante para generar un conjugado marcado con ion metálico entre el quelante y el agente que simula glucosa, y
(d) eliminar cada grupo protector en una o más etapas.

40

4. El método de la reivindicación 3, comprendiendo el método las etapas (b) y (d) y que comprende además la etapa de

45

(e) quelar un ion metálico al quelante para generar un conjugado marcado con ion metálico entre el quelante y el agente que simula glucosa, en particular en donde la generación del conjugado marcado con ion metálico comprende las etapas de:

50

- (f) eliminar al menos un grupo protector del conjugado; y
(g) quelar un ion metálico al quelante del conjugado, o comprendiendo el método además las etapas de:
(h) quelar un ion metálico al quelante para generar un quelante marcado con ion metálico;
(i) conjugar el quelante marcado con ion metálico a un agente que simula glucosa; y
(j) eliminar al menos un grupo protector del conjugado marcado con ion metálico entre el quelante y el agente que simula glucosa.

55

5. El método de la reivindicación 4, en donde el ion metálico es un ion tecnecio, un ion cobre, un ion indio, un ion talio, un ion galio, un ion arsénico, un ion renio, un ion holmio, un ion itrio, un ion samario, un ion selenio, un ion

estroncio, un ion gadolinio, un ion bismuto, un ion hierro, un ion manganeso, un ion lutecio, un ion cobalto, un ion platino, un ion calcio o un ion rodio, o en donde el ion metálico es un radionúclido tal como ^{99m}Tc , ^{188}Re , ^{187}Re , ^{186}Re , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{183}Gd , ^{59}Fe , ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{45}Ti , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{67}Cu , ^{64}Cu , y ^{62}Cu .

- 5 6. El método de la reivindicación 5, comprendiendo el método además la etapa de
- (k) añadir un agente reductor.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el al menos un grupo funcional del agente que simula glucosa comprende O, N, S, y P, en particular en donde el al menos un grupo funcional es un grupo amino, amido, tiol, hidroxilo, éter, éster, carbonilo, carboxílico, sulfonamido, tioéter, tioéster, o tiocarbonilo.
8. El método de la reivindicación 1, en donde (i) tres o cuatro de A, B, C, y D forman juntos un quelato N_2S_2 o (ii) A y D son tioles protegidos, protegidos por un haluro de alquilo, un haluro de bencilo, un haluro de benzoilo, un haluro de sulfonilo, un haluro de trifenilmetilo, un haluro de metoxitriphenilmetilo o cisteína.
9. El método de la reivindicación 1, en donde el conjugado entre el quelante y el agente que simula glucosa además comprende un conector entre el quelante y el agente que simula glucosa, en particular en donde el conector es un péptido, ácido glutámico, ácido aspártico, bromoetilacetato, etilendiamina, lisina, o cualquier combinación de uno o más de estos grupos, o en donde el quelante está conjugado a más de un agente que simula glucosa.
10. El método de la reivindicación 1, en donde el agente que simula glucosa es desoxiglucosa, glucosamina, glucosamina tetraacetilada, neomicina, kanamicina, gentamicina, paromicina, amikacina, tobramicina, netilmicina, ribostamicina, sisomicina, micromicina, lividomicina, dibekacina, isepamicina, astromicina, o aminoglucósido.
11. El método de la reivindicación 1 o 10, en donde en la fórmula de la reivindicación 1
- A y D son grupos de tioles protegidos por benzhidrol,
 - B y C son grupos amino secundarios (-NH-) protegidos por Cbz,
 - E y F son cada uno -COOH;
 - R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son cada uno H;
 - X es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$,
 - la conjugación es entre E y F (ambos -COOH) y dos grupos amino primarios desprotegidos de dos ligandos de afinidad específica, en donde los ligandos de afinidad específica son dos agentes que simulan la glucosa, y los agentes que simulan glucosa son cada uno glucosaminas desprotegidas,
- en donde el medio orgánico es DMF, y en donde, después de llevar a cabo la reacción de conjugación, los grupos protectores de A a D se eliminan sometiendo el conjugado intermedio a Na/NH_3 para obtener el conjugado desprotegido (EC-G).
12. Un compuesto para el uso en un método de diagnóstico de una enfermedad, o tratamiento de una enfermedad, en donde el compuesto es un conjugado entre un quelante y un agente que simula glucosa, en donde el agente que simula glucosa comprende glucosamina o desoxiglucosa y en donde el quelante y el agente que simula glucosa están conjugados a través de un enlace amida o un enlace éster, en donde el compuesto se puede obtener mediante el método de la reivindicación 1 o 3 (con etapas (b) y (d)), en donde el conjugado está marcado con un ion metálico seleccionado de ^{99m}Tc , ^{68}Ga , ^{188}Re , platino, y ^{187}Re , y en donde la pureza del conjugado se encuentra entre aproximadamente 70 % (p/p) y aproximadamente 99,9 % (p/p), en particular en donde la pureza del conjugado se encuentra entre aproximadamente 80 % (p/p) y aproximadamente 99,9 % (p/p) o entre aproximadamente 90 % (p/p) y aproximadamente 99,9 % (p/p), y en donde la enfermedad que se pretende diagnosticar, o tratar es un infarto de miocardio, isquemia miocárdica, una insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía, una enfermedad valvular cardíaca, una arritmia, o angina de pecho.
13. El compuesto para el uso de la reivindicación 12, en donde el ion metálico es un radionúclido, o en donde el uso es en un humano.
14. El compuesto para el uso de la reivindicación 12, en donde el método de diagnosticar una enfermedad comprende el diagnóstico por imágenes de un sitio por medio de PET, PET/CT, CT, SPECT, MRI, SPECT/CT, diagnóstico por imágenes ópticas, o ultrasonido.
15. El compuesto para el uso de la reivindicación 12, en donde el método de diagnosticar una enfermedad comprende el diagnóstico por imágenes de un corazón.
16. El compuesto para el uso de la reivindicación 12, en donde el uso es un método de diagnosticar una enfermedad que comprende el diagnóstico por imágenes del corazón y la enfermedad es un infarto de miocardio, isquemia miocárdica, o angina de pecho.

17. El compuesto para el uso de la reivindicación 12, en donde el compuesto marcado con ion metálico es ^{99m}Tc -EC-glucosamina, ^{188}Re -EO-glucosamina o ^{187}Re -EO-glucosamina.
- 5 18. Un método de diagnóstico por imágenes del corazón de un sujeto al que se ha administrado un compuesto,
- 10 en donde el compuesto es un conjugado entre un quelante y un agente que simula glucosa, en donde el agente que simula glucosa comprende glucosamina o desoxiglucosa y en donde el quelante y el agente que simula glucosa están conjugados a través de un enlace amida o un enlace éster, en donde el compuesto se
- 15 puede obtener mediante el método de la reivindicación 1 o 3 (con etapas (b) y (d)), en donde el conjugado está marcado con un ion metálico seleccionado de ^{99m}Tc , ^{68}Ga , ^{188}Re , platino y ^{187}Re , y en donde la pureza del conjugado se encuentra entre aproximadamente 70 % (p/p) y aproximadamente 99,9 % (p/p), en particular en donde la pureza del conjugado se encuentra entre aproximadamente 80 % (p/p) y aproximadamente 99,9 % (p/p) o entre aproximadamente 90 % (p/p) y aproximadamente 99,9 % (p/p), y en donde el método comprende el diagnóstico por imágenes del corazón.

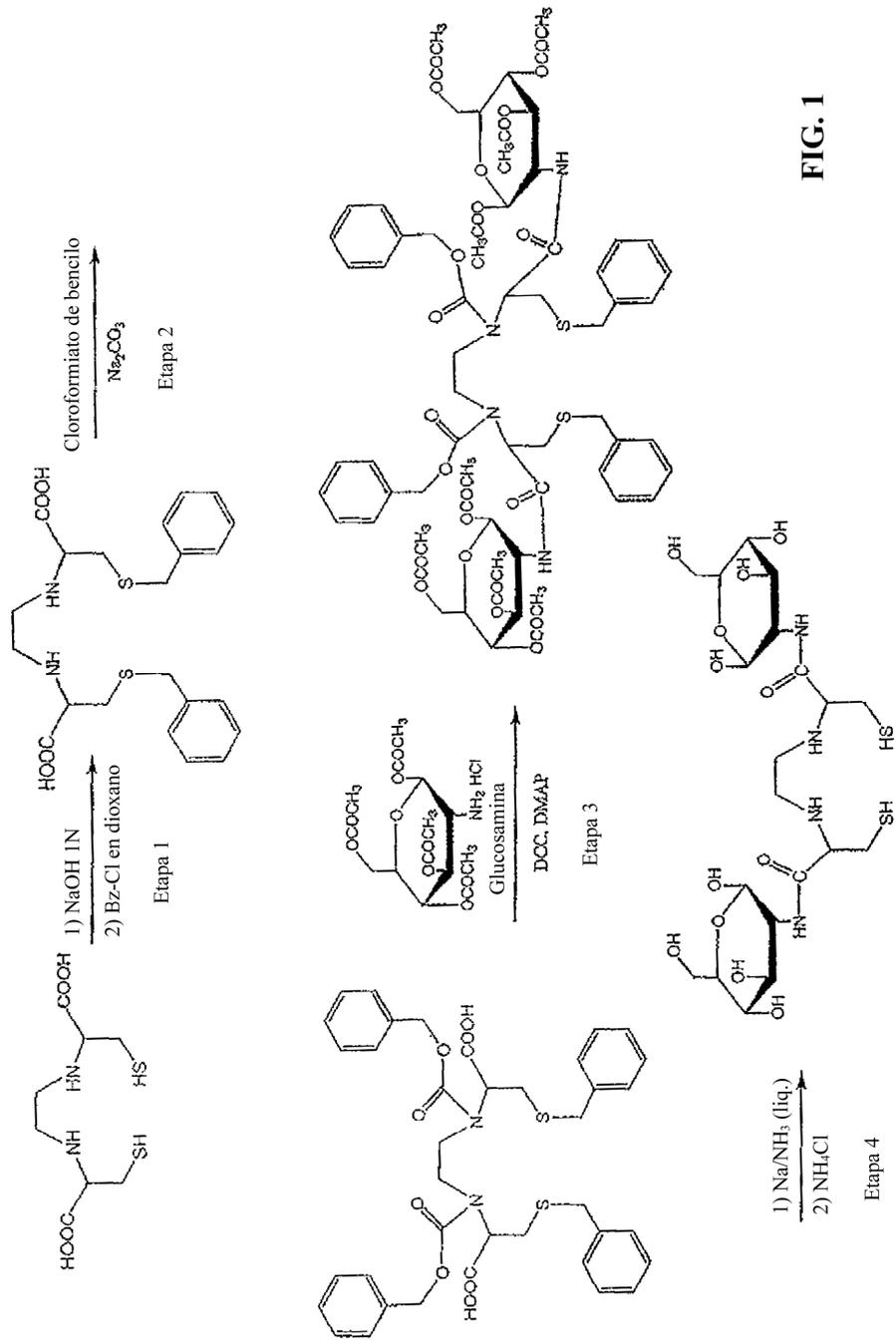


FIG. 1

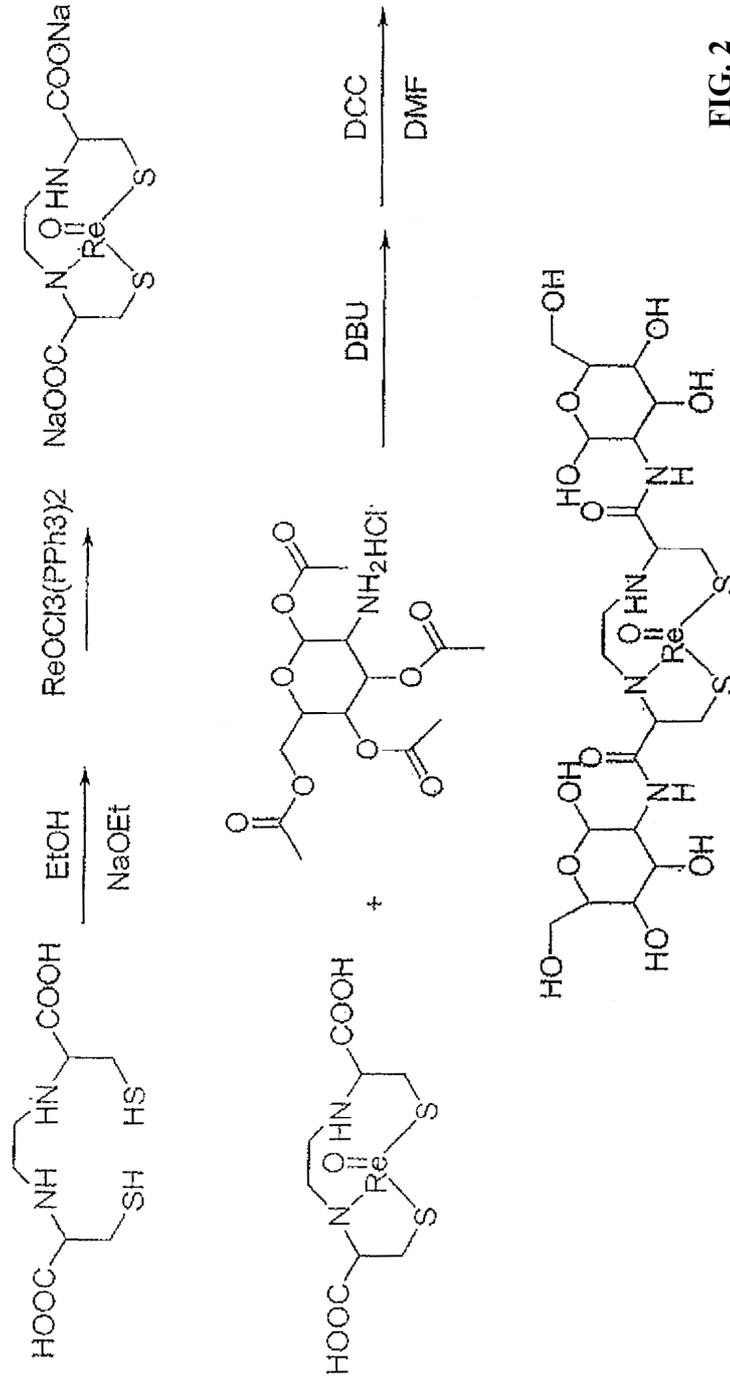


FIG. 2

FIG. 3

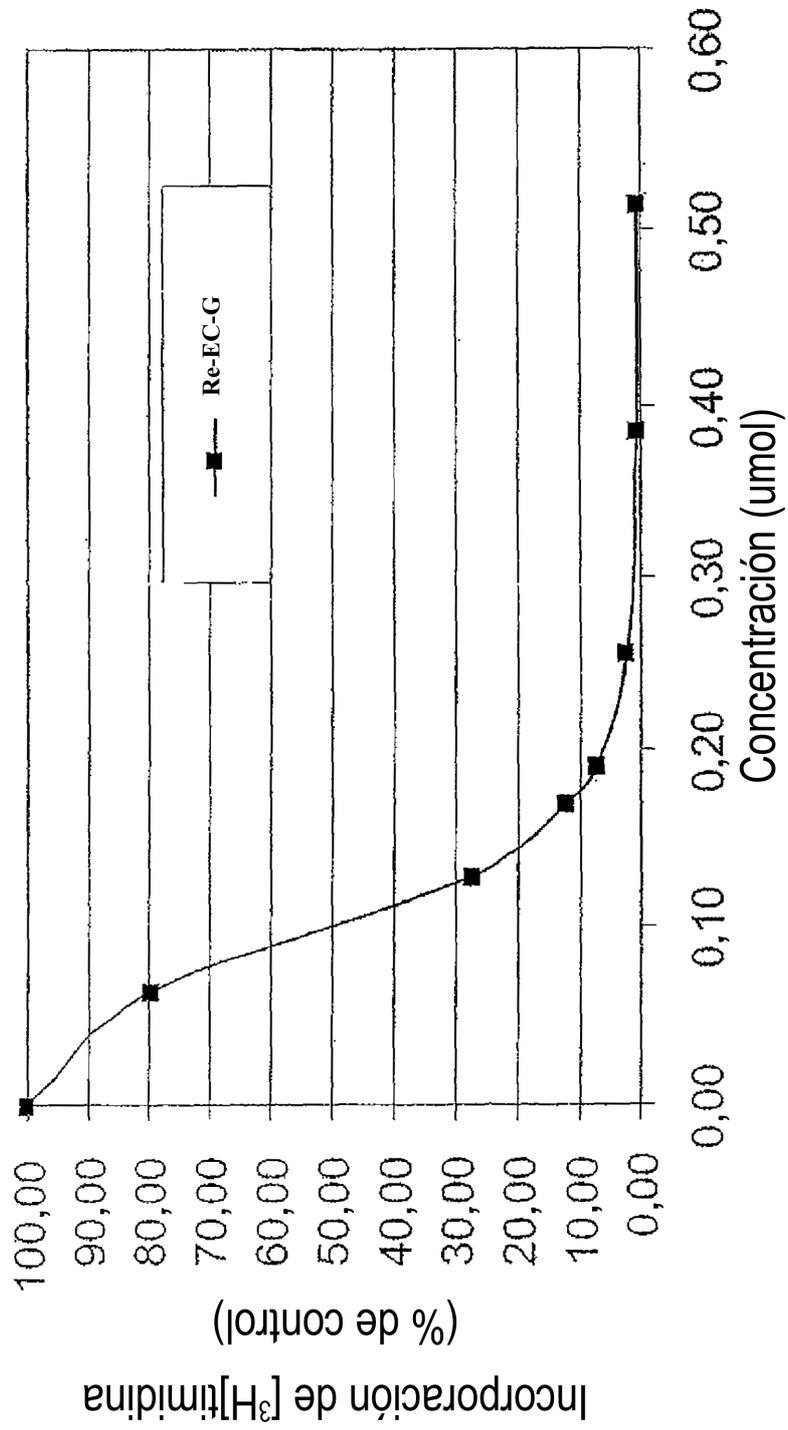


FIG. 4

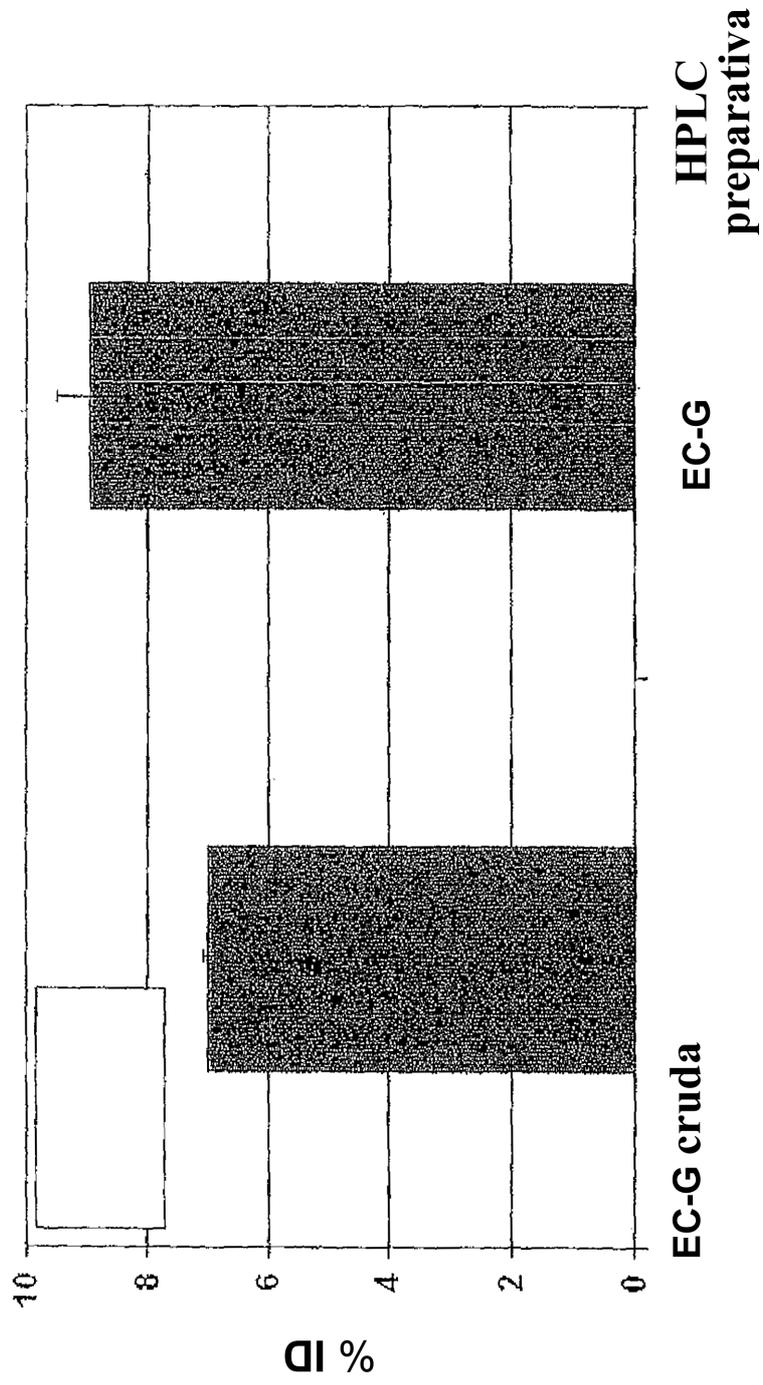
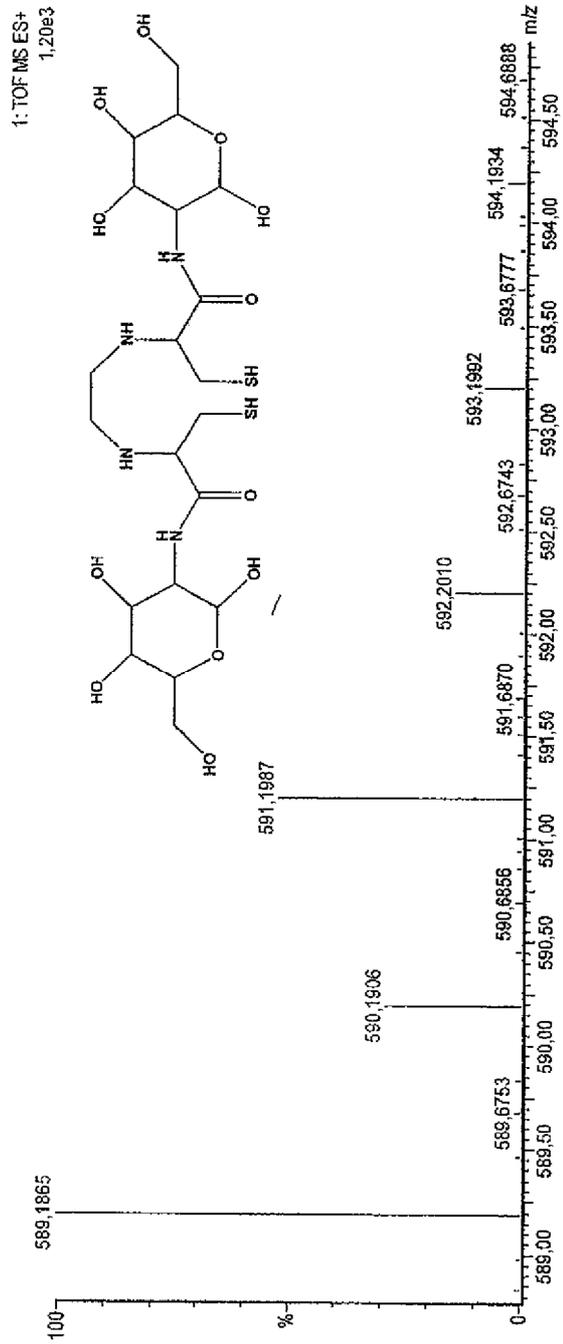


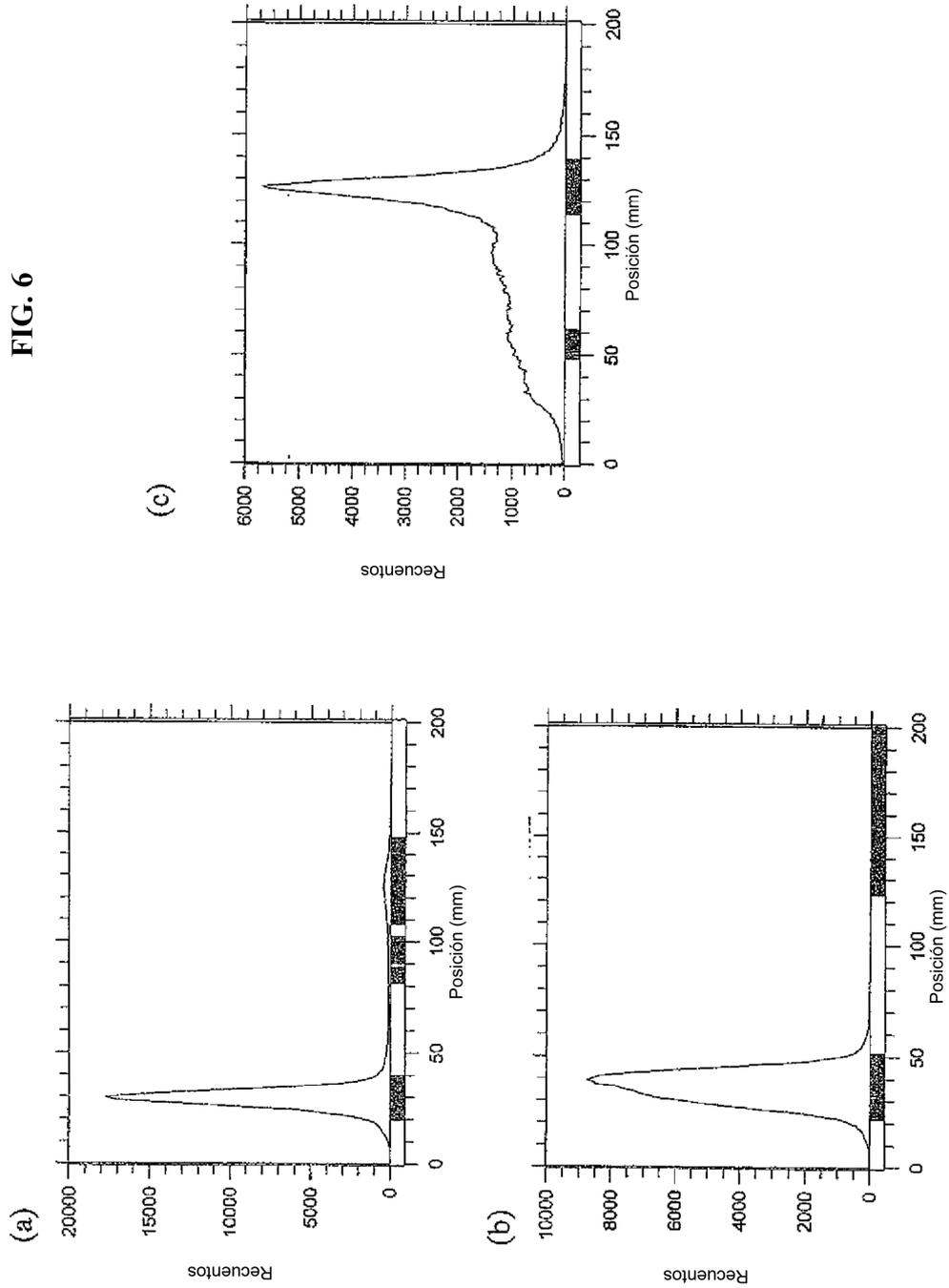
FIG. 5



EC-G

MF: $C_{20}H_{38}N_4O_{12}S_2$
 $[M + H]^+ m/z_{calc.}: 591,2006$

FIG. 6



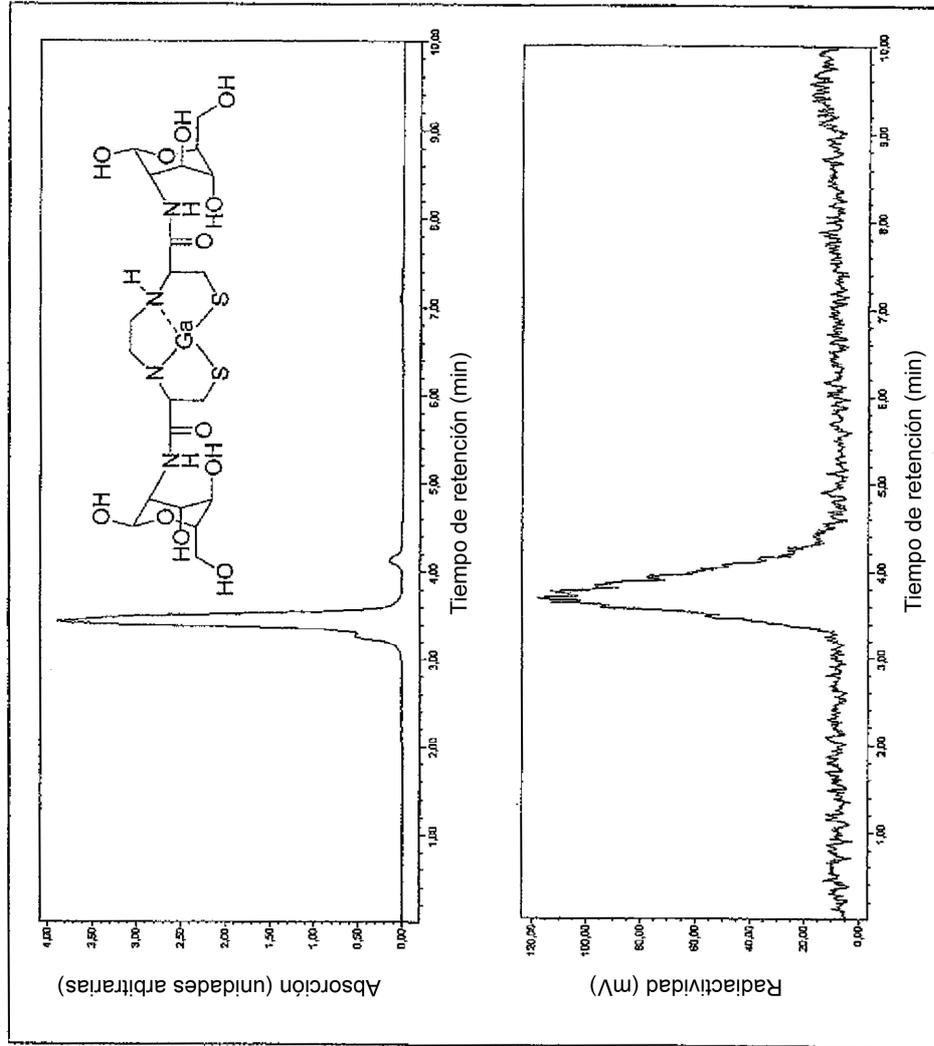


FIG. 7

(a)

(b)

FIG. 8A

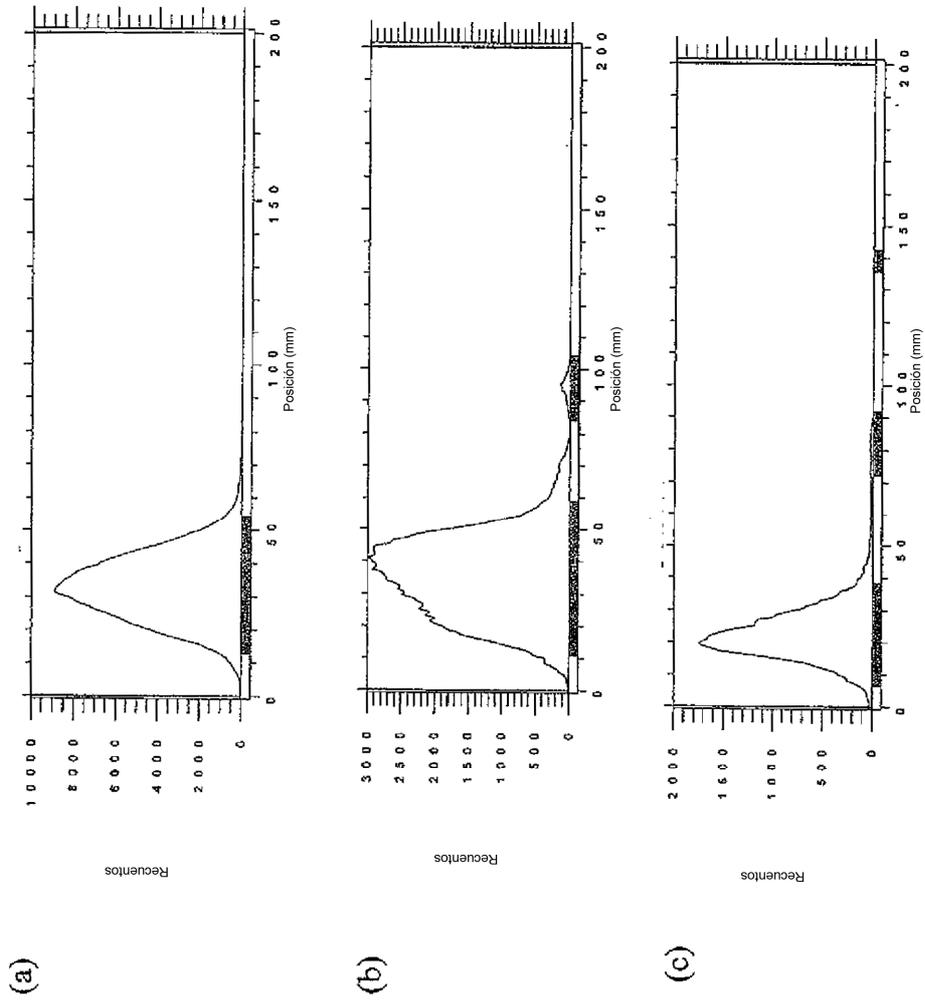
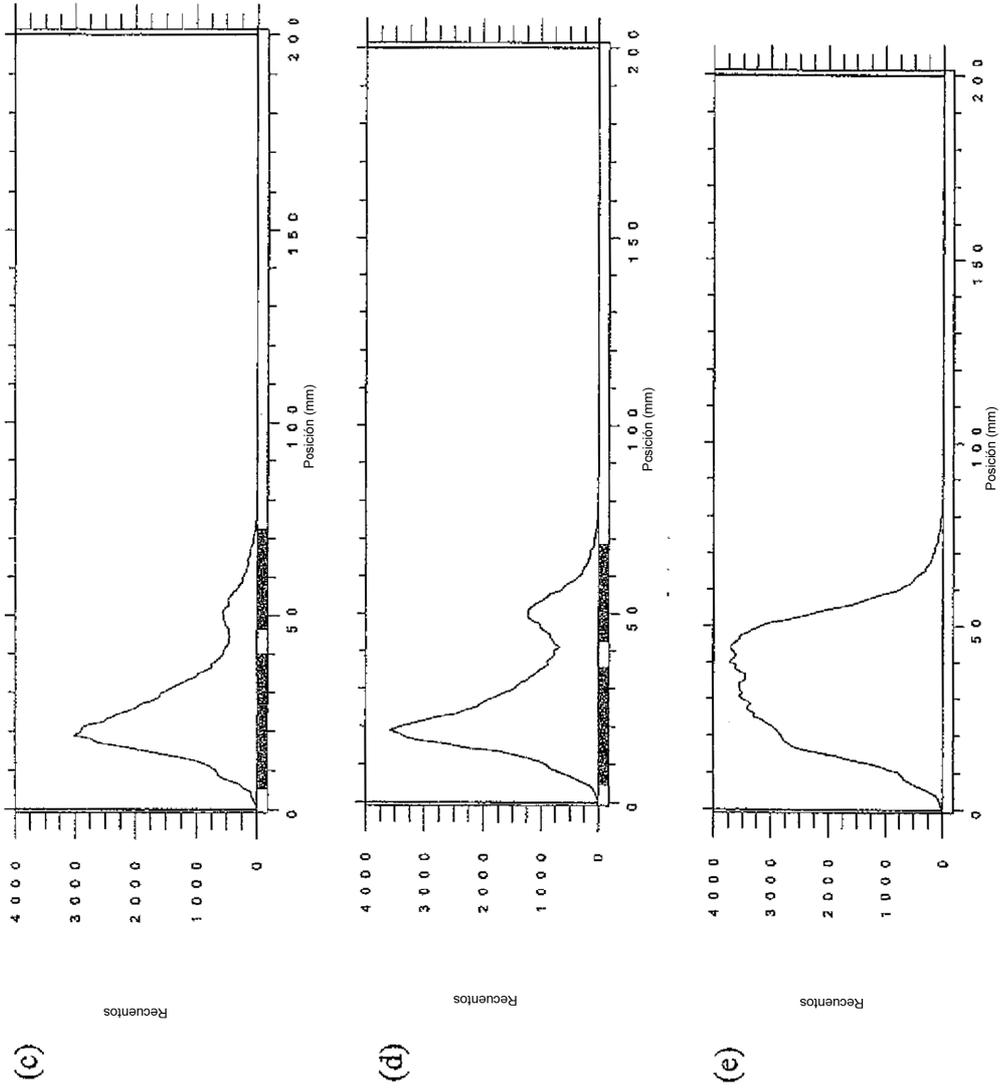


FIG. 8B



ensayo de unión de proteínas

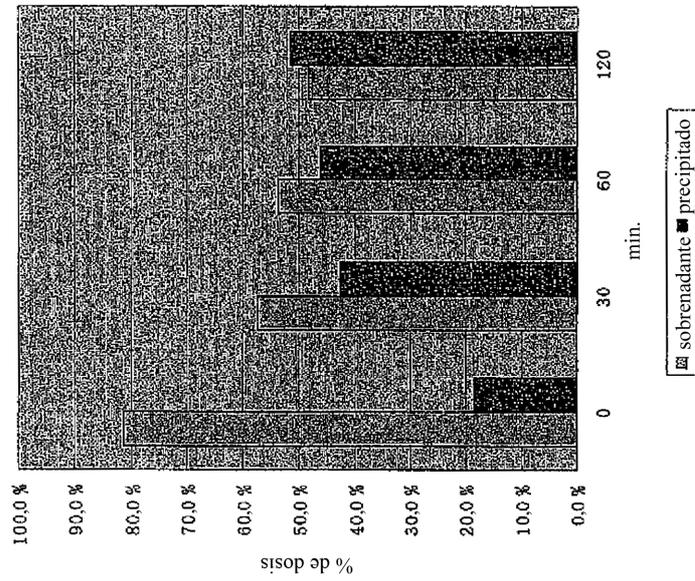


FIG. 9

| | TIEMPO DE INCUBACIÓN (MIN) | | | | | | GA-EC-BSA | |
|--------------|----------------------------|--------|--------|------|------|--------|-----------|--------|
| | 0 | 30 | 40 | 50 | 60 | 120 | | |
| SOBRENADANTE | 92,4 | 57,5 % | 48,4 % | 23,2 | 23,2 | 48,4 % | 77,6 | 93,5 % |
| PRECIPITADO | 21,1 | 42,5 % | 51,6 % | 76,8 | 76,8 | 51,6 % | 5,4 | 6,5 % |

FIG. 10

Fig. 10: Estudio de absorción in vitro de compuestos marcados con ^{68}Ga en la línea celular del cáncer de mama 13762

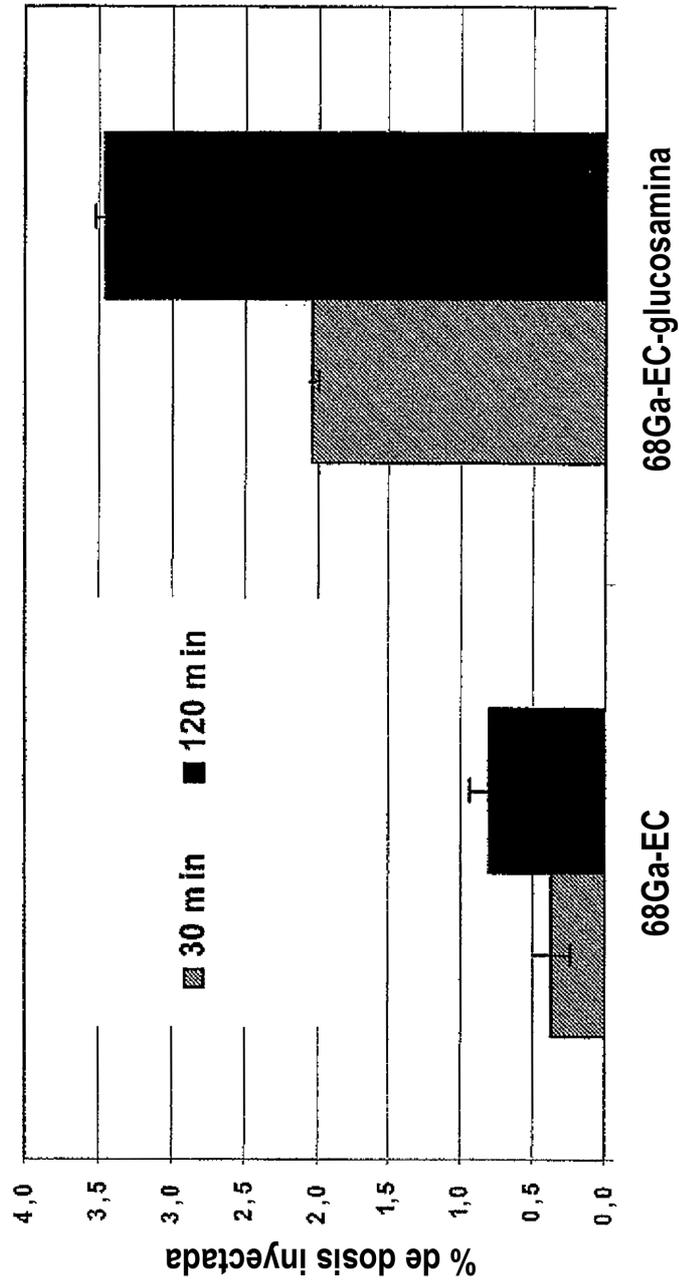


FIG. 11

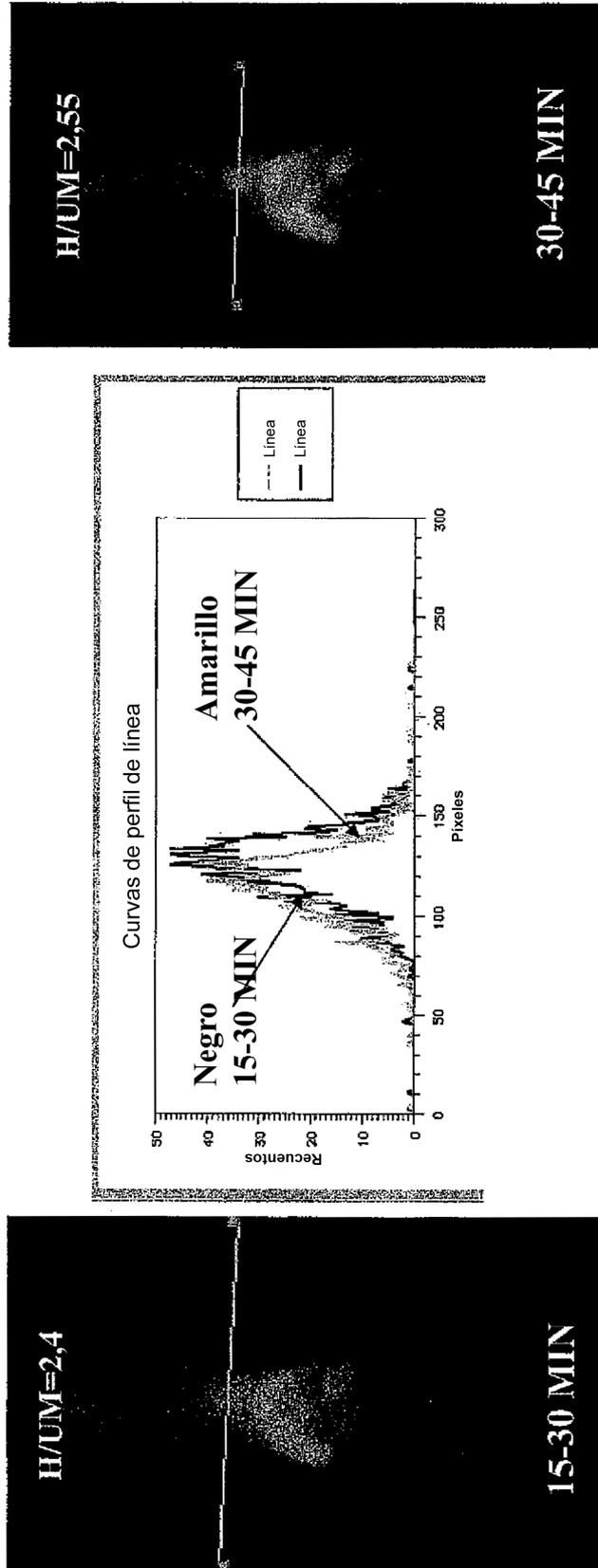


FIG. 12

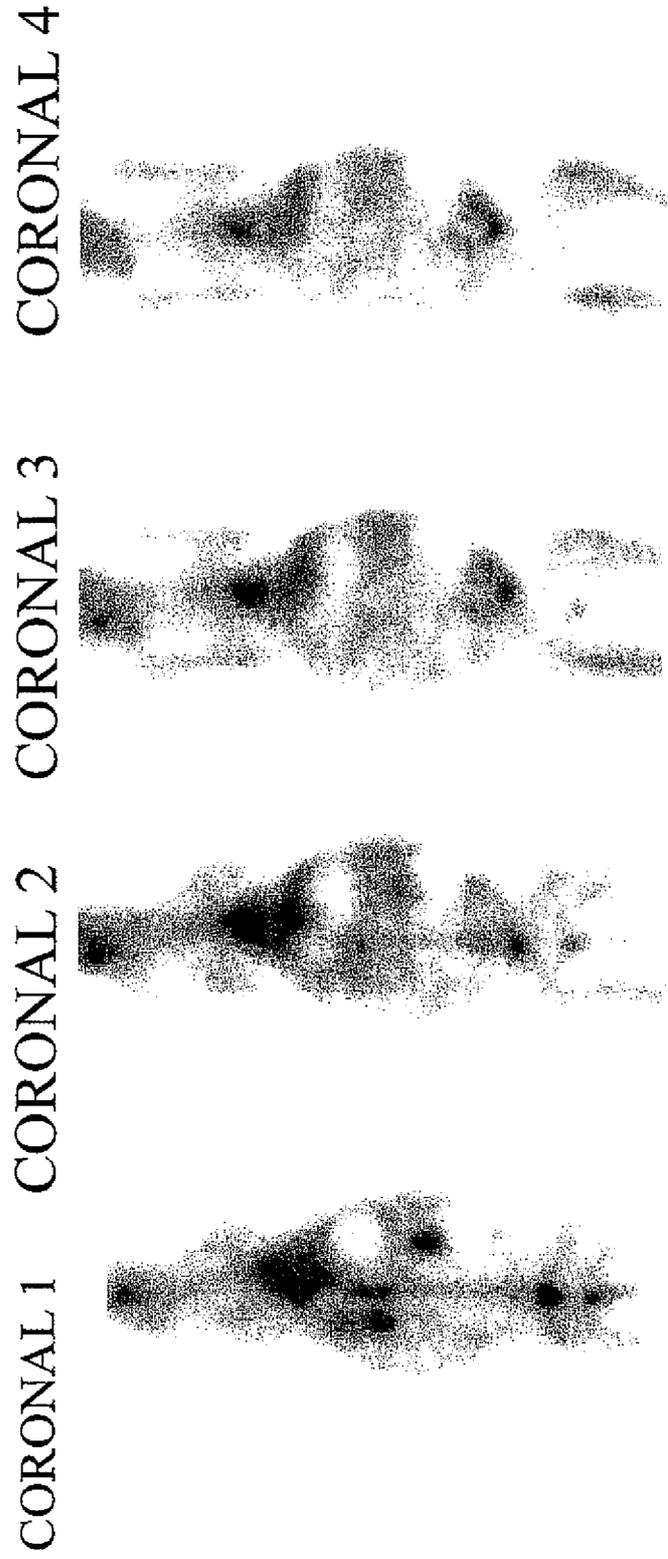


FIG. 13

