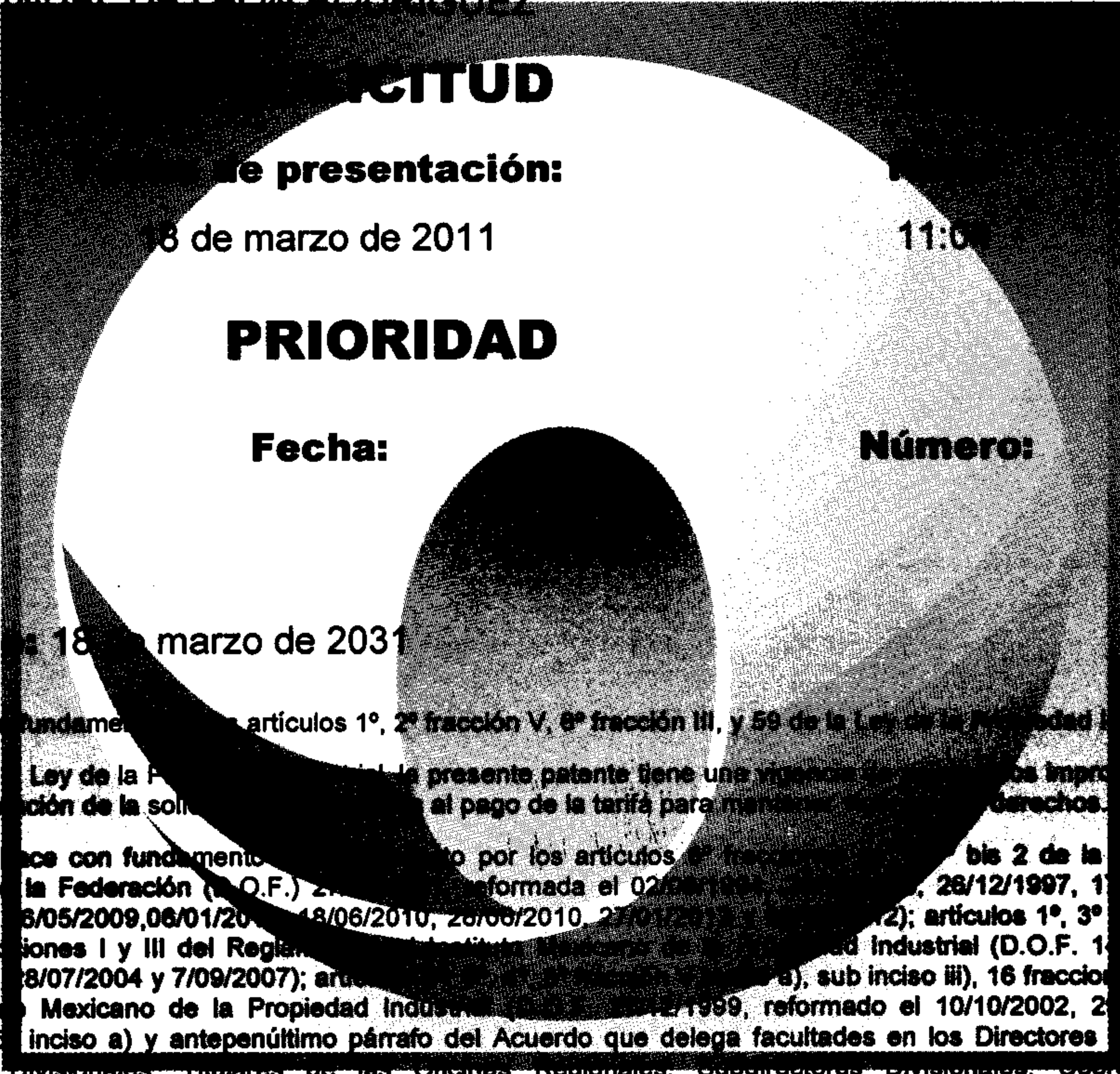




# TÍTULO DE PATENTE NO. 335007

**Titular(es):** UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO  
**Domicilio:** Lascuráin de Retana No. 5, Colonia Centro, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MÉXICO  
**Denominación:** AGENTES DE CONTRASTE Y TERAPEUTICOS BICÍLICOS.  
**Clasificación:** Int.Cl.8: A61K49/00; A61K49/04; A61K49/06; A61K49/22; C07D451/00; C07D477/00; C07D487/00  
**Inventor(es):** LUIS MANUEL DE LEÓN RODRÍGUEZ



La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.  
De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial la presente patente tiene una vigencia de los derechos improporcionables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud, hasta el pago de la tarifa para mantener los derechos.  
Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracción I, 16 bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 26/12/1997, 15/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 16/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 26/06/2010, 23/01/2011, 12/02/2011, 12/02/2011); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso III) 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 01/07/2002, 05/07/2004, 18/07/2004 y 7/09/2007); artículo 1º inciso a), sub inciso iii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 10/10/2002, 25/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º incisos a) y antepenúltimo párrafo del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 15 de septiembre de 2014

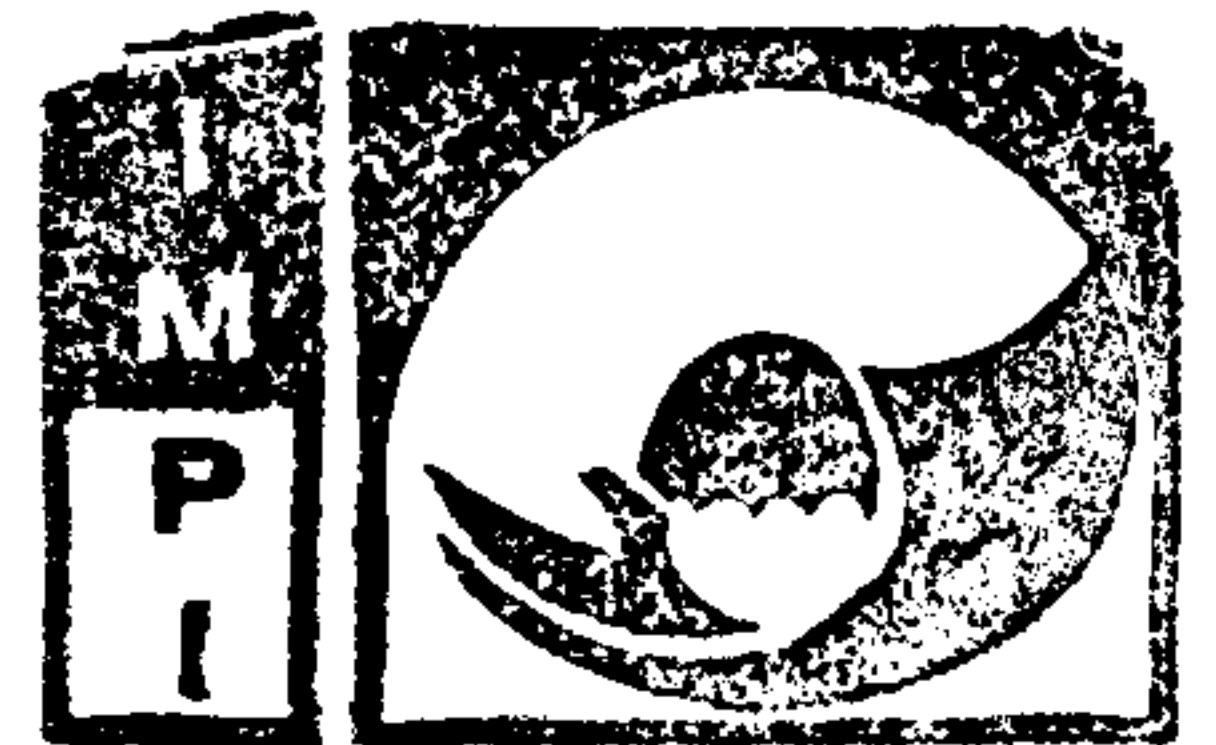
**SUBDIRECTOR DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES, ÁREAS MECÁNICA, ELÉCTRICA Y DE REGISTRO DE DISEÑOS INDUSTRIALES Y**

**MODELOS DE UTILIDAD**

**PEDRO DAVID TRAGOSO LÓPEZ**



## AGENTES DE CONTRASTE Y TERAPEUTICOS BICÍCLICOS



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

### DESCRIPCIÓN

#### OBJETO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se relaciona a compuestos bicíclicos constituidos por tetra y tri-aza ciclocompuestos y péptidos y sus modos de obtención, estos productos presentan utilidad en aplicaciones de diagnóstico y terapia médica como agentes de contraste y terapéuticos.

#### ANTECEDENTES

- 10 El diagnóstico y tratamiento de enfermedades con alto índice de fatalidad es de gran importancia dado su impacto en los sistemas de salud. En este respecto las técnicas de imagen son herramientas que permiten realizar diagnóstico de diversas enfermedades entre ellas cáncer. Como ejemplos se puede mencionar la resonancia magnética de imagen (MRI), técnicas radiológicas como los Rayos X, la tomografía de emisión de positrones
- 15 (PET), la tomografía computarizada (CT), la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), el ultrasonido y técnicas ópticas. En la mayoría de las técnicas de imagen mencionadas se emplean agentes de contraste, los cuales permiten incrementar el contraste de zonas del cuerpo de forma inespecífica. Los agentes de contraste empleados en MRI, PET, SPECT, CT y técnicas ópticas están constituidos por un ión metálico ya sea
- 20 paramagnético como  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ , Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Ho, Er, Lu e Y o un ión metálico radioactivo tal como  $^{111}In^{3+}$ ,  $^{113m}In^{3+}$ ,  $^{67}Ga^{3+}$ ,  $^{68}Ga^{3+}$ ,  $^{99m}Tc^{4+}$ ,  $^{64}Cu^{2+}$ ,  $Tl^{3+}$ ,  $^{153}Sm^{3+}$ ,  $^{166}Ho^{3+}$  and  $^{212}Bi^{3+}$ ,  $^{90}Y^{3+}$ ,



$^{177}\text{Lu}^{3+}$ ,  $^{225}\text{Ac}^{3+}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,

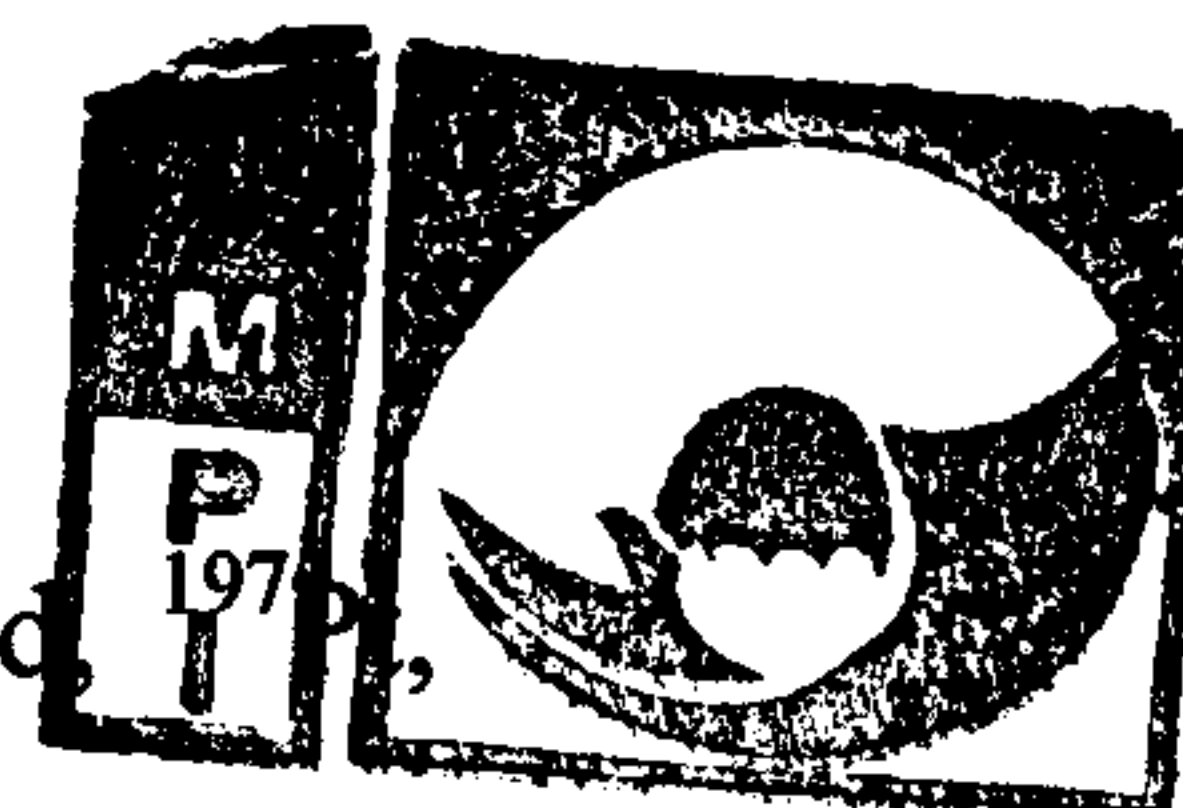
$^{67}\text{Cu}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ , y  $^{212}\text{Pb}$ . Dada la toxicidad de la mayoría de los metales citados es de

suma importancia que este se encuentre en forma de complejo con un ligante y uno

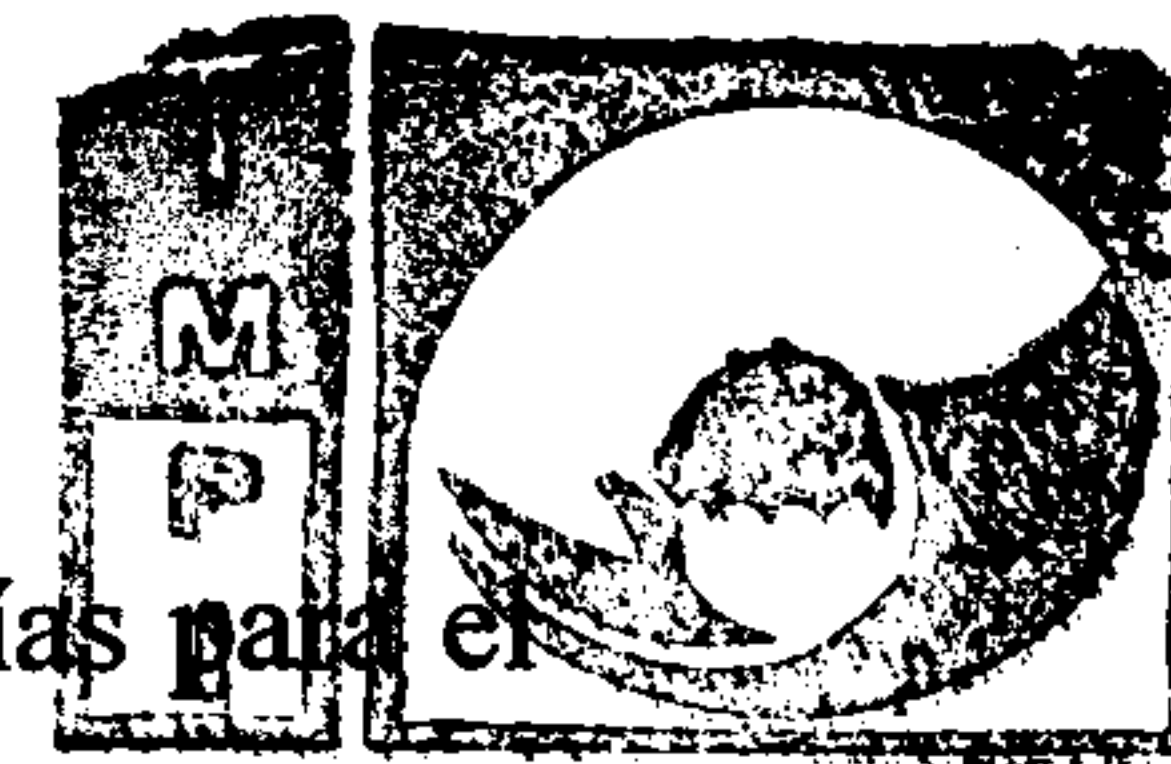
complejo debe ser tanto termodinámica como cinéticamente estable a condiciones

5 fisiológicas. Dentro de los ligantes se ha puesto especial interés en el desarrollo de  
compuestos aza macrocíclicos en particular derivados de cyclen (1,4,7,10  
tetraazaciclododecano) principalmente DOTA (ácido-N,N',N'',N'''-1,4,7,10  
tetraazaciclododecano tetracético) y sus derivados, los cuales se caracterizan por formar  
complejos muy estables con diferentes metales particularmente de transición y de la serie  
10 de los lantánidos. Dentro de los agentes de contraste derivados de DOTA empleados en el  
área clínica se tiene GdDOTA (Dotarem), y Gd-HP-DO3A (Prohance). Ambos son  
empleados en MRI son administrados por vía intravenosa y sus aplicación principal es en la  
obtención de imágenes de cuerpo completo y cerebro. En específico estos agentes  
incrementan el contraste de aquellas regiones donde se acumulan por más tiempo de forma  
15 no específica.

Recientemente ha surgido el interés por desarrollar agentes de contraste bioespecíficos, es  
decir agentes que generen un contraste de la imagen dada la interacción específica con una  
proteína, receptor celular o en general macromolécula (De León-Rodríguez, L.M. et al. J.  
Am. Chem. Soc. 2002, 124, 3514-3515). Este tipo de agentes bioespecíficos pueden ser  
20 aplicados en el seguimiento de terapia génica (dada la manifestación de una proteína), para  
el desarrollo de agentes terapéuticos y/o de contraste altamente específicos que permitan el  
tratamiento y estudio de enfermedades prevalentes (cáncer, SIDA, etc.) y/o seguimiento de  
efectividad de nuevos fármacos. En la actualidad se propone la utilización de péptidos



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial



como especies de reconocimiento bioespecífico dado la existencia de metodologías para el monitoreo y determinación de secuencias peptídicas con alta bioespecificidad y su síntesis relativamente simple. La síntesis de péptidos en fase sólida versión Fmoc, SPFS Fmoc (Chan, W.C: Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis A practical approach. Oxford University

5 Press, 2000) es una metodología que permite la producción de péptidos químicamente modificados.

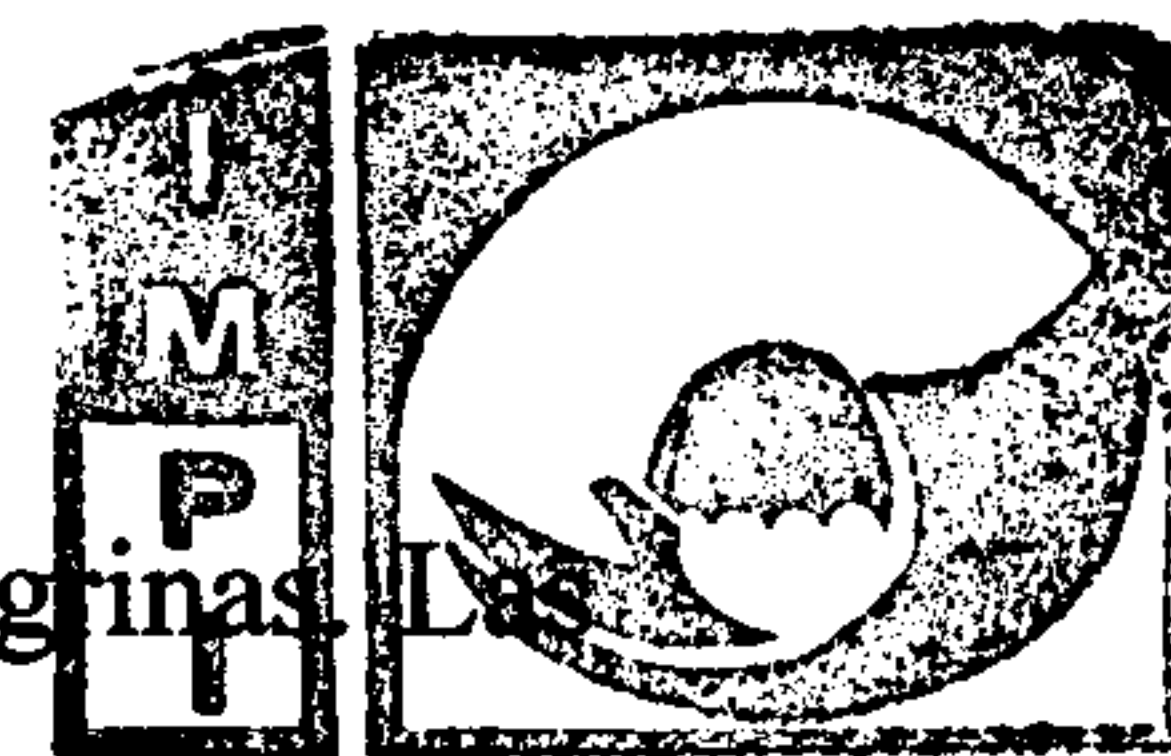
Los agentes de contraste bioespecíficos basados en péptidos reportados en la literatura se obtienen uniendo covalentemente DOTA o ligante aza macrocíclico al péptido mediante uno de los ácidos carboxílicos del primero al grupo amino terminal del péptido o a la

10 cadena lateral de uno de los aminoácidos presentes en la secuencia del péptido, generalmente el grupo amino epsilon de lisina y en seguida se forma el complejo con el metal de interés.

El diseño anterior presenta varias limitantes entre estas cabe resaltar que péptidos con aminoácidos L no modificados son hidrolizados muy rápidamente in vivo lo que se traduce

15 en que el agente de contraste no alcance su sitio bioespecífico. Solución a esta problemática se ha logrado al introducir aminoácidos D en la secuencia del péptido, bloqueando químicamente sitios activos a proteasas, ciclando el péptido y/o empleando aminoácidos beta (beta péptidos) o N-aminoácidos (peptoides). El uso de péptidos o peptoides cíclicos es preferido dada su mayor resistencia a proteasas, de tal forma que en la actualidad se

20 encuentran varios ciclopéptidos propuestos para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades tales como derivados de somatostatina y cilcopéptidos que contienen la secuencia de aminoácidos (arginina, Arg; glicina, Gly; y ácido aspártico, Asp). Ciclopentapéptidos (ArgGlyAspxLys, RGDxK, donde x es DTry o DPhe) que contienen la



secuencia RGD se enlazan específicamente a proteínas de la familia de las integrinas. Las

integrinas son glicoproteínas heterodiméricas transmembranales con subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que juegan un papel muy importante en interacciones intercelulares y entre células y la

Por lo tanto algunas integrinas (como ejemplo  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$  y  $\alpha v \beta 1$ ) tienen un rol esencial

dentro de diversos procesos patológicos tales como angiogénesis, metástasis, trombosis, inflamación y osteoporosis (G. Casiraghi, Curr. Med. Chem. 2010, 17:1255-1299).

Las técnicas de radioimagen PET; SPECT, CT presentan una mayor sensibilidad (1000 o 10000 veces) que la MRI, lo que significa que la cantidad de agente de contraste a ser administrada al sujeto de estudio es mucho menor para técnicas de radioimagen que para

MRI (se inyectan alrededor de microgramos de un agente de contraste a un sujeto de peso de 70 Kg para una estudio de radioimagen y entre miligramos hasta gramos para un estudio de MRI) sin embargo, esta última presenta una mejor resolución. De aquí que los agentes

de contraste bioespecíficos empleados para radiodiagnóstico en lo general no tienen utilidad práctica como agentes de contraste en MRI. Por lo tanto es de gran interés el contar

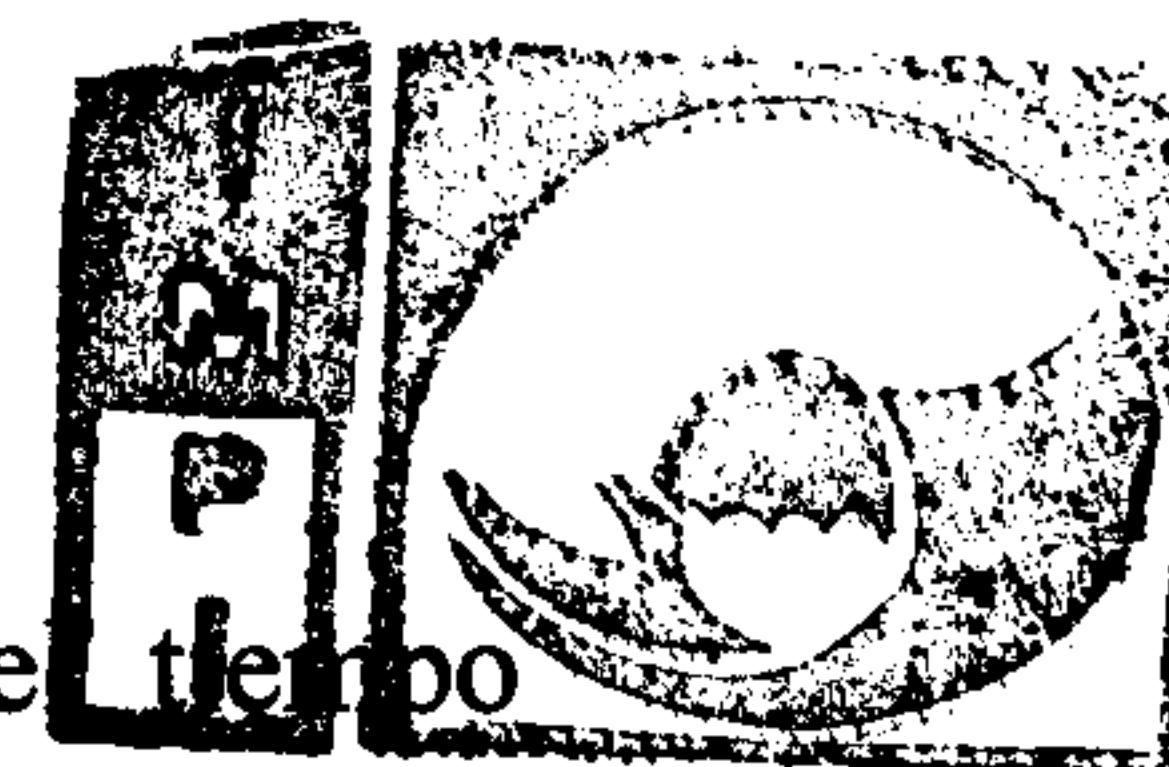
con agentes de contraste más sensibles para MRI que puedan ser empleados tanto en MRI como en técnicas de radioimagen. Existen varios factores fisico-químicos que se pueden regular para alcanzar una alta sensibilidad en MRI mediante el uso de agentes de contrastes,

entre estos los tiempos de rotación correlacionad que tenga el complejo final unido al péptido al interaccionar con la macromolécula (proteína) son los más fáciles de modular

dado un prediseño apropiado del agente de contraste. Los tiempos de rotación correlacional se definen como el tiempo que tarda en girar una molécula 360 grados por su centro geométrico tomando un punto de referencia, y acorde a la teoría de relajación entre más

lenta es esta rotación mayor será el contraste en MRI y por tanto menor la cantidad de





Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

agente de contraste requerida. Así como es esperado se ha observado que el tiempo rotacional generalmente se incrementa dado el proceso de unión entre el agente de contraste y una macromolécula, sin embargo estos tiempos no son los óptimos esperados lo cual se atribuido a la libre rotación que existe por la cadena lateral que une al complejo con el péptido como es el caso de lisinas (Caravan, P. et al. Chem. Comm. 2003, 2574). De tal forma que para resolver este problema se ha sugerido el incorporar el Gd(III) dentro del péptido sin utilizar ligantes, sin embargo aunque dicha técnica podría mejorar la sensibilidad de los sistemas generados esta grandemente limitada a péptidos que puedan formar complejos estables termodinámicamente con el metal, de tal forma que el empleo de ligantes es preferido.

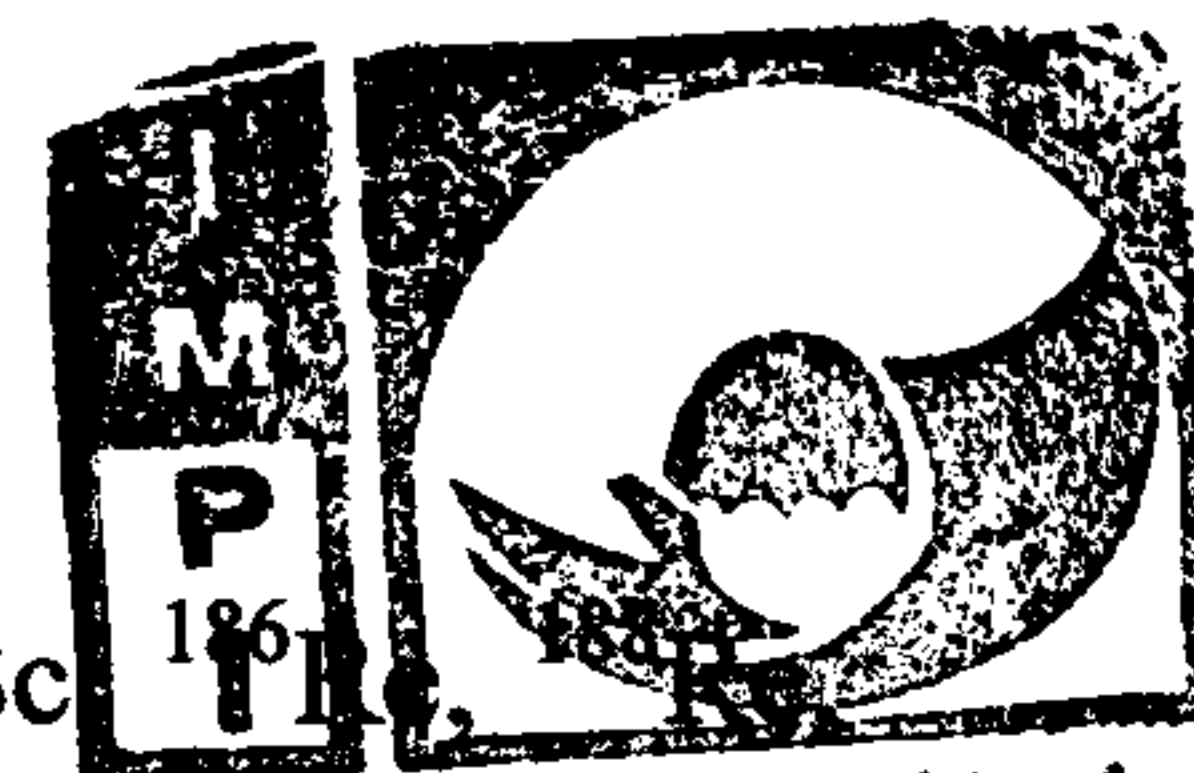
### OBJETOS DE LA INVENCION

Teniendo en cuenta los defectos de las técnicas anteriores así como la carencia de procesos para lograr las metas señaladas es objeto de la siguiente invención el desarrollar procesos para la síntesis de compuestos bicíclicos en donde uno de los ciclos es un compuesto macrocíclicos tetraaza derivatizado o no y el otro ciclo esta constituido por un péptido, peptoides u otra entidad que de propiedades de reconocimiento específico.

Otro objeto de la siguiente invención es el generar moléculas bicíclicas de macrocíclicos tetraaza y péptidos, peptoides u otra unidad que sirvan como ligantes para formar complejos con metales ya sea paramagnéticos como  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ , Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Ho, Er, Lu e Y o un ión metálico radioactivo tal como  $^{111}In^{3+}$ ,  $^{113m}In^{3+}$ ,  $^{67}Ga^{3+}$ ,  $^{68}Ga^{3+}$ ,  $^{99m}Tc^{4+}$ ,  $^{64}Cu^{2+}$ ,  $Tl^{3+}$ ,  $^{153}Sm^{3+}$ ,

$^{166}\text{Ho}^{3+}$  and  $^{212}\text{Bi}^{3+}$ ,  $^{90}\text{Y}^{3+}$ ,  $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ,  $^{225}\text{Ac}^{3+}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$

$^{97}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{197}\text{Pt}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ , y  $^{212}\text{Pb}$ .



Instituto  
Mexicano

de la Propiedad  
Industrial

Otro objeto de la siguiente invención es generar agentes de contraste bicíclicos constituidos

por macrocíclicos tetraaza y péptidos, peptoides u otra unidad unidos a un metal

5 paramagnético como  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,

$\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ce}$ ,  $\text{Pr}$ ,  $\text{Nd}$ ,  $\text{Pm}$ ,  $\text{Sm}$ ,  $\text{Ho}$ ,  $\text{Er}$ ,  $\text{Lu}$  e  $\text{Y}$  para su aplicación como agentes de

contraste en Resonancia Magnética de Imagen.

Otro objeto de la siguiente invención es generar agentes de contraste bicíclicos constituidos

por macrocíclicos tetraaza y péptidos, peptoides u otra unidad unidos a un ión metálico

10 radioactivo tal como  $^{111}\text{In}^{3+}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}^{3+}$ ,  $^{67}\text{Ga}^{3+}$ ,  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{4+}$ ,  $^{64}\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Tl}^{3+}$ ,  $^{153}\text{Sm}^{3+}$ ,  $^{166}\text{Ho}^{3+}$

and  $^{212}\text{Bi}^{3+}$ ,  $^{90}\text{Y}^{3+}$ ,  $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ,  $^{225}\text{Ac}^{3+}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,

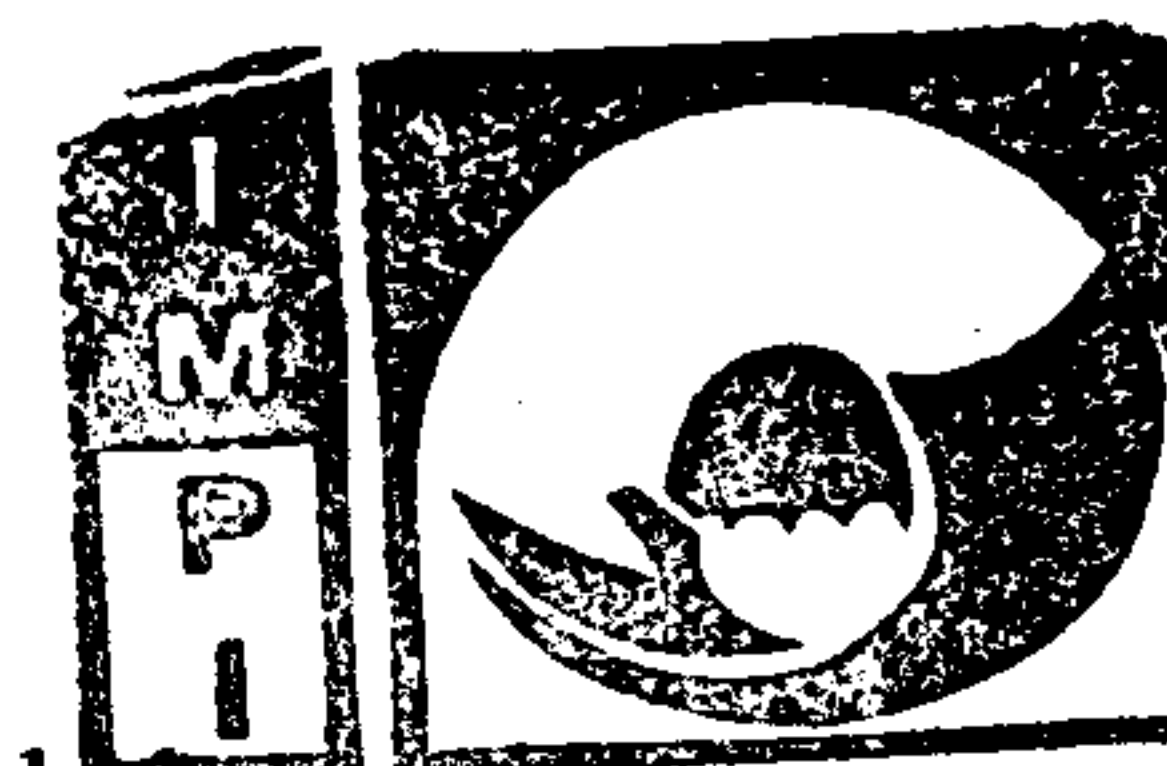
$^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{197}\text{Pt}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ , y  $^{212}\text{Pb}$  para su aplicación como agentes de contraste

en la tomografía de emisión de positrones (PET), la tomografía computarizada (CT), la

tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) así como agentes

15 terapéuticos.

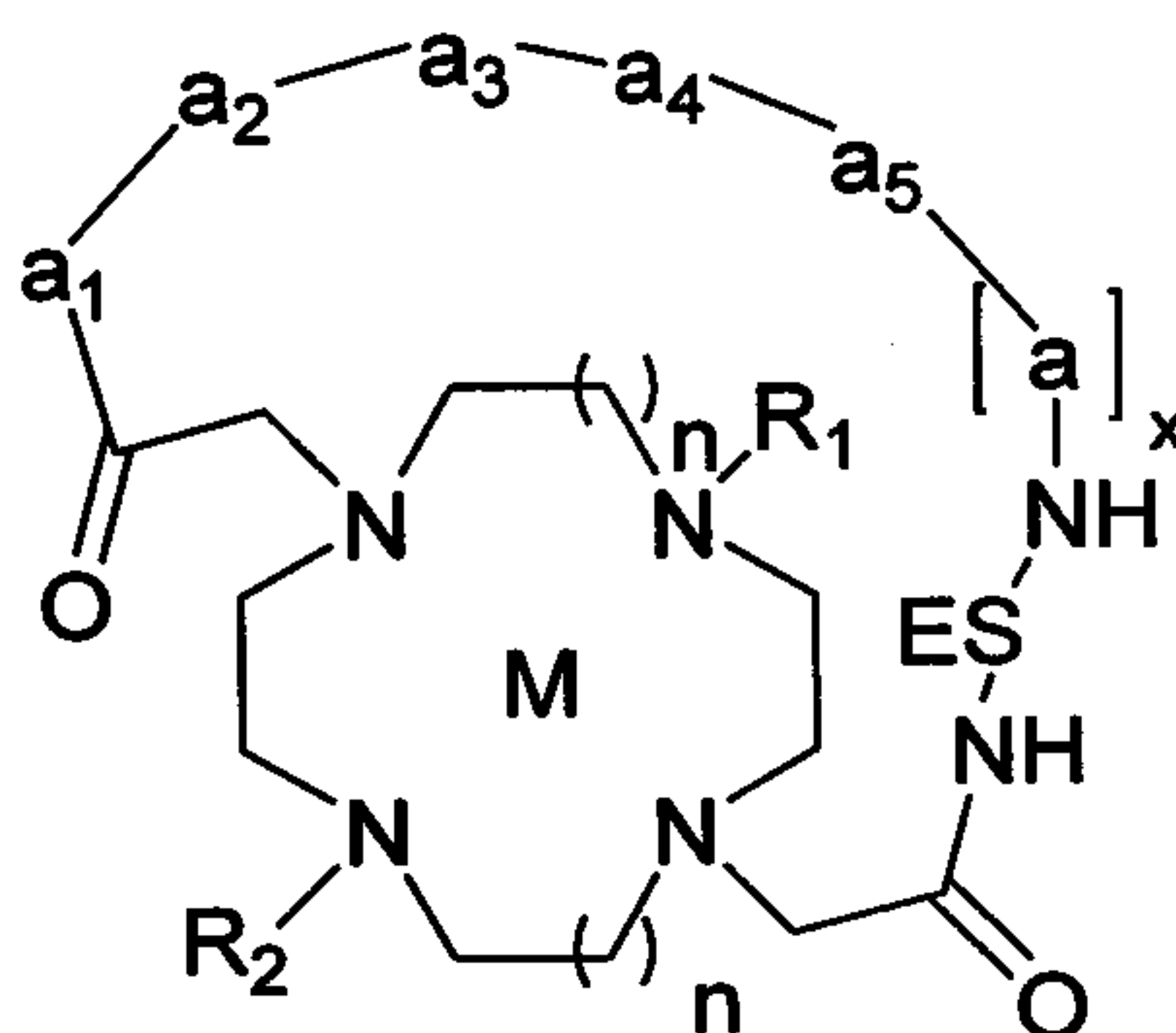
## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION



Dada las necesidades presentadas en el estado de arte de la técnica una parte de la presente invención comprende agentes de contraste o terapéuticos bicíclicos con la fórmula 1

Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

5



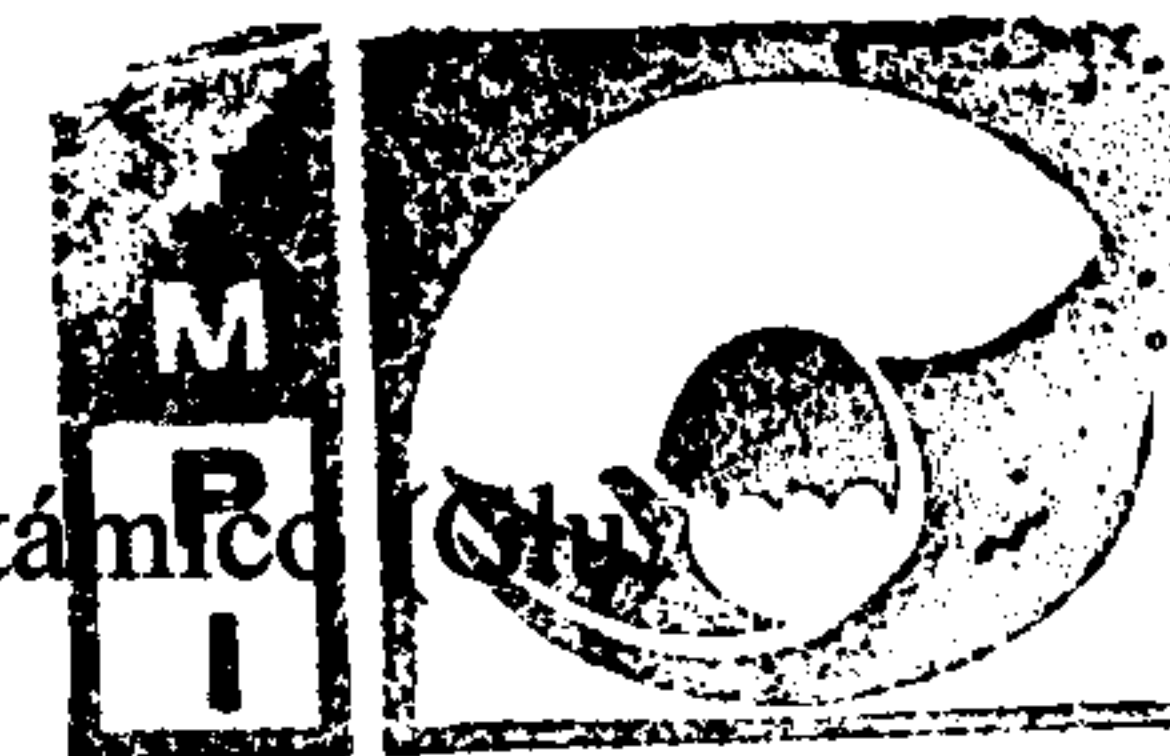
10

-1-

donde uno de los ciclos corresponde a un ligante macrocíclico tetraaza de la familia del cyclen (1,4,7,10-tetraaza ciclododecano) cuando  $n=1$  y si  $n=2$  corresponde a un macrocíclico tetraaza de la familia del cyclam (1,4,8,11-tetraaza ciclotetradecano).  $R_1$  y  $R_2$  consisten de metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos saturados o insaturados de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.  $R_1$  y  $R_2$  pueden ser iguales o no.  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $a_4$ ,  $a_5$  y  $[a]_x$  forman parte del segundo ciclo donde  $x$  puede ser desde 6 hasta 50.  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $a_4$ ,  $a_5$  y  $[a]_x$  están unidos entre si formando enlaces tipo amida. En un aspecto de esta invención  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $a_4$ ,  $a_5$  y  $[a]_x$  comprenden aminoácidos naturales L o D tales como serina (Ser, S), treonina (Thr, T), cisteína (Cys, C), asparagina (Asn, N), glutamina (Gln, Q), tirosina (Tyr, Y), glicina (Gly, G), alanina (Ala, A), valina (Val, V), leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), metionina (Met, M), prolina (Pro, P),

20



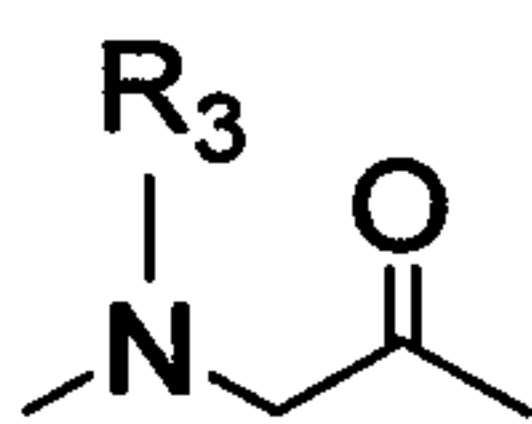


fenilalanina (Phe, F), triptófano (Trp, W), ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E), lisina (Lys, K), arginina (Arg, R) e histidina (His, H) en donde entre paréntesis se indica el código de tres y una letra del aminoácido correspondiente. En otro aspecto de esta invención  $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5$  y  $[a]_x$  comprenden aminoácidos no naturales o químicamente

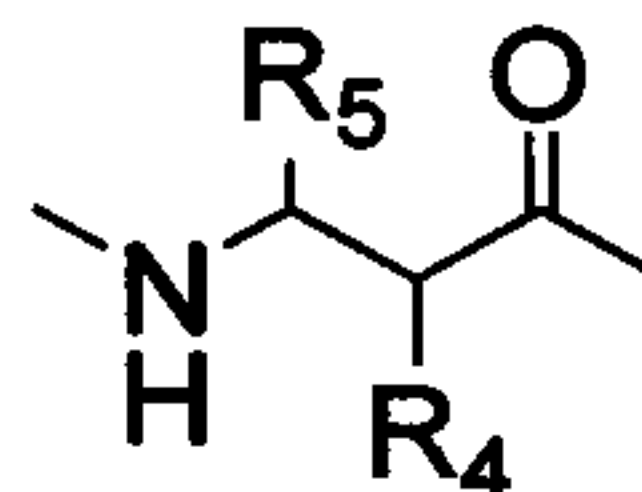
5 modificados L o D. En otro aspecto de esta invención  $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5$  y  $[a]_x$  pueden ser N-aminoácidos según la fórmula 2 donde  $R_3$  son cadenas alifáticas lineales con o sin ramificaciones de hasta 40 carbonos substituidas o no, compuestos cíclicos saturados o insaturados de hasta 8 carbonos substituidos o no, o compuestos policíclicos condensados saturados o insaturados de hasta 8 carbonos por ciclo substituidos o no. En otro aspecto de

10 esta invención  $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5$  y  $[a]_x$  comprenden aminoácidos beta según la fórmula 3 donde  $R_4$  y  $R_5$  comprenden hidrógenos, cadenas alifáticas lineales o ramificadas de hasta 40 carbonos substituidas o no, compuestos cíclicos saturados o insaturados de hasta 8 carbonos substituidos o no, o compuestos policíclicos condensados saturados o insaturados de hasta

15 8 carbonos por ciclo substituidos o no.  $R_4$  y  $R_5$  pueden ser iguales o diferentes estar presentes o no.

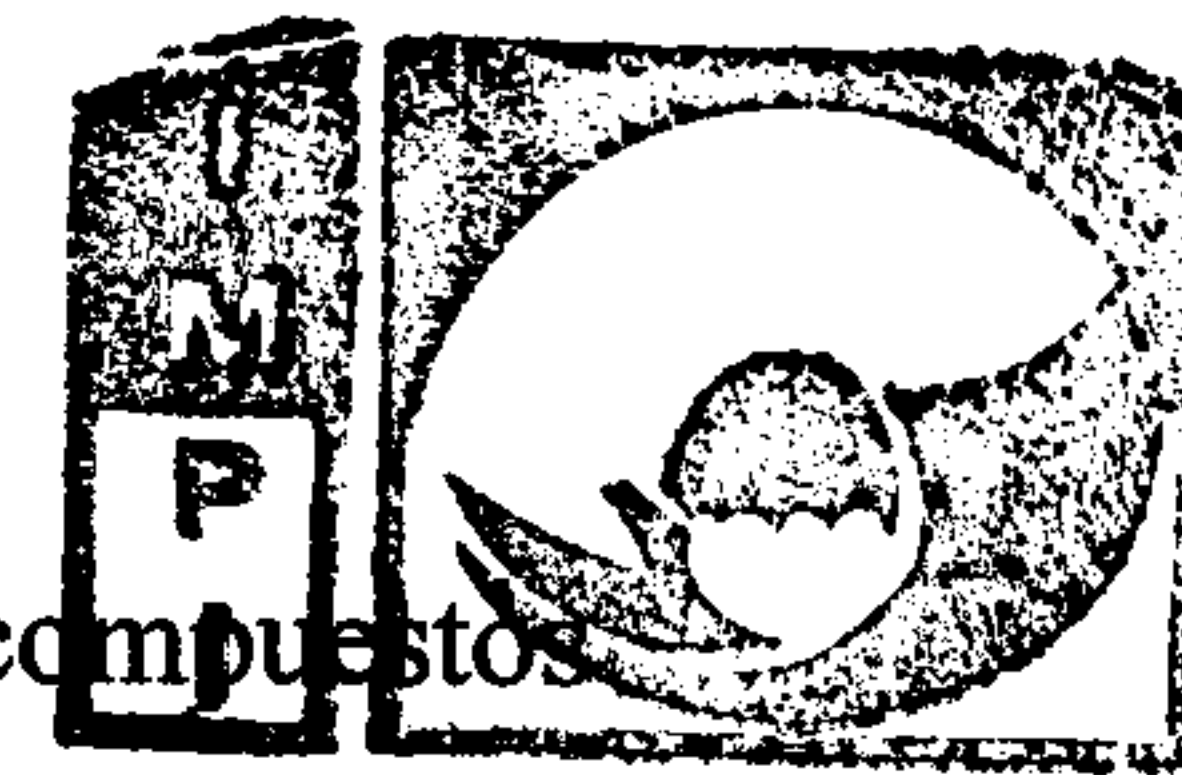


-2-



-3-

20 En otro aspecto de esta invención  $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5$  y  $[a]_x$  consisten en combinaciones de aminoácidos naturales o no naturales L o D, N-aminoácidos y aminoácidos beta definidos anteriormente.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

ES comprende cadenas alifáticas lineales de 2 a 30 carbonos substituidas o no, compuestos cíclicos saturados o insaturados de hasta 8 carbonos substituidos o no, o compuestos policíclicos condensados saturados o insaturados de hasta 8 carbonos por ciclo substituidos o no o cadenas de poliméricas. ES se une a los ciclos a través de enlaces amida por lo cual

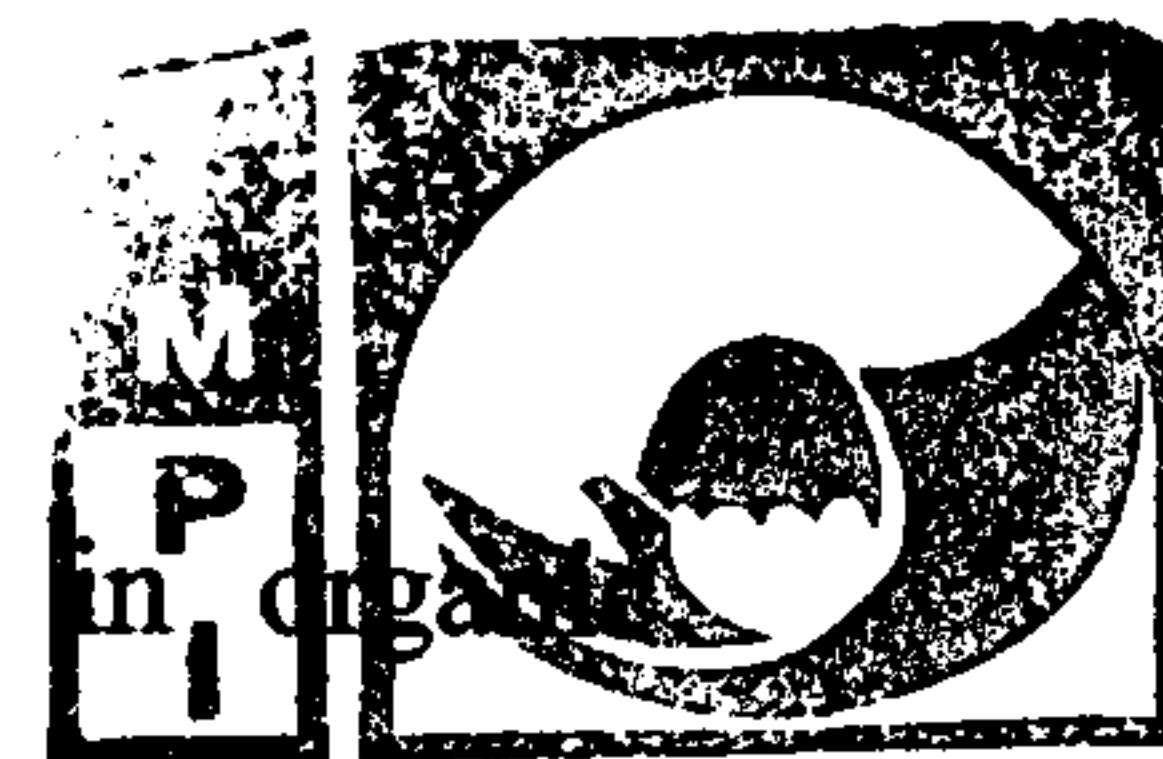
5 ES debe incluir dos grupos amino como se indica en la Figura 1.

M comprende un ión metálico paramagnético como  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ , Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Ho, Er, Lu e Y o un ión metálico radioactivo tal como  $^{111}In^{3+}$ ,  $^{113m}In^{3+}$ ,  $^{67}Ga^{3+}$ ,  $^{68}Ga^{3+}$ ,  $^{99m}Tc^{4+}$ ,  $^{64}Cu^{2+}$ ,  $Tl^{3+}$ ,  $^{153}Sm^{3+}$ ,  $^{166}Ho^{3+}$  and  $^{212}Bi^{3+}$ ,  $^{90}Y^{3+}$ ,  $^{177}Lu^{3+}$ ,  $^{225}Ac^{3+}$ ,  $^{149}Pm$ ,  $^{159}Gd$ ,  $^{140}La$ ,  $^{175}Yb$ ,  $^{47}Sc$ ,  $^{186}Re$ ,  $^{188}Re$ ,  $^{97}Ru$ ,  $^{105}Rh$ ,  $^{109}Pd$ ,  $^{197}Pt$ ,  $^{67}Cu$ ,  $^{198}Au$ ,

10  $^{117m}Sn$ , y  $^{212}Pb$ . M puede estar presente o no.

Otro aspecto de esta invención comprende el método de síntesis de agentes de contraste o terapéuticos bicíclicos descritos por la fórmula 1. Fragmentos de estos compuestos pueden ser sintetizados empleando métodos conocidos en el estado de arte de la técnica particularmente el método de síntesis en fase sólida. Procedimientos estándares de síntesis de péptidos en fase sólida se describen en Chan, W.C: Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis A practical approach. Oxford University Press, 2000.

Por ejemplo, en síntesis de péptidos en fase sólida se emplean resinas que pueden contener una gran variedad de grupos de anclaje que son lábiles a condiciones ácidas permitiendo generar péptidos con un ácido carboxílico terminal o amida siendo los primeros preferidos para objeto de la presente invención. Generalmente se emplean aminoácidos que tienen protegidos ortogonalmente el grupo amino alfa (9-fluorenilmetoxicarbonilo, Fmoc, lábil a condiciones básicas preferiblemente pero no limitado a este) y los grupos funcionales de cadenas laterales (ejemplo t-butoxicarbonil, Boc, lábil a condiciones ácidas), para otros

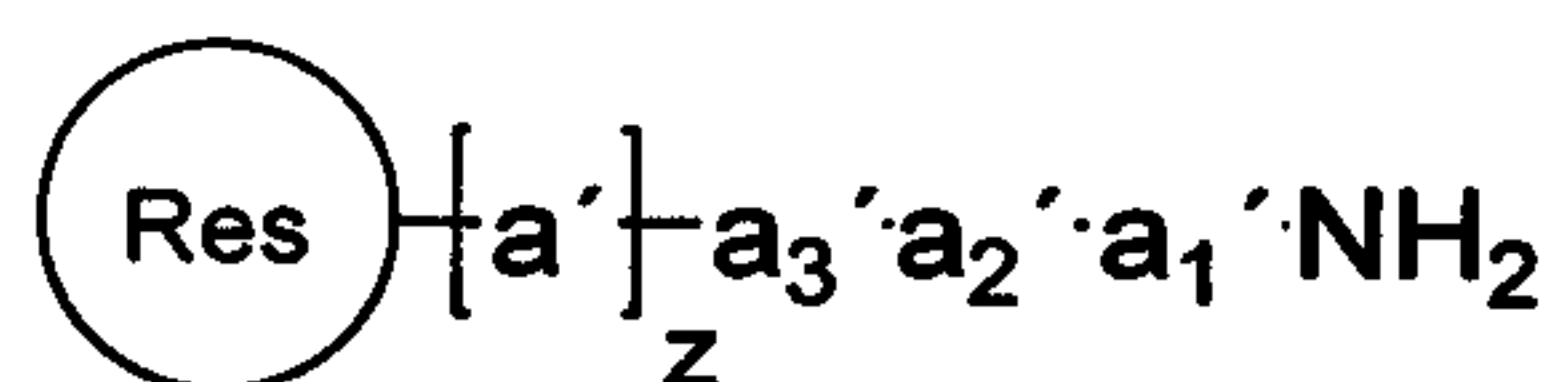


grupos protectores ver Greene, T.W. y Wuts, P.G.M. Protective groups in organic synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991. Los aminoácidos se acoplan a la resina con un agente de condensación determinado y en seguida se remueve el grupo protector del grupo amino alfa. Los ciclos de acoplamiento y desprotección son repetidos de forma

5 alternada hasta que la secuencia de interés se completa. Finalmente, los grupos protectores de cadenas laterales son removidos así como el péptido es liberado de la resina por medio de un reactivo ácido, por ejemplo ácido trifluoroacético (TFA).

Alternativamente los péptidos se pueden sintetizar por síntesis en solución de acuerdo a métodos conocidos en el estado de arte de la técnica.

10 Para objeto de esta invención un fragmento peptídico del agente de contraste bicíclico se construye mediante síntesis de péptidos en fase sólida en la cual se construye una cadena polipeptídica anclada a una soporte solida llamado resina como se muestra en la Figura 4.



15

-4-

En donde  $a_1'$ ,  $a_2'$ ,  $a_3'$  y  $[a']_z$  donde Z va de 4 hasta X corresponden a aminoácidos  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $a_4$ ,  $a_5$  y  $[a]_x$  definidos anteriormente cuyos grupos funcionales de las cadenas laterales están protegidos para su empleo en síntesis de péptidos en fase sólida o en solución de acuerdo a los estados de arte de la técnica. Res corresponde a una resina polimérica donde se une el fragmento peptídico. Res se selecciona para que de preferencia se genera un

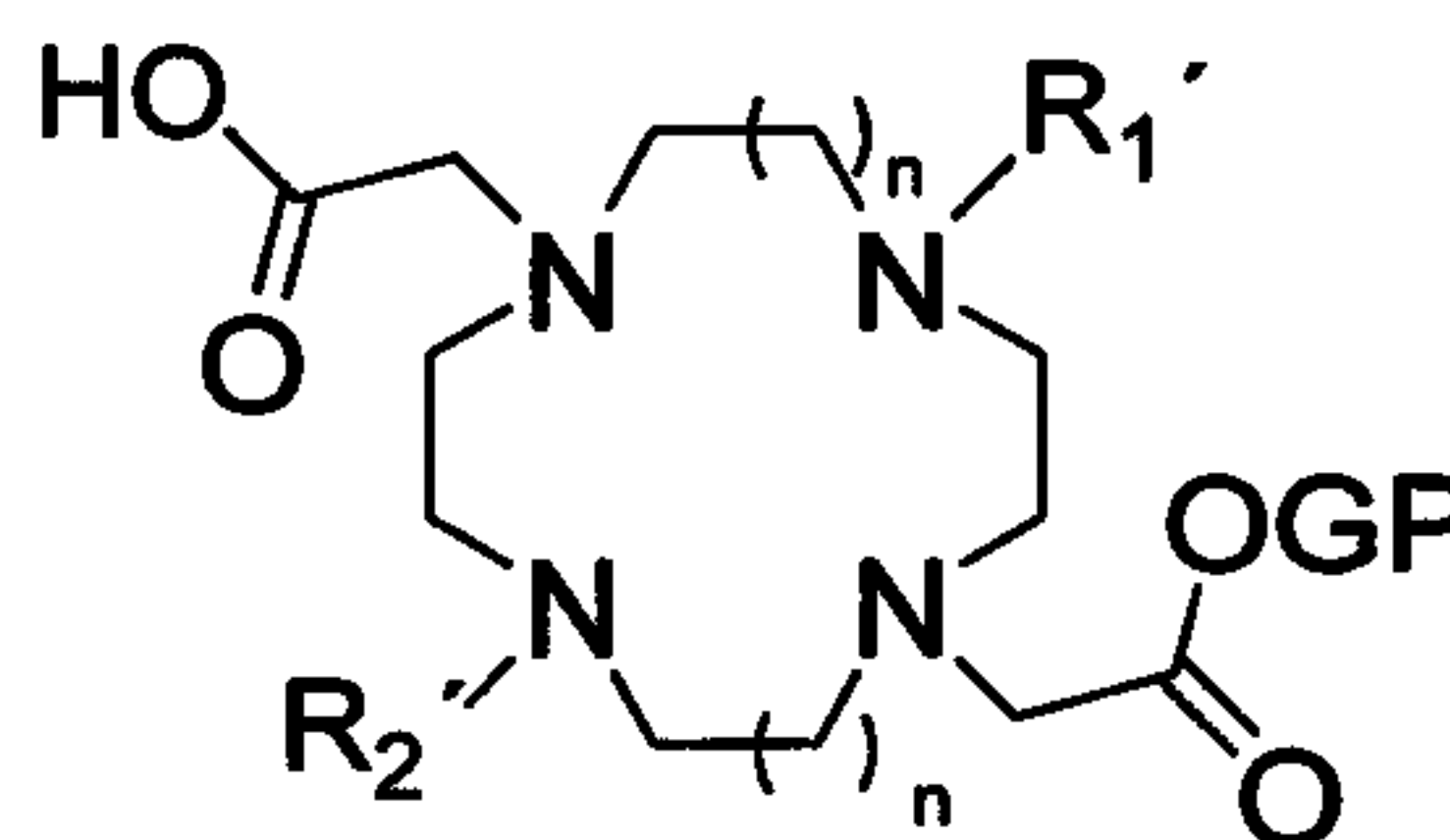
20 fragmento de péptido protegido con el ácido carboxílico terminal libre, entre las resinas que cumplen dicha característica se tienen aquéllas con el grupo 2-clorotritilo. El grupo amino terminal del fragmento peptídico se desprotege y se condensa con el ácido carboxílico de



un ligante macrocíclico tetraaza de la familia del cyclen (1,4,7,10-tetraaza ciclododecane) cuando  $n=1$  y si  $n=2$  corresponde a un macrocíclico tetraaza de la familia del cyclam (1,4,8,11-tetraaza ciclotetradecano) de acuerdo a la figura 5.

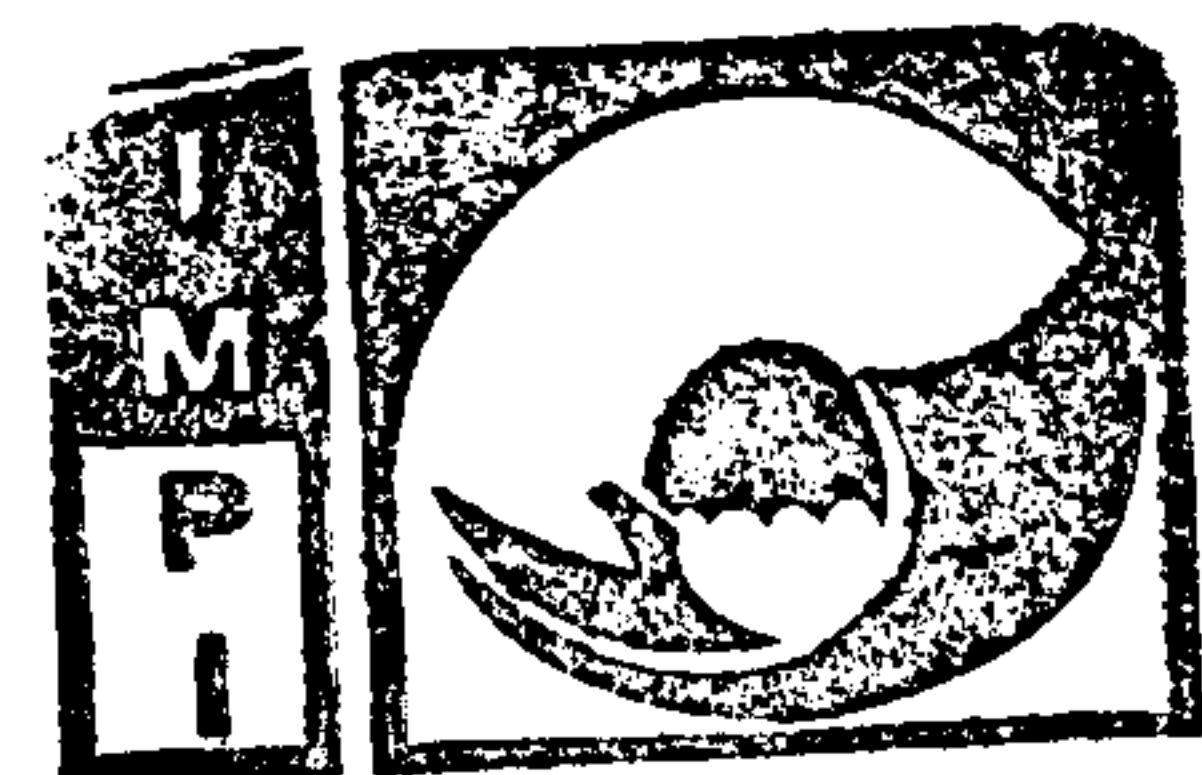


5



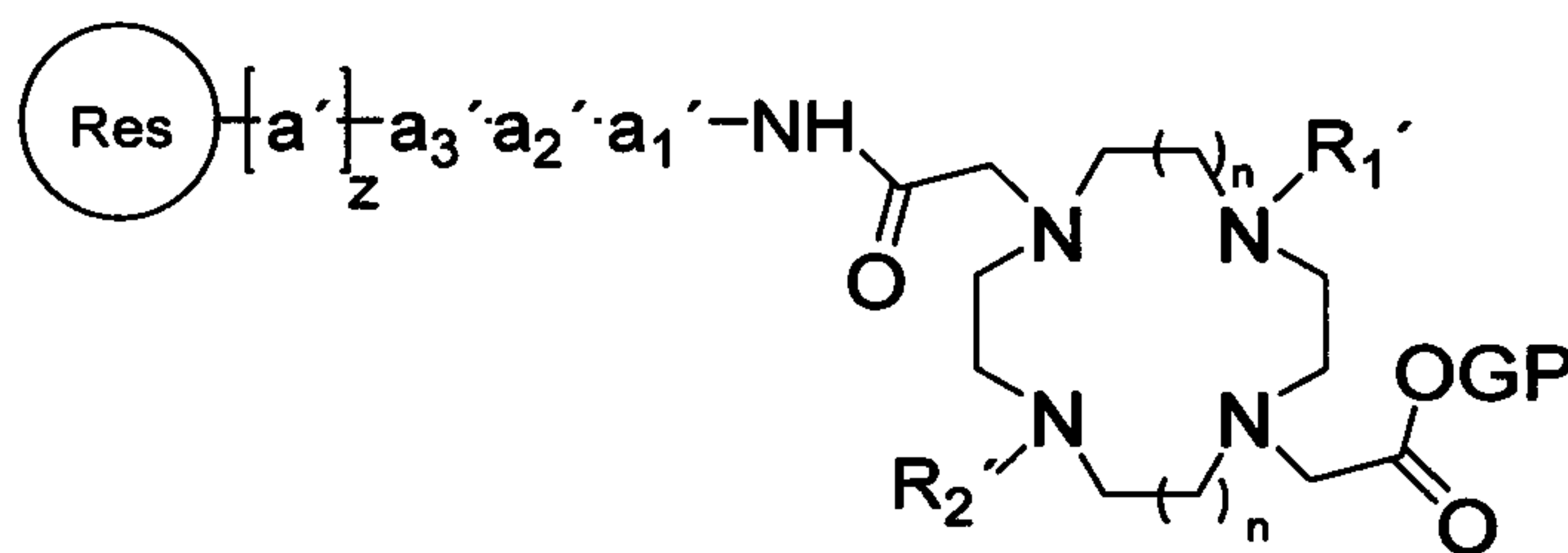
-5-

$R_1'$  y  $R_2'$  consisten preferiblemente de metilcarboxilatos protegidos con el grupo tert-butilo o alternativamente los grupos definidos previamente para  $R_1$  y  $R_2$  pero protegidos en caso de contener un grupo funcional nucleofílico reactivo.  $R_1'$  y  $R_2'$  pueden ser iguales o no y diferentes a GP. GP corresponde a H o a un grupo protector ortogonal a los grupos protectores de las grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos empleados en la síntesis de péptidos en fase sólida o líquida tales como 9-fluorenilmetilo y alilo pero no limitados a estos (para otros grupos protectores referirse a Greene, T.W. y Wuts, P.G.M. Protective groups in organic synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991). Los ligantes aquí definidos se pueden preparar empleando los protocolos definidos en la patente GTa20040000018. La condensación entre el fragmento peptídico unido a la resina de la figura 4 y el ligante de la figura 5 se lleva a cabo empleando protocolos estándares del estado de arte de la técnica tales como empleando agentes acoplantes (AC) como 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) o derivados, carbodiimidas o anhídridos cíclicos alquilfosfónicos aunque no limitados a estos en presencia o no de una base orgánica no nucleofílica como por ejemplo diisopropiletilamina (DIPEA).



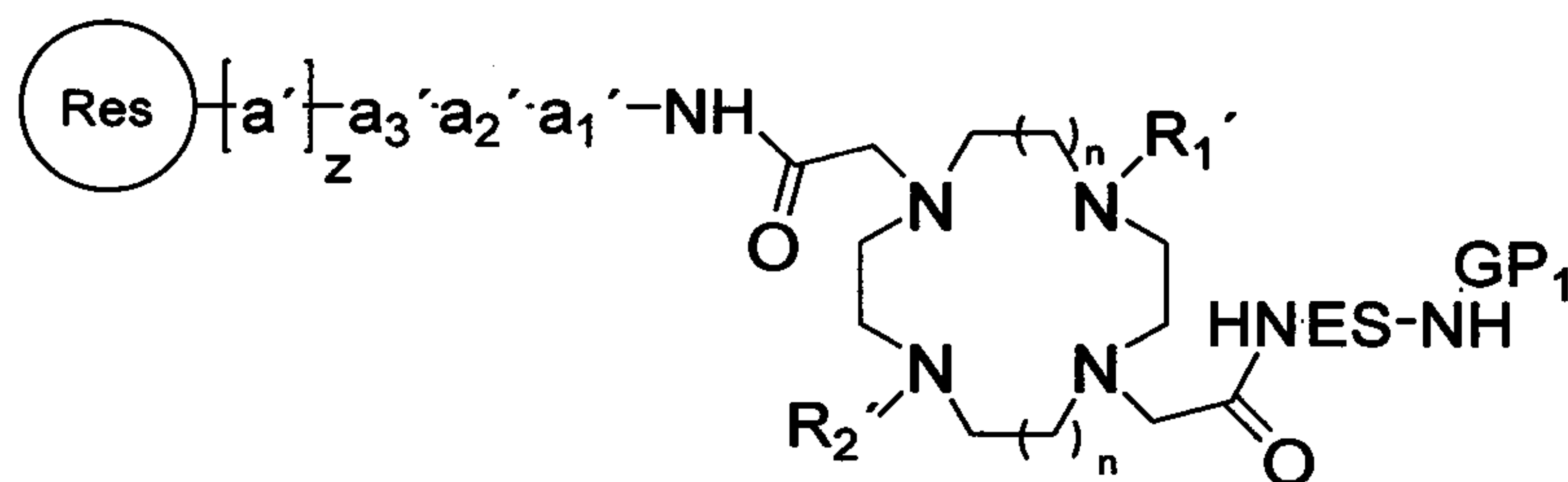
Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

12



-6-

- 5 Al producto acoplado mostrado en figura 6 se le remueve GP de estar presente utilizando condiciones conocidas en el estado de arte de la técnica (Greene, T.W. y Wuts, P.G.M. Protective groups in organic synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991) para generar un ácido carboxílico libre, el cual es acoplado empleando condiciones conocidas en el estado de arte de la técnica al grupo amino de un espaciador H<sub>2</sub>N-ES-NH-GP<sub>1</sub> dando el
- 10 compuesto mostrado en la figura 7.



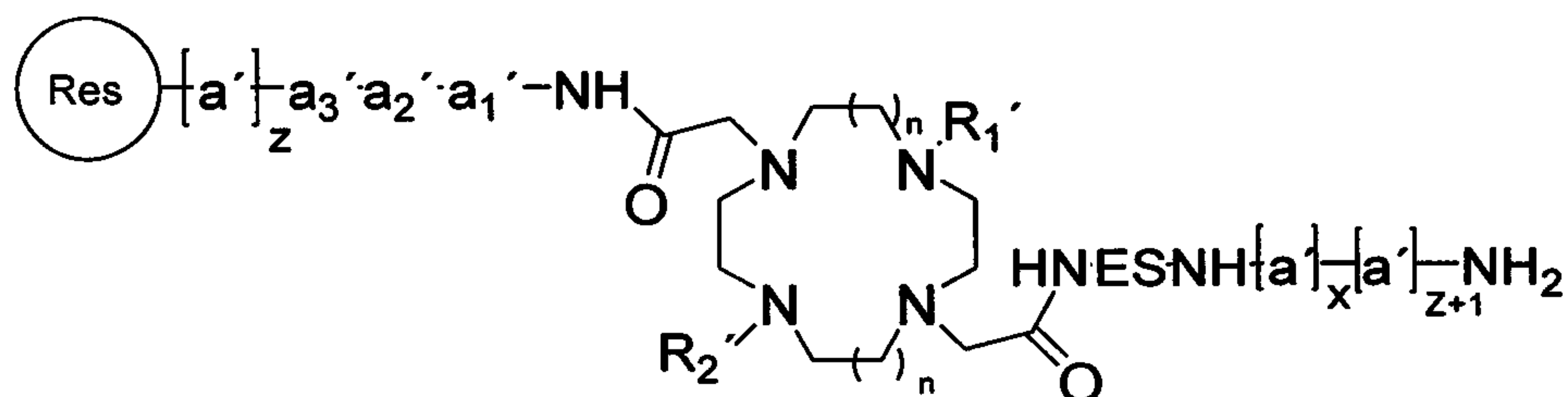
-7-

- 15 Donde ES comprende cadenas alifáticas lineales de 2 a 30 carbonos substituidas o no, compuestos cíclicos saturados o insaturados de hasta 8 carbonos substituidos o no, o compuestos policíclicos condensados saturados o insaturados de hasta 8 carbonos por ciclo substituidos o no o cadenas de poliméricas. GP<sub>1</sub> puede ser H o un grupo protector de grupos
- 20 aminos que comprende de preferencia Fmoc o algún otro grupo protector cuya remoción sea ortogonal a la de los grupos protectores de los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos a<sub>1</sub>' , a<sub>2</sub>' , a<sub>3</sub>' y [a']<sub>z</sub> y a los grupos protectores de R<sub>1</sub>' y R<sub>2</sub>'. En seguida de estar presente se remueve GP<sub>1</sub> empleando condiciones estándares del estado de

arte de la técnica y se acoplan de ser requerido los aminoácidos  $[a']_x$  y  $[a']_{z+1}$  los cuales corresponden a aminoácidos protegidos ya descritos anteriormente dejando el grupo amino terminal libre como se muestra en la figura 8.



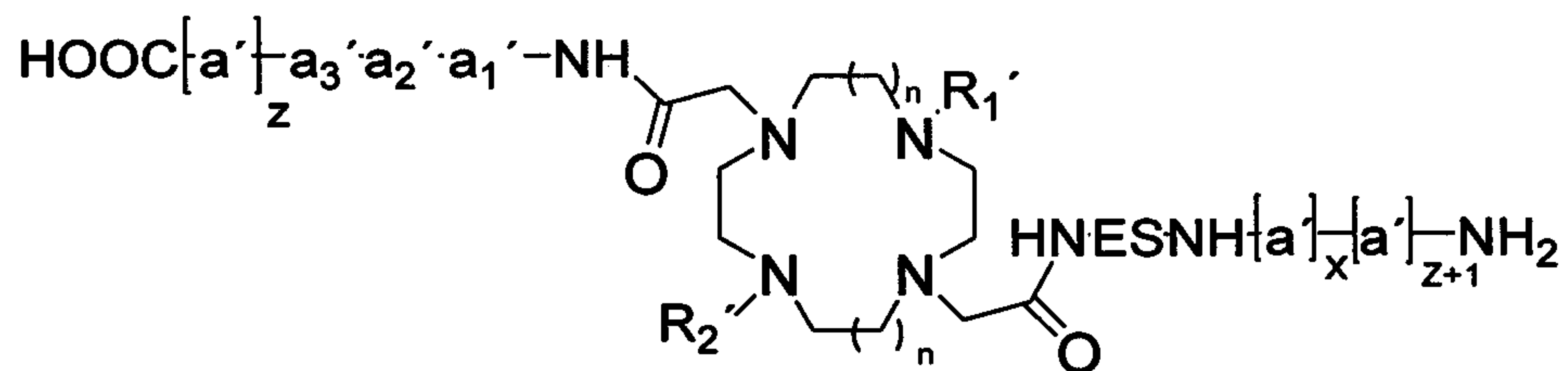
5



-8-

En seguida es necesario contar con el péptido con el ácido carboxílico terminal y amino terminal libres mientras los grupos protectores de los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos y de  $R_1'$  y  $R_2'$  permanecen protegidos. Lo anterior se logra empleando procedimientos conocidos en el estado de arte de la técnica dependientes de la resina seleccionada (Res). De emplearse Res con el grupo 2-clorotritilo como unidad de anclaje al péptido entonces la remoción del péptido de la resina y la obtención del grupo carboxílico final se lleva a cabo en medio ligeramente ácido, preferiblemente con una mezcla de ácido acético, trifluoroetanol y diclorometano bajo las condiciones descritas en el estado de arte de la técnica. Alternativamente se puede emplear TFA hasta 1% en diclorometano. El compuesto obtenido indicado en la figura 9 se puede purificar por técnicas cromatográficas convencionales.

20



-9-





El ligante bicíclico mostrado en la figura 10 se genera en solución siguiendo procedimientos

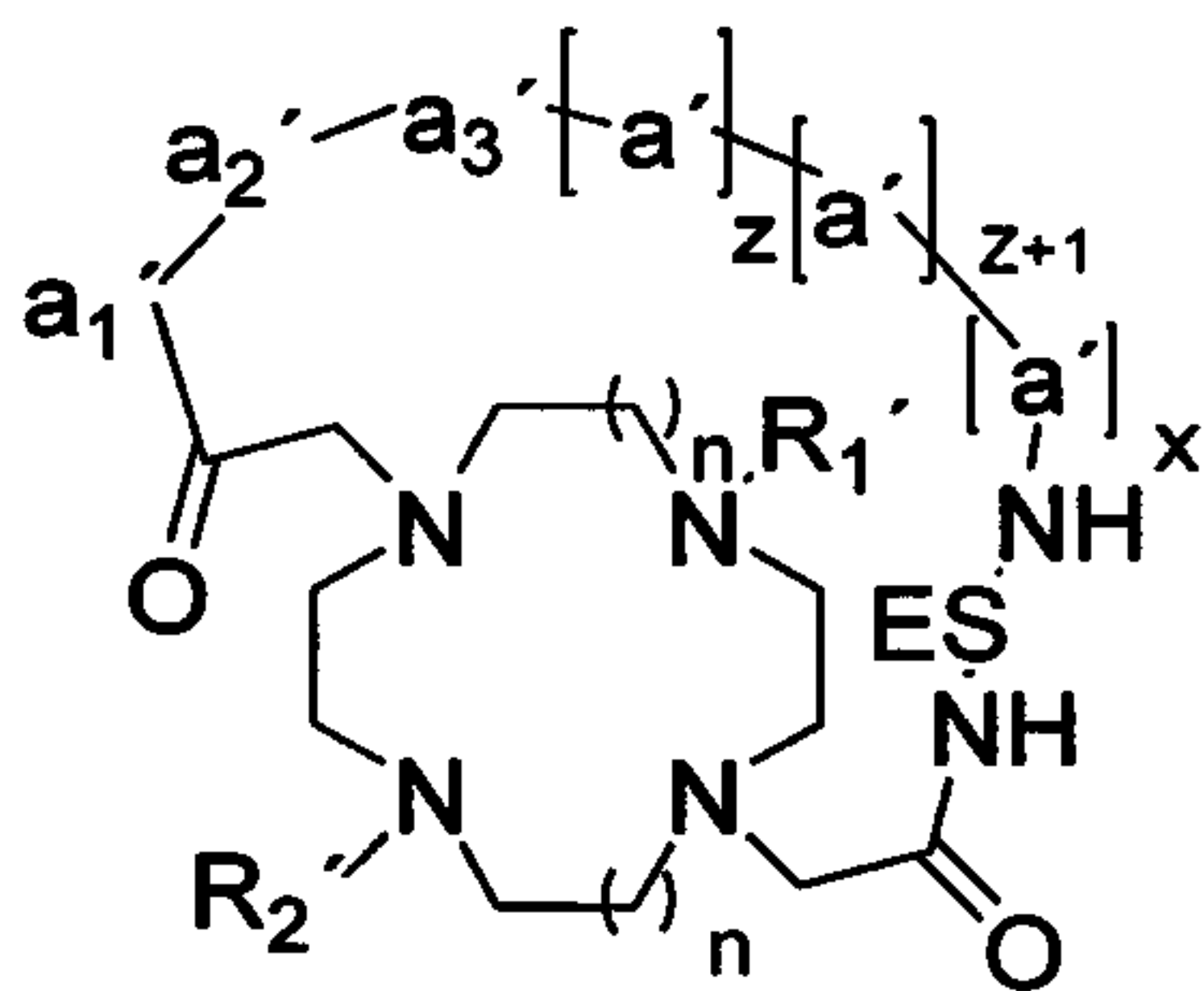
reportados en el estado de arte de la técnica (Dai, X. et al. Tetrahedron Letters 2000, 31, 6295-6298). Generalmente la ciclización se lleva a cabo empleando un agente acoplante en un disolvente no polar como diclorometano pero no limitado a este, adicionando una base

5 orgánica no nucleofílica.

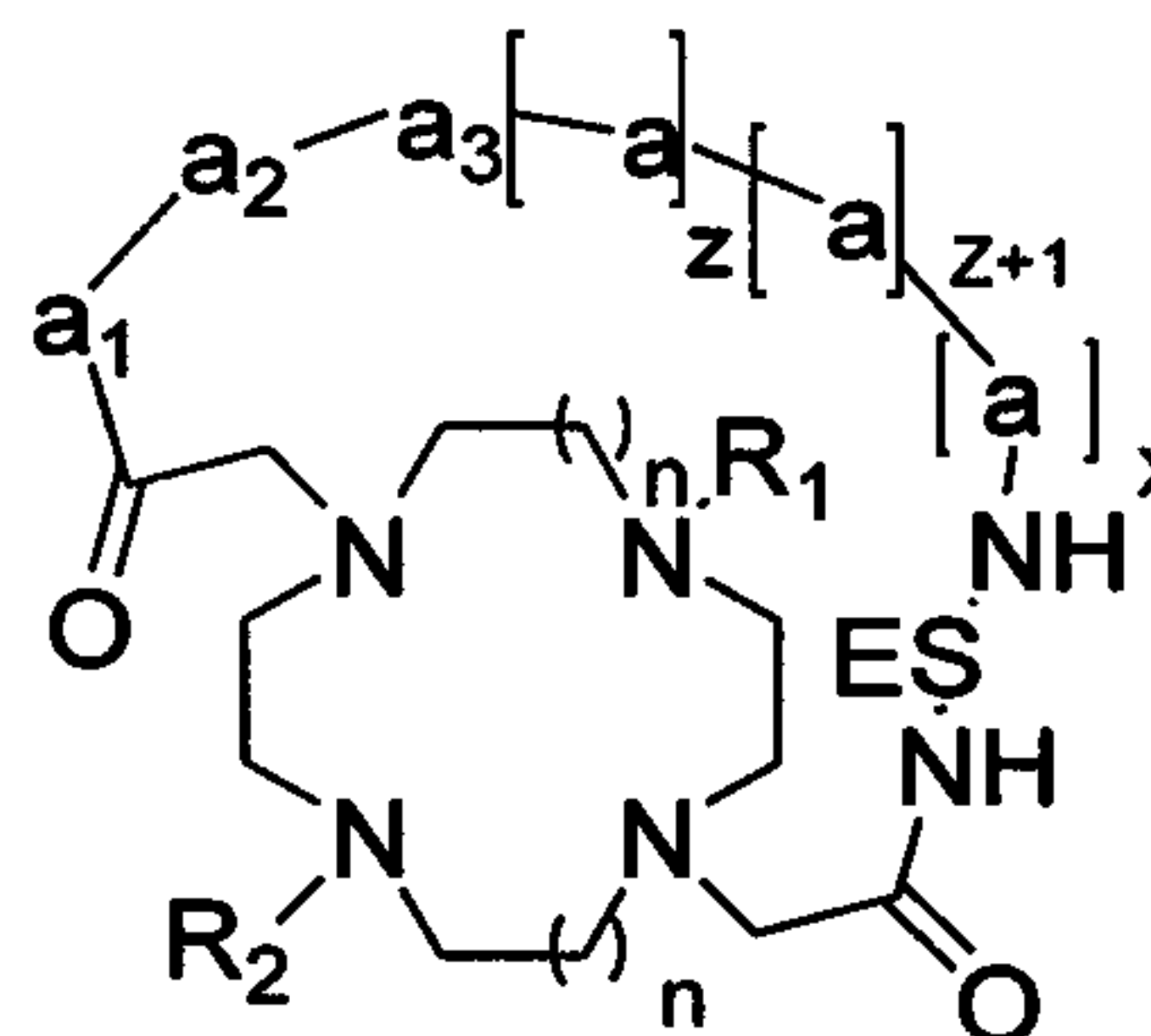
Seguido de la ciclización se remueven todos los grupos protectores de grupos funcionales de las cadenas laterales de aminoácidos y de  $R_1$  y  $R_2$  generando así el ligante bicíclico mostrado en la figura 11. El ligante bicíclico puede ser purificado usando cromatografía de

10 líquidos de alta resolución (CLAR) y caracterizado por espectrometría de masas y CLAR

15



-10-



-11-

El agente de contraste o terapéutico bicíclico descrito en la figura 1 es obtenido formando el complejo metálico entre el ligante bicíclico de la figura 11 y un ión metálico ya sea paramagnético como  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,

20  $Yb^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ , Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Ho, Er, Lu e Y o un ión metálico radioactivo tal como

$^{111}In^{3+}$ ,  $^{113m}In^{3+}$ ,  $^{67}Ga^{3+}$ ,  $^{68}Ga^{3+}$ ,  $^{99m}Tc^{4+}$ ,  $^{64}Cu^{2+}$ ,  $Tl^{3+}$ ,  $^{153}Sm^{3+}$ ,  $^{166}Ho^{3+}$  and  $^{212}Bi^{3+}$ ,  $^{90}Y^{3+}$ ,

$^{177}Lu^{3+}$ ,  $^{225}Ac^{3+}$ ,  $^{149}Pm$ ,  $^{159}Gd$ ,  $^{140}La$ ,  $^{175}Yb$ ,  $^{47}Sc$ ,  $^{186}Re$ ,  $^{188}Re$ ,  $^{97}Ru$ ,  $^{105}Rh$ ,  $^{109}Pd$ ,  $^{197}Pt$ ,

$^{67}Cu$ ,  $^{198}Au$ ,  $^{117m}Sn$ , y  $^{212}Pb$ .



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

Los agentes de contraste o terapéuticos de la presente invención son aplicados en PET, SPECT, CT y/o técnicas ópticas

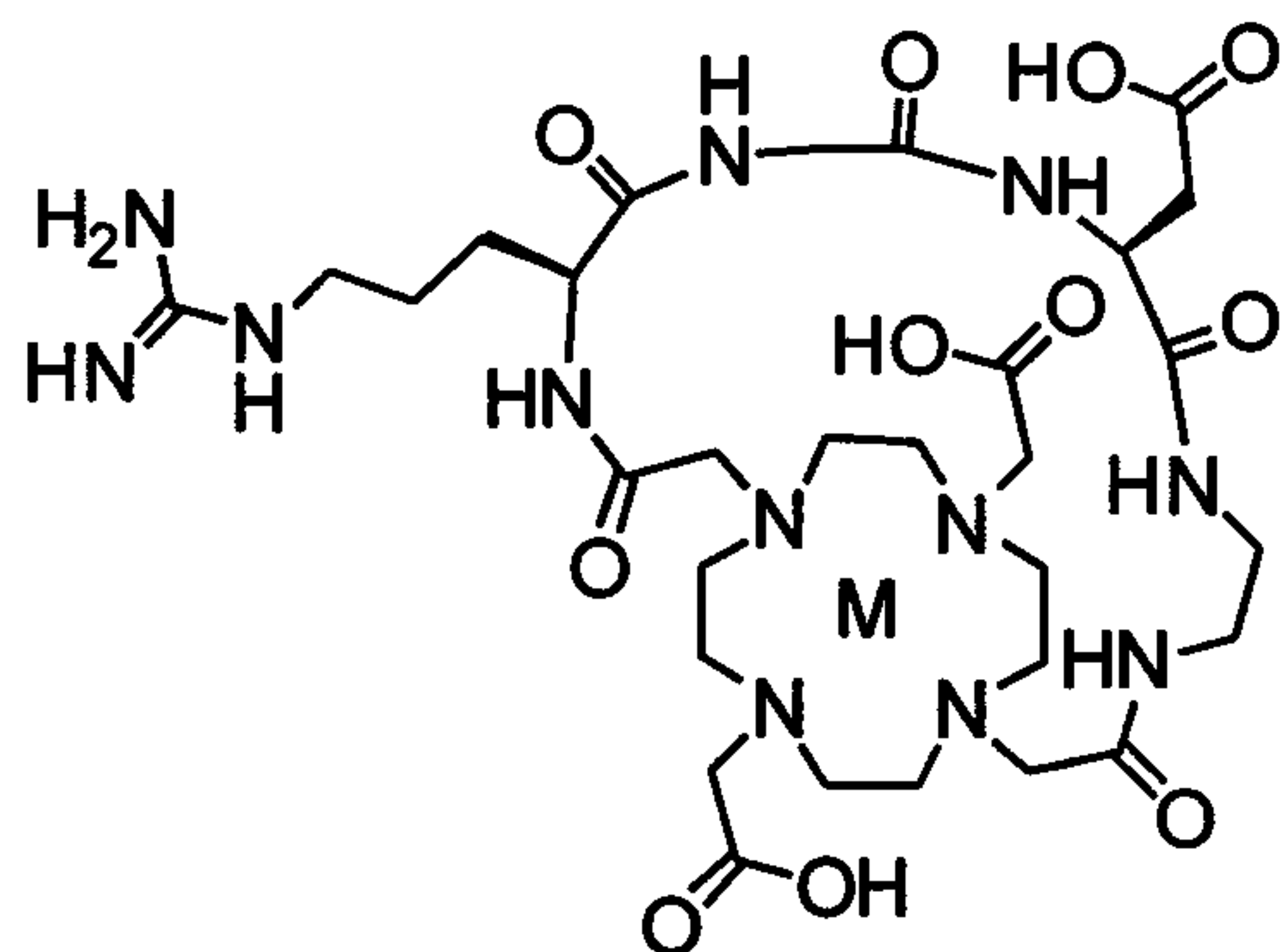
Para que los agentes de contraste o terapéuticos bicíclicos de la presente invención funcionen como agentes de contraste eficientes el péptido  $-a_1-a_2-a_3-a_4-a_5-[a]_x-$  de la figura 1

5 debe tener una afinidad alta por un bioreceptor específico dándole así una mayor acumulación en células, tejidos u órganos donde se sobre exprese dicho receptor.

Un aspecto específico de la presente invención comprende agentes de contraste o terapéuticos bicíclicos con fórmula 12 y 13 donde M comprende un ión metálico ya sea paramagnético como  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,

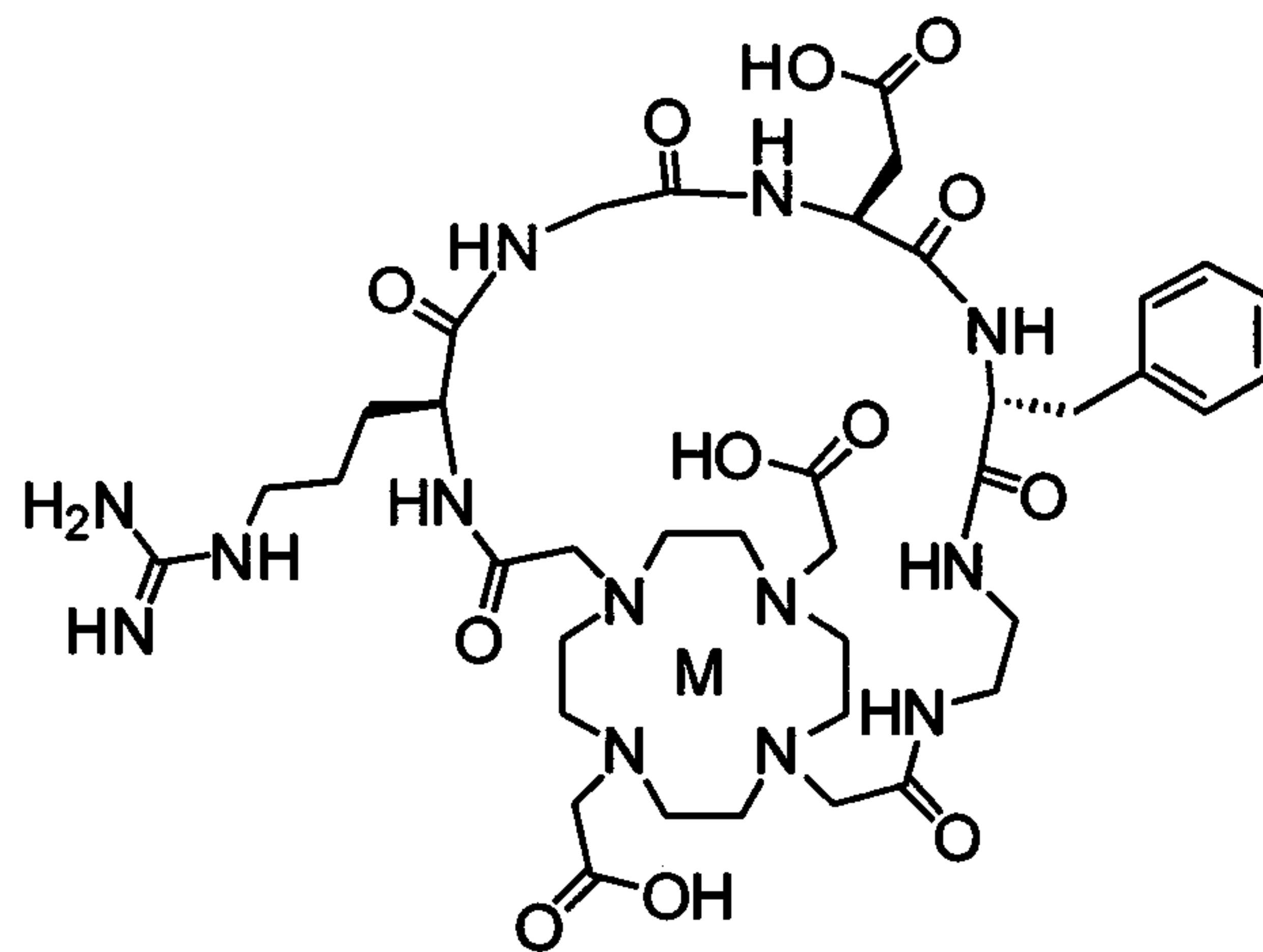
10  $Yb^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ , Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Ho, Er, Lu e Y o un ión metálico radioactivo tal como  $^{111}In^{3+}$ ,  $^{113m}In^{3+}$ ,  $^{67}Ga^{3+}$ ,  $^{68}Ga^{3+}$ ,  $^{99m}Tc^{4+}$ ,  $^{64}Cu^{2+}$ ,  $Tl^{3+}$ ,  $^{153}Sm^{3+}$ ,  $^{166}Ho^{3+}$  and  $^{212}Bi^{3+}$ ,  $^{90}Y^{3+}$ ,  $^{177}Lu^{3+}$ ,  $^{225}Ac^{3+}$ ,  $^{149}Pm$ ,  $^{159}Gd$ ,  $^{140}La$ ,  $^{175}Yb$ ,  $^{47}Sc$ ,  $^{186}Re$ ,  $^{188}Re$ ,  $^{97}Ru$ ,  $^{105}Rh$ ,  $^{109}Pd$ ,  $^{197}Pt$ ,  $^{67}Cu$ ,  $^{198}Au$ ,  $^{117m}Sn$ , y  $^{212}Pb$ .

15



20

-12-



-13-

Los agentes de contraste o terapéuticos descritos en la figura 12 y 13 son empleados preferiblemente para identificar o atacar sitios donde se sobreexpresen integrinas

vinculadas con enfermedades tales como cáncer. Preferiblemente estas comprenden la  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$  y  $\alpha\nu\beta 1$  aunque no limitadas a estas.



Instituto  
Mexicano  
de Propiedad  
Industrial

En otro aspecto la presente invención provee de un método para detectar la presencia de biomoléculas sobreexpresadas en la superficie de una célula, tejido, órgano o muestra

5 biológica. El método comprende los pasos siguientes:

a) Poner en contacto el agente de contraste o terapéutico con la célula, tejido, órgano o muestra biológica.

b) Detectar la presencia del agente de contraste asociado con la célula, tejido, órgano o muestra biológica. En este método la etapa de contacto y detección pueden ser llevados

10 acabo in vitro, alternativamente el contacto puede ser in vivo y la detección in vitro, preferiblemente el contacto y la detección se llevan a cabo in vivo.

Un aspecto de la presente invención comprende el método para generar una imagen de un ser humano o animal para diagnóstico el cual involucra el administrar el agente de contraste descrito a el cuerpo del ser humano o animal por ejemplo a través del sistema vascular, de

15 tal forma que se genere una imagen con contraste incrementado del cuerpo o parte de este en la cual el agente de contraste se haya distribuido.

Los agentes de contraste bicíclicos de la presente invención se pueden emplear en cualquier tipo de modalidad de imagen, dependiendo del ion metálico M seleccionado. Por lo tanto el uso de los agentes de contraste bicíclicos descritos como agentes de diagnóstico

20 comprenden un aspecto de esta invención. Un uso preferido de los agentes de contraste descritos es en el diagnóstico de diferentes formas de cáncer y metástasis, por ejemplo cáncer de mama, próstata, páncreas, pulmón u ovario.





Otro aspecto de esta invención comprende una composición de dos agentes de contraste bicíclicos o más como los descritos en la presente invención preferiblemente dos en donde el componente M es diferente para cada uno de ellos. Para uno o varios de los agentes de contraste M comprende un ión metálico paramagnético como  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ , Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Ho, Er, Lu e Y aunque preferiblemente  $Gd^{3+}$  y para el otro agente de contraste M comprende un ión metálico radioactivo tal como  $^{111}In^{3+}$ ,  $^{113m}In^{3+}$ ,  $^{67}Ga^{3+}$ ,  $^{68}Ga^{3+}$ ,  $^{99m}Tc^{4+}$ ,  $^{64}Cu^{2+}$ ,  $Tl^{3+}$ ,  $^{153}Sm^{3+}$ ,  $^{166}Ho^{3+}$  and  $^{212}Bi^{3+}$ ,  $^{90}Y^{3+}$ ,  $^{177}Lu^{3+}$ ,  $^{225}Ac^{3+}$ ,  $^{149}Pm$ ,  $^{159}Gd$ ,  $^{140}La$ ,  $^{175}Yb$ ,  $^{47}Sc$ ,  $^{186}Re$ ,  $^{188}Re$ ,  $^{97}Ru$ ,  $^{105}Rh$ ,  $^{109}Pd$ ,  $^{197}Pt$ ,  $^{67}Cu$ ,  $^{198}Au$ ,  $^{117m}Sn$ , y  $^{212}Pb$ . Esta composición de dos o más agentes de contraste descrita se podrá emplear para obtener imágenes de un ser humano o animal para diagnóstico el cual involucra el administrar simultáneamente los agentes de contraste a el cuerpo del ser humano o animal por ejemplo a través del sistema vascular, de tal forma que se genere una imagen con contraste incrementado del cuerpo o parte de este en la cual los agentes de contraste se hayan distribuido.

La composición de dos o más agentes de contraste bicíclicos de la presente invención se pueden emplear para obtener imágenes en técnicas de imagen complementarias de forma simultánea. Por ejemplo una mezcla de dos agentes de contraste descritos se puede emplear para obtener imágenes simultáneas por MRI y técnicas de radioimagen tales como PET o SPECT.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

La presente invención provee también de una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de uno más agentes de contraste bicíclicos descritos en la invención para incrementar el contraste in vivo junto con uno o mas adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

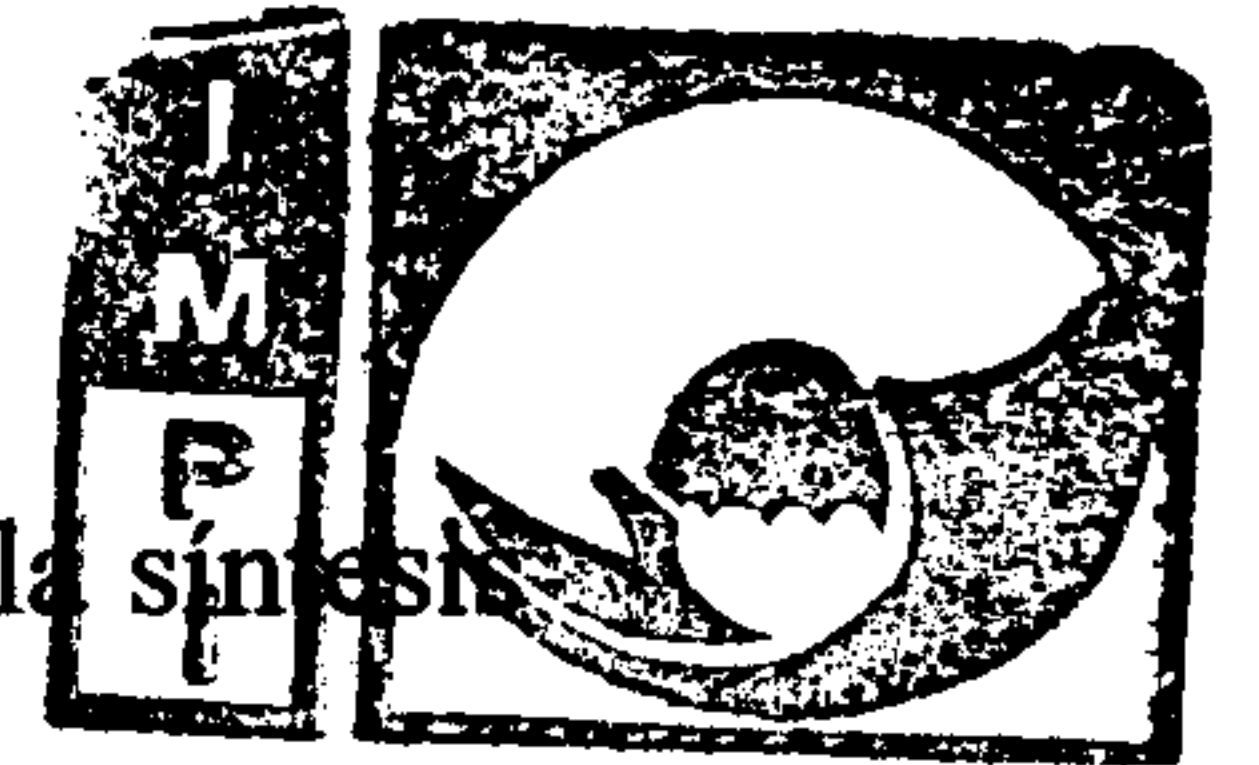
5 Otro aspecto de la presente invención comprende un agente terapéutico de acuerdo a la fórmula 1 en donde la interacción específica del péptido  $-a_1-a_2-a_3-a_4-a_5-[a]_x-$  con un bioreceptor promueve la bioacumulación del agente terapéutico. Dicha acumulación debe ser de 1 a 24 horas preferiblemente de forma que el agente terapéutico ejerza su actividad. Dicha actividad proviene del componente M del agente terapéutico que en su caso  
10 comprende iones metálicos radiactivos que emiten partículas de media a alta energía.

En otro aspecto la presente invención provee de un agente terapéutico que destruye células, tejidos que sobreexpresen las biomoléculas a las cuales es específico el agente terapéutico.

Un aspecto de la presente invención comprende el método terapéutico el cual involucra el administrar el agente terapéutico descrito al cuerpo del ser humano o animal por ejemplo a  
15 través del sistema vascular, de tal forma que se acumule en la parte del cuerpo que sobreexpresen el bioreceptor.

Un uso preferido de los agentes terapéuticos descritos es en el tratamiento de diferentes formas de cáncer y metástasis, por ejemplo cáncer de mama, próstata, páncreas, pulmón u ovario.

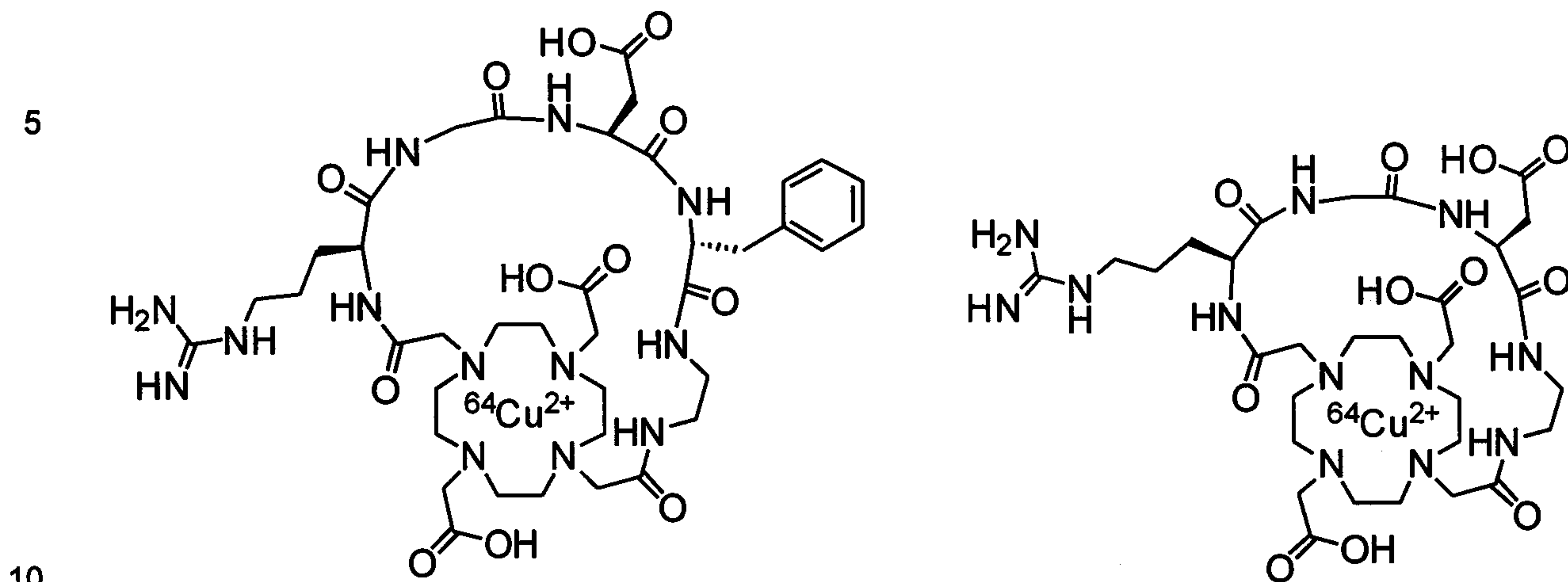
20 La presente invención provee también de una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de agente terapéutico bicíclico descrito en la invención junto con uno o mas adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.



De esta forma la presente invención es ilustrada con ejemplos no limitantes con la síntesis

de  $c(^{64}\text{Cu}^{2+}\text{DOTA}(\text{Arg-Gly-Asp-DPhe-EDA}))$  y  $c(^{64}\text{Cu}^{2+}\text{DOTA}(\text{Arg-Gly-Asp-EDA}))$  mostrados en las figuras siguientes

Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial



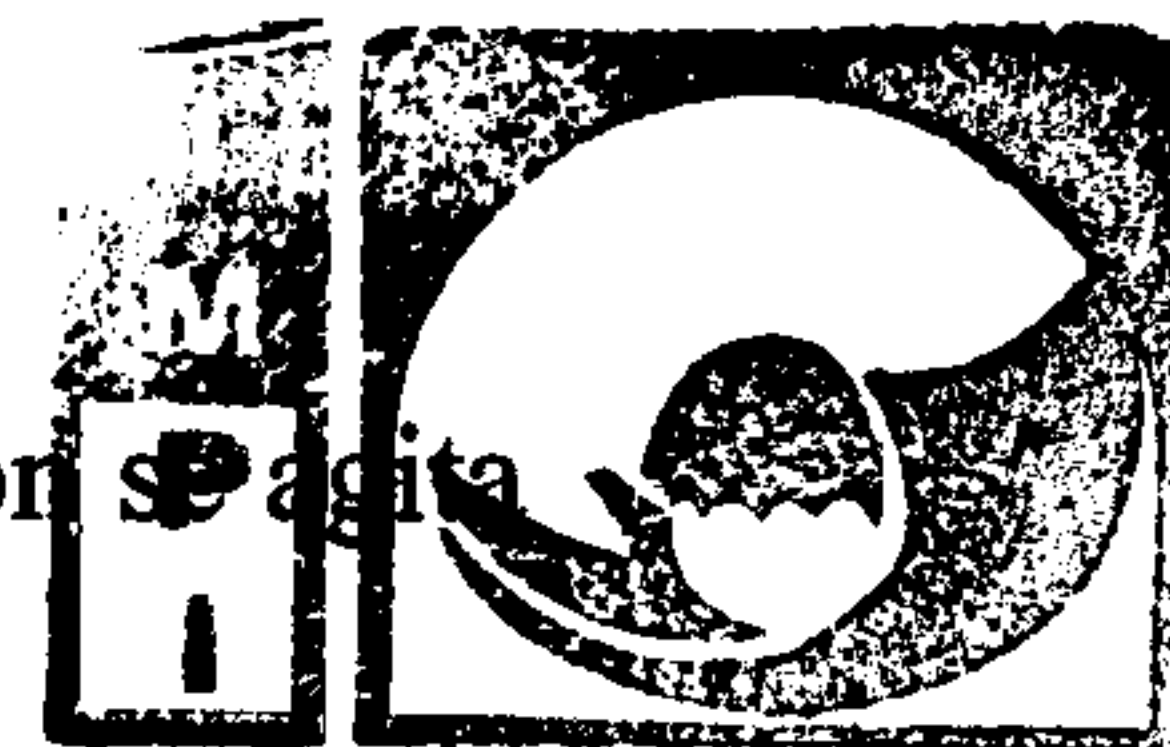
#### EJEMPLOS

La síntesis de ligantes bicíclicos DOTA-péptido comienza con el acoplamiento de arginina a una resina base poliestireno-divinilbenceno de o-clorotritilo pre-acoplada con glicina con una carga de 0.56 mmol/g a una escala de 0.9 mmoles. El acoplamiento del aminoácido se

15 lleva a cabo empleando 3 equiv. de Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 2.9 equiv HBTU y HOBT, y 6 equiv DIPEA en dimetilformamida (DMF) por 2 horas. La mezcla de acoplamiento es removida de la resina por filtración y la resina se lava con DMF 10X 2mL y DCM 10X 2mL y se seca bajo alta vacío. La resina dio negativa (color amarillo) la prueba de Ninidrina confirmando que la reacción se completo. El grupo protector Fmoc se remueve

20 agregando una solución de piperidina al 20% en DMF y agitando por 30 minutos seguido de la remoción de la solución de la resina y lavados y secado de la misma. La prueba de ninidrina dio positiva (color azul) lo cual indica que la remoción del grupo Fmoc fue completa. A continuación se acopla DOTA-bis-*tert*-butil éster añadiendo una mezcla de 2





equiv. del ligante y 2 equiv. de HBTU en DMF a la resina. La mezcla de reacción se agita por 2 horas y en seguida se filtra la solución y la resina se lava. El procedimiento de acoplamiento del ligante se repite y al final del lavado se seca la resina. La prueba de ninidrina fue negativa. A la resina se le adiciona HBTU 2 equiv. y DIPEA 2 equiv. en DMF

5 y la mezcla se agita por 10 minutos, en seguida se añaden 20 equiv. de etilendiamina (EDA) y la mezcla se agita por 2 horas. Después de remover la solución y lavar y secar la resina la prueba de ninidrina fue positiva. La resina se dividió en dos mitades.

#### **Síntesis de c(DOTA(Arg-Gly-Asp-DPhe-EDA))**

10 A una mitad de la resina se le acoplaron los siguientes aminoácidos empleando acoplamientos únicos de 3 equiv. del Fmoc-aminoácido, 2.9 equiv HBTU y HOBt, y 6 equiv DIPEA en DMF en el orden Fmoc-D-Phe-OH, y Fmoc-Asp(OtBu)-OH bajo las condiciones ya descritas anteriormente para el acoplamiento de aminoácidos. La remoción del grupo Fmoc los lavados, secados y prueba de ninidrina se llevaron acabo como

15 anteriormente.

El péptido lineal que contiene los grupos protectores de los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos y los carboxilatos de DOTA (DOTAbis-*t*Bu ester-R(Pbf)GD(*t*Bu)f-EDA) es removido de la resina mediante su tratamiento con 5 mL de una mezcla de ácido acético, 2,2,2-trifluoroetano (TFE) y DCM (1:1:3) por 1 h a temperatura

20 ambiente. El líquido se remueve por filtración al vacío y la resina se lava dos veces con 5 mL de la misma mezcla y luego tres veces con DCM. Los líquidos son recolectados y combinados y el solvente se remueve bajo alto vacío. El producto es purificado por CLAR usando un gradiente de H<sub>2</sub>O con 0.1% TFA /metanol con 0.1% TFA de 80/20 a 10/90 en 35



minutos en una columna Jupiter C18 10 $\mu$  300 A 250x10 mm a un flujo de 4.7 mL/min

detección a 235 nm. Bajo estas condiciones se obtienen dos fracciones mayoritarias ( $t_r$  = 25.8 and 28.0 min) las cuales son liofilizadas dando 41 mg los compuestos protegidos DOTA(R(Pbf)G)<sub>2</sub> MS (MALDI-TOF+)  $m/z$  = 1447.17 [M+H]<sup>+</sup> (calcd.

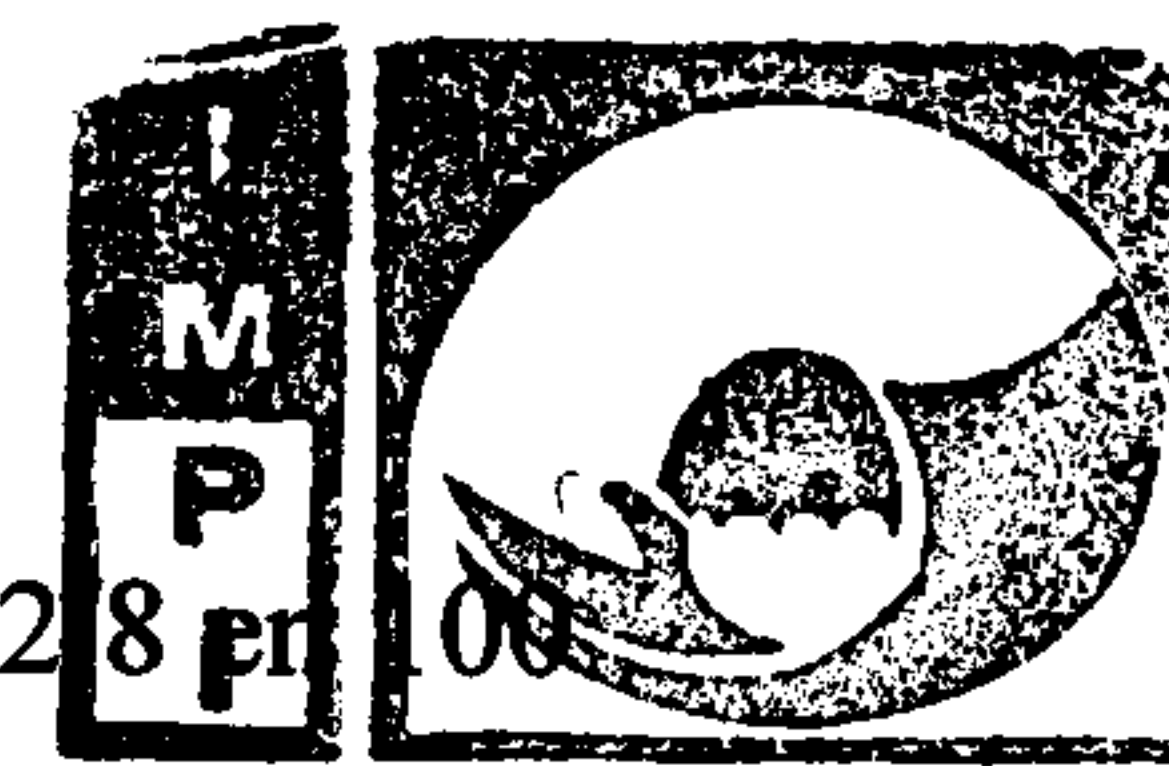
5 1447.76) y 94 mg de DOTAbis-*t*BuR(Pbf)GD(*t*Bu)f-EDA, MS (MALDI-TOF+)  $m/z$  = 1342.32[M+H]<sup>+</sup> (calcd. 1342.65).

La obtención del compuesto bicíclico se lleva a cabo adicionando lentamente el sistema protegido DOTAbis-*t*Bu ester-R(Pbf)GD(*t*Bu)f-EDA disuelto en 5 mL de DCM a una solución que contiene 200  $\mu$ L de anhídrido cíclico del ácido 1-propanofosfonico al 50% en

10 acetato de etilo, DIPEA (200  $\mu$ L), y dimetilaminopiridina (1 mg) en 5 mL de DCM. La mezcla de reacción se agita toda la noche y la formación del producto es verificado por MALDI-TOF (MS) hasta que el compuesto cíclico es observado y no se detecta el compuesto lineal, MS (MALDI-TOF+)  $m/z$  = 1325.06 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. 1325.64). El

15 disolvente se remueve bajo alto vacío y el residuo remanente se redisuelve en DCM. La fase orgánica se lava con NaOH 0.1 M 2X. La fase orgánica se colecta y se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, la solución resultante se filtra y el solvente se remueve en el rota evaporador. Los grupos protectores del sistema bicíclico c(DOTAbis-*t*Bu éster-R(Pbf)GD(*t*Bu)f-EDA) son removidos al tratar el compuesto por 2 horas con una solución 95% TFA y 5% agua grado Milli Q. El ácido se remueve mediante un flujo de nitrógeno

20 dando un residuo aceitoso el cual solidifica después de la adición de éter etílico frío. El éter es decantado y el sólido se lava con éter etílico limpio 3x y finalmente el sólido se deja secar. El sólido resultante se purifica dos veces mediante CLAR, primero con un gradiente H<sub>2</sub>O con 0.1% TFA /acetonitrilo con 0.1% TFA de 97/3 a 70/30 en 30 minutos ( $t_r$  = 12.3



min) y enseguida con otro gradiente H<sub>2</sub>O/acetonitrilo con 0.1% TFA de 95/5 a 92.8 por 00 minutos ( $R_t = 57.2$  min) en una columna Jupiter C18 10 $\mu$  300 A 250x10 mm a un flujo de 4.7 mL/min. La fracción que contiene el producto final se liofiliza dando 23 mg del compuesto bicíclico c(DOTA(RGDf-EDA)).

- 5 <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.26-7.11, (5H, arom.), 4.47 (m), 4.28, 3.85 (m), 3.77, 3.17, 3.07, 2.80, 2.76, 2.74, 2.55, 2.53, 1.85 (2H, m, -C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>-, Arg), 1.50 (2H, m, -C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>-, Arg).
- <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  174.40, 174.03, 174.00, 173.19, 173.16, 172.45 (C=O) 156.89 ((NH)NH<sub>2</sub>C=N), 136.96 (-CH=, arom.), 129.29 (-CH=, arom.), 129.13 (-CH=, arom.), 128.93 (-CH=, arom.), 127.26 (-CH=, arom.), 55.97 (N-CH<sub>2</sub>CONH), 55.13 (N-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H),
- 10 54.82 -50.67 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N; -CH-, Phe; -CH-, Arg; -CH-, Asp), 42.77 (-CH<sub>2</sub>-, Gly), 40.62 (-C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>-, Arg), 38.44 (-C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub>-, Asp), 36.56-34.86 (-CH<sub>2</sub>-, EDA) (-C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub>-, Phe), 28.11 (-C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub>-, Arg), 24.80 (-C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>-, Arg).

#### Síntesis de c(DOTA(Arg-Gly-Asp-EDA))

- 15 Este compuesto se sintetiza con la otra mitad de la resina siguiendo un protocolo semejante al ya descrito para c(DOTA(RGDf-EDA)). El producto final purificado y liofilizado de c(DOTA(RGD-EDA)) fué de 20 mg.

MS (MALDI-TOF+)  $m/z = 904.69$  (100%) [M+H]<sup>+</sup> (calcd. 904.98), 926.65 (35%) [M+H]<sup>+</sup> (calcd. 926.45).

20

#### Preparación de complejos con iones metálicos y estudios de biodistribución

A un recipiente de reacción conteniendo una cantidad específica de c(DOTA(RGDf-EDA)) o c(DOTA(RGD-EDA)) a un pH determinado se le agrega una cantidad dada del ion





metálico de interés. La mezcla de reacción se incuba por un tiempo determinado de acuerdo al ión metálico y el complejo metálico se purifica eliminando el exceso de ión metálico empleado. La pureza del complejo formado se determina por cromatografía delgada y/o CLAR. Estudios de biodistribución se llevan a cabo en ratones a los cuales se les injertó un tumor específico. Cuando el tamaño del tumor alcanza el rango de 50–300 mm<sup>3</sup>, los ratones están listos para la adquisición de imágenes por técnicas como MRI, SPECT, PET, rayos-X, métodos ópticos o ultrasonido y combinaciones de estas. Por ejemplo el complejo  $c(^{64}\text{Cu}^{2+}\text{DOTA}(\text{RGDf-EDA}))$  y el de  $c(^{177}\text{Lu}^{3+}\text{DOTA}(\text{RGD-EDA}))$  muestran bioacumulación específica en tumores U87MG y MCF7 implantados en ratones respectivamente.

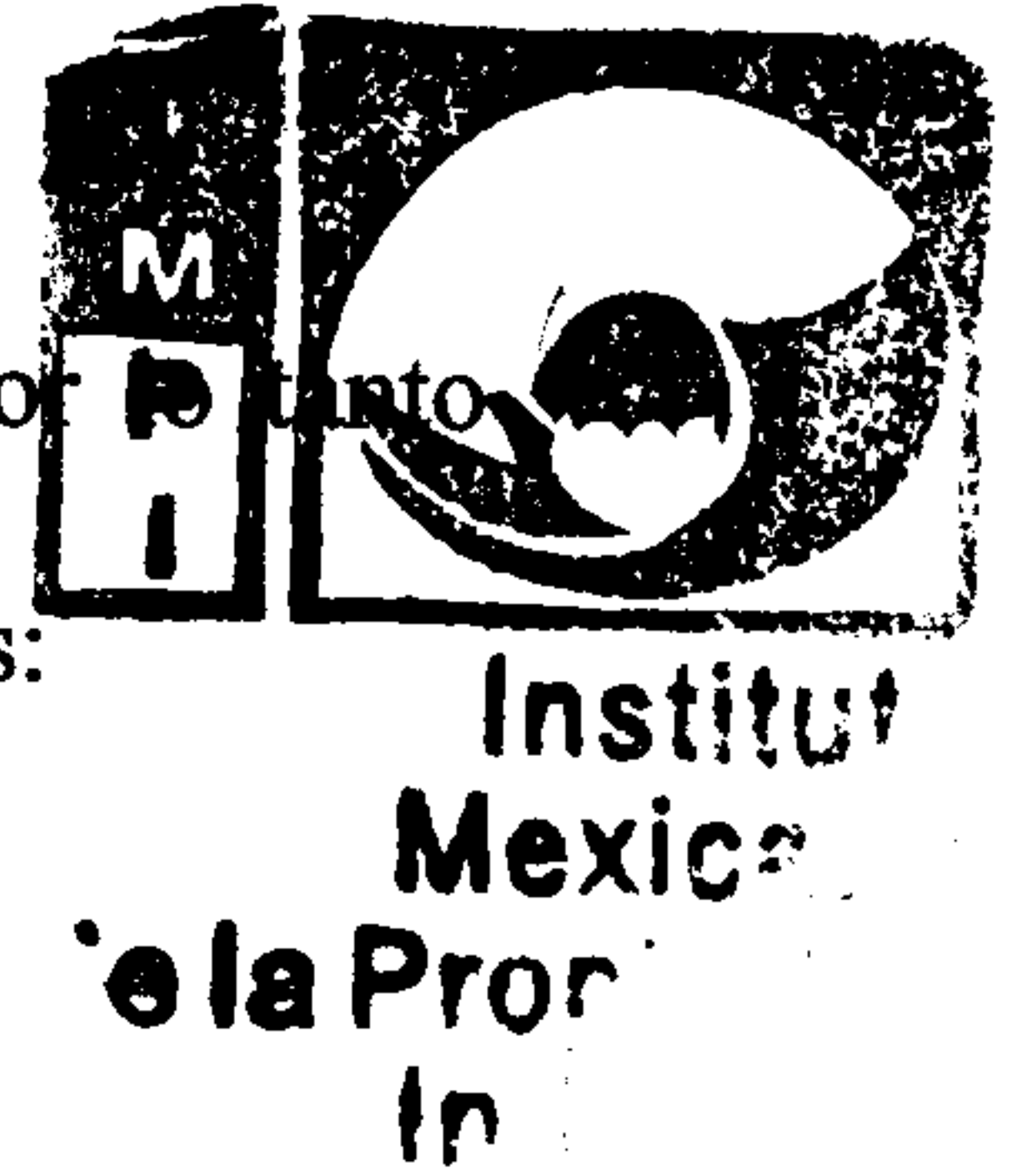
15

20

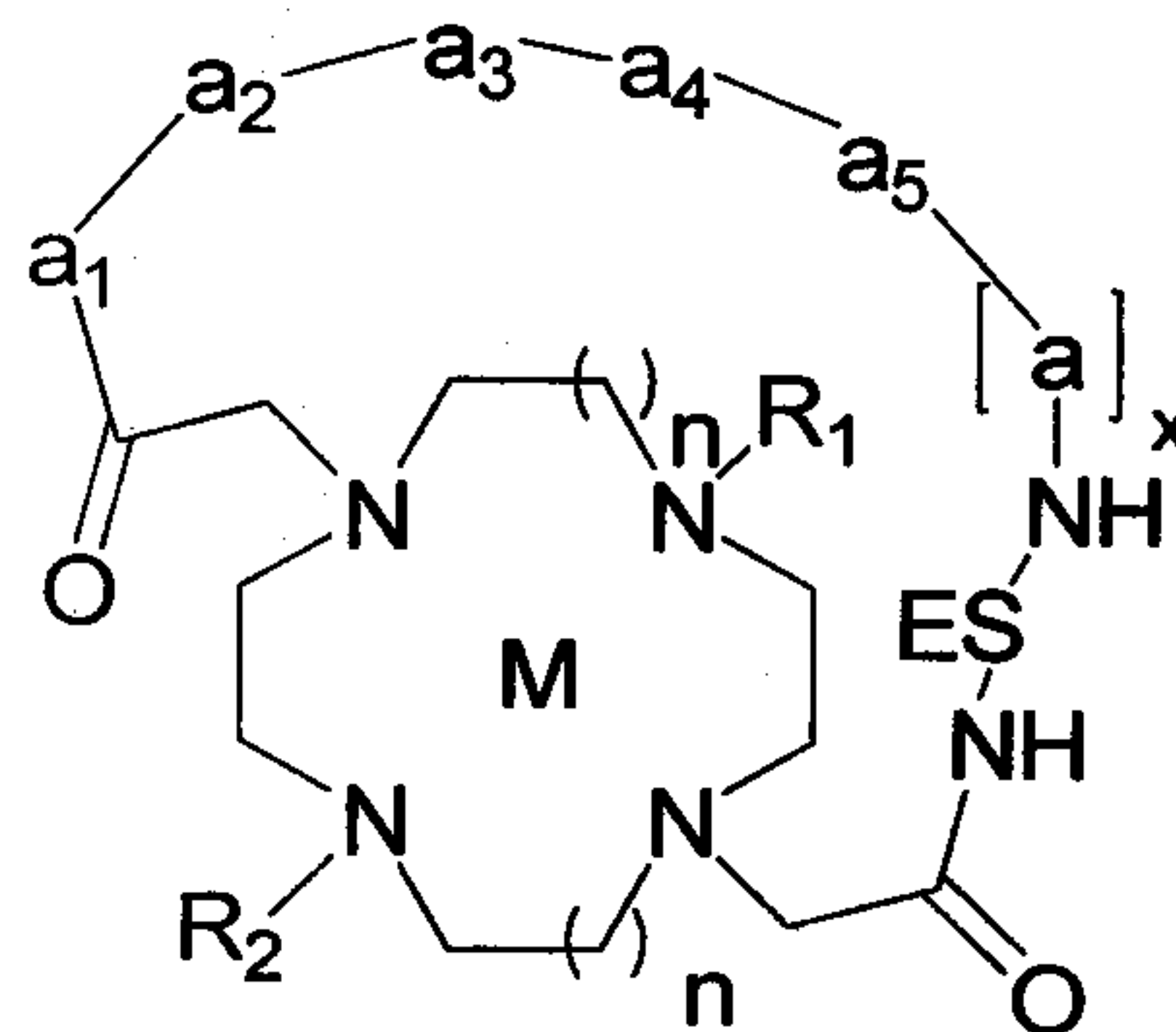
40009  
CD

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficiente mi invención, considero como una novedad y por tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:



- 5 1. Un agente de contraste bicíclico de fórmula



10 donde uno de los ciclos corresponde a un ligante macrocíclico tetraaza de la familia del cyclen (1,4,7,10-tetraaza ciclododecano) cuando  $n=1$  y si  $n=2$  corresponde a un macrocíclico tetraaza de la familia del cyclam (1,4,8,11-tetraaza ciclotetradecano).  $R_1$  y  $R_2$  consisten de metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos saturados o insaturados de un átomo de

15 carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.  $R_1$  y  $R_2$  pueden ser iguales o no.  $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5$  y  $[a]_x$  forman parte del segundo ciclo donde  $x$  puede ser desde 6 hasta 50.  $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5$  y  $[a]_x$  están unidos entre si formando enlaces tipo amida.  $-a_1-a_2-a_3-a_4-a_5-[a]_x-$  debe

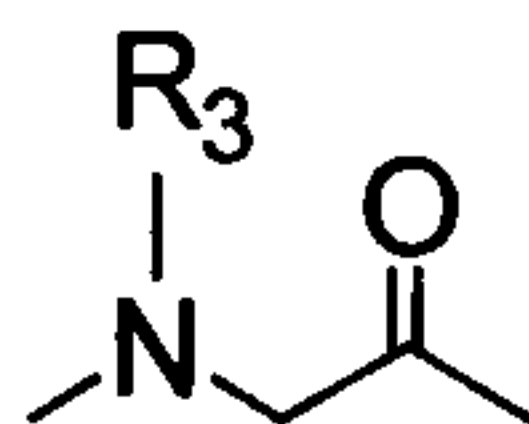
20 tener una afinidad alta por un bioreceptor específico.  $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5$  y  $[a]_x$  comprenden aminoácidos naturales L o D (serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina, tirosina, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina,



fenilalanina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina,

histidina); aminoácidos no naturales o químicamente modificados L o D,

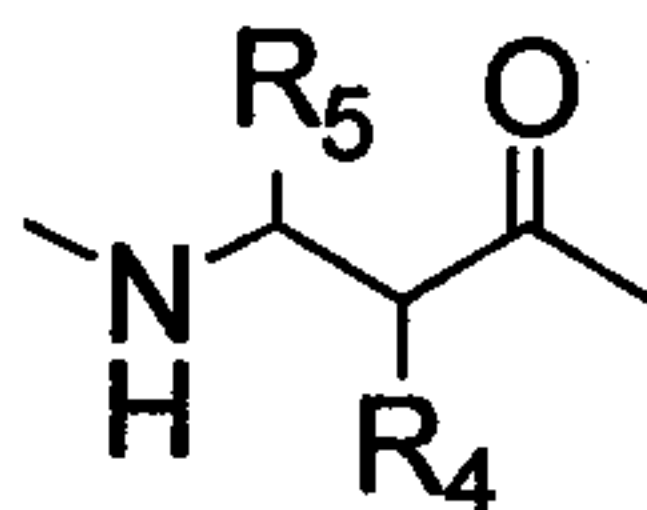
aminoácidos según la fórmula



5

donde  $R_3$  son cadenas alifáticas lineales con o sin ramificaciones de hasta 40 carbonos, compuestos cíclicos saturados o insaturados de hasta 8 carbonos, o compuestos policíclicos condensados saturados o insaturados de hasta 8 carbonos por ciclo; aminoácidos beta según la fórmula

10



donde  $R_4$  y  $R_5$  comprenden hidrógenos, cadenas alifáticas lineales o ramificadas de hasta 40 carbonos, compuestos cíclicos saturados o insaturados de hasta 8 carbonos, o compuestos policíclicos condensados saturados o insaturados de hasta 8 carbonos por ciclo.  $R_4$  y  $R_5$  pueden ser iguales o diferentes estar presentes o no; y/o combinaciones de estos.

15

ES comprende cadenas alifáticas lineales de 2 a 30 carbonos, compuestos cíclicos saturados o insaturados de hasta 8 carbonos, o compuestos policíclicos condensados saturados o insaturados de hasta 8 carbonos por ciclo o cadenas de poliméricas. ES se une a los ciclos a través de enlaces amida.

20

M comprende un ión metálico paramagnético como  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Ho, Er, Lu e Y o un ión metálico radioactivo tal



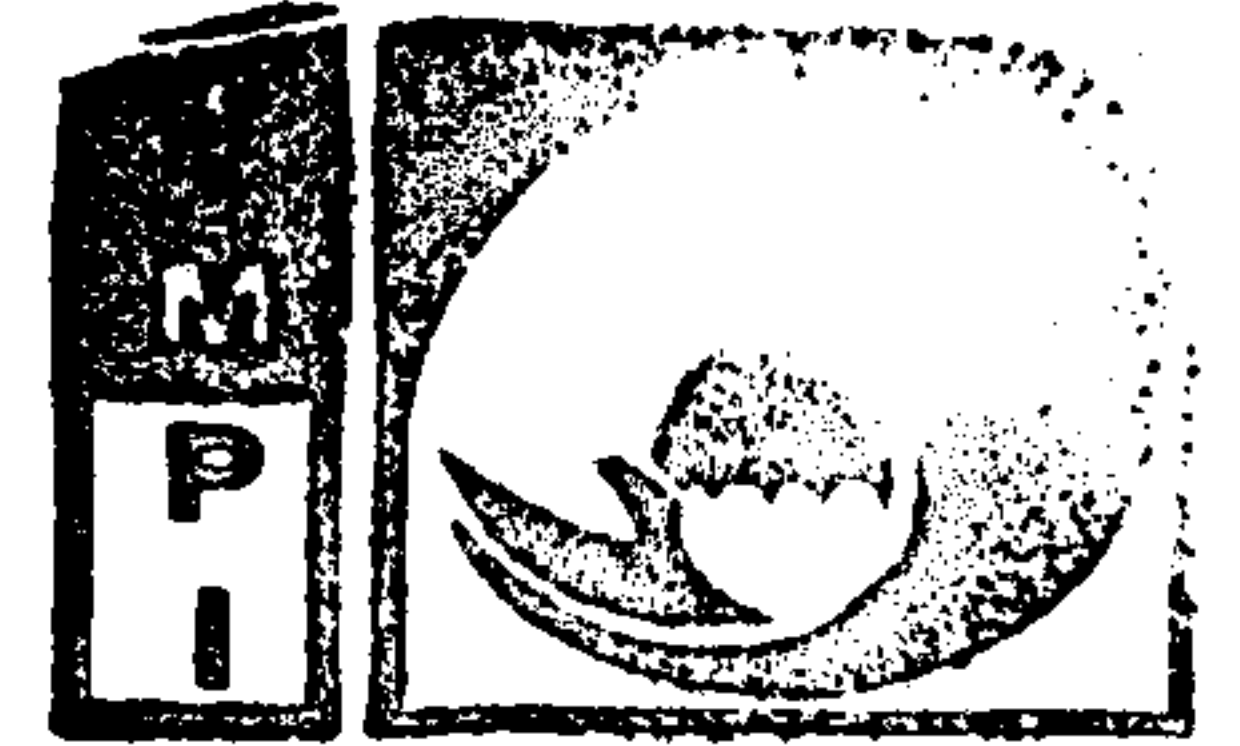
como  $^{111}\text{In}^{3+}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}^{3+}$ ,  $^{67}\text{Ga}^{3+}$ ,  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{4+}$ ,  $^{64}\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Tl}^{3+}$ ,  $^{153}\text{Sm}^{3+}$ ,  $^{166}\text{Ho}^{3+}$ ,  $^{212}\text{Bi}^{3+}$ ,  $^{90}\text{Y}^{3+}$ ,  $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ,  $^{225}\text{Ac}^{3+}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{197}\text{Pt}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ , y  $^{212}\text{Pb}$ .



2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de uno más  
 5 agentes de contraste bicíclicos descritos en la reivindicación 1 con uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
3. Una composición farmacéutica como descrito en la reivindicación 1 y 2 para su uso en diagnóstico por imagen por técnicas de MRI, SPECT, PET, rayos-X, métodos ópticos o ultrasonido y combinaciones de estas.

10

15



## RESUMEN

En la presente invención se presentan agentes de contraste bicíclicos constituidos por un **Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial** ligante macrocíclico tetraaza, un péptido o pseudopéptido con actividad de reconocimiento específico para un bioreceptor y un ión metálico. Así mismo se presenta

5 un proceso general para la síntesis de estos agentes de contraste bicíclicos. Los agentes de diagnóstico presentados tienen aplicación médica en diagnóstico por imagen y terapia de enfermedades.