



19

REGISTRO DE LA  
PROPIEDAD INDUSTRIAL

ESPAÑA

11 N.º de publicación: ES 2 024 601

51 Int. Cl.<sup>5</sup>: A61K 49/02

C07F 13/00

A61K 43/00

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

B3

86 Número de solicitud europea: **88113317.7**

86 Fecha de presentación : **17.08.88**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 304 780**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.89**

54 Título: **Procedimiento para marcar sustancias con tecnecio o renio.**

30 Prioridad: **27.08.87 DE 37 28 600**

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:  
**01.03.92**

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:  
**01.03.92**

73 Titular/es: **Hoechst Aktiengesellschaft**  
**Postfach 80 03 20**  
**W-6230 Frankfurt am Main 80, DE**

72 Inventor/es: **Bremer, Karl-Heinz;**  
**Kuhlmann, Ludwig; Magerstädt, Michael;**  
**Schwarz, Alexander y Steinsträsser, Axel**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

**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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Es objeto del invento un procedimiento para marcar sustancias con isótopos de tecnecio o renio - especialmente radiactivos - con ayuda de formadores de complejos, así como el empleo de estas sustancias marcadas.

Las posibilidades de aplicación de radionucleidos en la técnica son muy diversas. Abarcan por ejemplo el ensayo de una mezcla a fondo, la determinación analítica por dilución de cantidades o volúmenes, la medición de la velocidad de flujo y el registro del tiempo de permanencia en instalaciones de producción que trabajan en continuo.

Sin embargo, la mayoría de las veces no es suficiente la simple mezcladura de un nucleido radiactivo, sino que, por ejemplo en la "vigilancia" de un determinado componente de un sistema, el nucleido radiactivo ha de ser copulado físicamente o, aún mejor, químicamente a al menos un compuesto del componente a investigar y todo ello sin afectar, a ser posible, las propiedades físicas y químicas del correspondiente compuesto.

En los últimos años creció la demanda de marcar compuestos químicos con nucleidos radiactivos. Sobre todo en el sector del diagnóstico médico, en donde estados patológicos ya pueden ser indicados por sustancias que se presentan en el organismo sólo en ppm o incluso en concentraciones todavía menores, no se puede renunciar hoy en día ya a sustancias marcadas radiactivamente.

En particular, el tecnecio-99m se ha convertido en el radionucleido más importante en el diagnóstico médico nuclear debido a sus favorables propiedades físicas (carencia de una radiación corpuscular, energía  $\tau$  de 140 KeV y período de semidesintegración de 6 horas) y de la escasa sollicitación por radiación unida con ello.

El tecnecio-99m, que se puede obtener a partir de generadores de nucleidos, está presente primeramente como pertecnetato que es apropiado en esta forma, por ejemplo para el registro de centelleo del tiroides y cerebro. El registro de centelleo de otros órganos con tecnecio-99m se consigue con ayuda de determinadas "sustancias de transporte" que, por un lado, están capacitadas para fijar tecnecio y, por otro lado, lo están para enriquecer el radionucleido en el órgano objetivo con una elevada selectividad. Para la marcación de la "sustancia de transporte" específica del órgano con tecnecio-99m, el pertecnetato eluido a partir del generador de nucleidos ha de transformarse primeramente en una etapa de oxidación inferior. En esta forma reducida, el tecnecio forma con la sustancia específica del órgano compuesto más o menos estables. Para el registro de centelleo de los huesos se emplean por ejemplo derivados de ácido Tc-99m -fosfórico, sobre todo ácidos fosfóricos orgánicos. Así, en la unidad de marcación descrita en la patente europea 2485 está presente como "sustancia de transporte" específica del órgano la sal sódica del ácido 3,3-difosfona-1,2-propandicarboxílico. En la patente europea 108.253 se describen ácidos Tc-99m-tri- y tetra-fosfónicos para la representación del registro de centelleo del RES, en particular del hígado. El complejo de Tc-99m con ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) encuentra aplicación en el diagnóstico de enfermedades renales o procesos patológicos del cerebro.

Para la marcación de determinadas sustancias con tecnecio-99m y para la producción de estuches para ensayo apropiados para la demanda clínica rutinaria se desarrollaron y describieron procedimientos especiales. Para la separación de instrumentales de marcación para macromoléculas biológicamente interesantes, en particular porfirinas, dextranos, citocromos y mioglobina, se describe un método (G.D. Zanelli, D. Ellison, M.P. Barrowcliffe, Nucl. Med. Commun. 8, 199-206, 1987), en el que la sustancia a marcar se liofiliza junto con ácido p-aminobenzoico y una solución clorhídrica de SnCl<sub>2</sub>. Para la reconstitución y la marcación de estos estuches se agrega un producto eluido de generador de Tc-99m que previamente había sido diluido con suficiente solución tampón, por ejemplo con tampón citrato-cloruro de sodio, pH 9,5. Sin embargo, este método no es apropiado para sustancias sensibles a los ácidos.

En el caso de otro procedimiento (E.K.J. Pauwels, R.I.J. Feitsma, publicación internacional de solicitud de patente n° WO 86/03010) se reduce primeramente Tc-99m-pertecnetato mediante calentamiento durante cuatro horas hasta 140°C en solución fuertemente clorhídrica y se fija a un compuesto que contiene un grupo amino, por ejemplo dimetilformamida. El producto intermedio, marcado con Tc-99m, capaz de reaccionar, que precipita en forma de una sustancia cristalina difícilmente soluble, se hace reaccionar en una solución tampón, por ejemplo solución de carbonato de sodio, por incubación durante un hora a temperatura ambiente con el compuesto a marcar. El método trabaja ciertamente exento de estaño pero, debido a las complejas etapas del procedimiento, es apenas apropiado para la aplicación rutinaria.

Para la marcación de proteínas, en particular anticuerpos, se conocen dos vías diferentes. En el caso

del método directo, el tecnecio-99m reducido se fija mediante grupos donantes (grupos amino, amido, tiol, etc.) de la proteína.

Procedimientos de este tipo están descritos en la patente europea 5638 y en la patente de EE.UU. 4.478.815. Allí, se emplean sales de estaño-II en exceso para la disociación reductora simultánea de puentes disulfuro y para la reducción del Tc-99m-pertecnetato añadido. Por lo general, para la disociación del enlace -S-S- se requieren tiempos de incubación más largos (24 horas), disociándose fragmentos de  $F(ab')_2$  parcialmente en fragmentos de  $f(ab)$ . Recientes citas bibliográficas, por ejemplo *Journal of Nuclear Medicine* 27 (1986), páginas 685-93 y 1315-20 así como *International Journal of Nuclear Medicine Biology* 12 (1985) páginas 3-8 demuestran que la relación de los dos fragmentos depende de la "reacción de estannización" y que la relación de los dos componentes después de la marcación con Tc-99m ya no varía de forma digna de mención, siendo el componente principal  $F(ab')$  marcado con Tc-99m. En todos los casos, el fragmento  $F(ab')$  marcado debía ser purificado posteriormente, puesto que, a pesar de un tiempo de reacción de al menos 30 minutos, no se alcanzaba ninguna reacción cuantitativa de pertecnetato.

En un método químico rápido para la marcación con Tc-99m de proteínas del plasma humanas (D.W. Wong, F. Mishkin, T. Lee, *J. Nucl. Med.* 20, 967-72, 1979) se reduce primeramente pertecnetato en solución ácida por parte de iones estaño -II, y el tecnecio reducido se hace reaccionar después con la proteína.

Empleando formadores de complejos bufuncionales se puede conseguir una marcación estable de sustancias con radioisótopos.

En la patente de EE.UU. 4.479.930 se indican los anhídridos cíclicos de DTPA y EDTA como agentes quelantes no sólo para In-111 y Ga-67, sino también para Tc-99m. En la patente europea 35765 se menciona el empleo de deferoxamina como agente formador de complejos para tecnecio-99m en proteínas. En la solicitud de patente internacional Wo 85/3063 se hacen reaccionar en el anticuerpo los puentes disulfuro parcialmente reducidos con la sal sódica del tetracloronitridotecnetato que debe ser preparado previamente por reacción de pertecnetato con azida de sodio. En la solicitud de patente europea 194853 se utilizan igualmente grupos tiol libres, producidos por reducción en fragmentos de anticuerpos, para la fijación de ácido [(7-maleimidoheptil)imino-bis(etilnitrilo)]-tetracético como complejo de quelatos. La copulación del complejo el anticuerpo se realiza a través de la reacción de los grupos SH con el doble enlace en la parte maleinimida del compuesto de complejo, mientras que el ion metálico radiactivo forma complejos a través de los radicales ácido nitrilodiacético.

Metalotioneína, una proteína que fija metales, con un peso molecular de 6000 y una elevada proporción de cisteína en la molécula se introdujo como formador de complejos en el anticuerpo (G.L. Tolman, R.J. Hadjian, M.M. Morelock et al., *J. Nucl. Med.* 25, 20, 1984). Por intercambio con glucoheptonato de Tc-99m se pudo marcar con tecnecio el conjugado anticuerpo-metalotioneína. El intercambio permanecía sin embargo incompleto, de modo que era necesaria una purificación posterior. Varios ligandos de bistiosemicarbazona se describieron igualmente como formadores de quelatos bifuncionales (Y. Arano, A. Yokoyama, H. Magat et al., *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 12, 425-30, 1986). p-carboxietilfenilgloxal-di(N -metiltiosemicarbazona) se conjugó con albúmina de suero humana. El complejo 1:1 marcado con Tc-99m mostraba una cierta inestabilidad, mientras que complejos con una proporción mayor que 1:1 presentaban una acumulación incrementada en el hígado. La copulación de un ligando de diamida-dimercapturo - $N_2S_2$  a proteínas (A.R. Fritzberg, S. Kasina, J.M. Reno et al., *J. Nucl. Med.* 27, 957-958, 1986) se realiza a través de un grupo funcional adicional. Así, por ejemplo 4,5-di(S -etilcarbonilmercaptoacetamida)pentanoil-N-hidroxisuccinimida se hizo reaccionar con un anticuerpo antimelanoma. El conjugado resultante se incubó a pH 8 y 50°C con solución de Tc-99m-tartrato. Después de una hora, se había transferido al anticuerpo 78% del tecnecio procedente del tartrato.

Con el fin de poder aprovechar en un amplio espectro diagnóstico el tecnecio-99m, es necesario transportar selectivamente este nucleido al órgano a investigar. El tecnecio-99m debería de ser eliminado de nuevo rápidamente a partir de otros órganos o sistemas de órganos o no ser incluso incorporado con el fin de evitar una innecesaria sollicitación por radiación para el paciente. Para este fin, hasta ahora se han empleado predominantemente sustancias que pueden marcarse directamente con tecnecio-99m y que tienen una elevada especificidad para el órgano. Además de ello, existe sin embargo una serie de sustancias que presentan ciertamente una elevada especificidad para el órgano, pero que no son directamente marcables. Estas pueden ser proteínas (fibrinógeno, albúmina del suero humano), enzimas (estreptoquinasa, lactato deshidrogenasa), azúcares (dextrano, glucosa) o también polímeros. A ellas pertenecen asimismo sustancias de bajo peso molecular, tales como por ejemplo ácidos grasos que se enriquecen en el tejido del miocardio por la elevada demanda energética del corazón. Con el fin de poder marcar estas sustancias, éstas se copulan con formadores de complejos que, a su vez, pueden fijar firmemente tecnecio-99m.

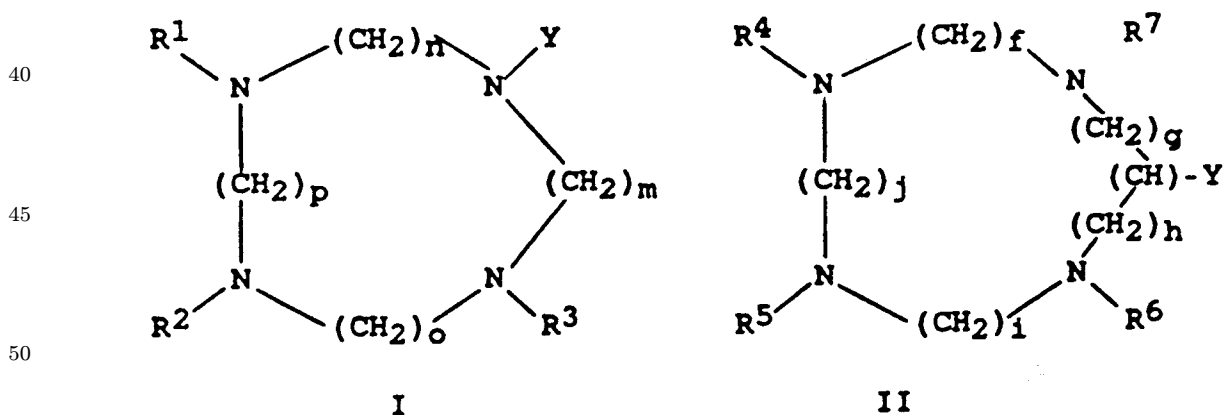
Como formadores de complejos apropiados para la formación de complejos de isótopos de tecnecio y renio son conocidas aminas macrocíclicas, entre otras también ciclamas. El rendimiento en la producción de complejos está situado para el complejo de tecnecio y ciclama en 99% en condiciones apropiadas. Particularidades sobre los complejos de tecnecio y amino se mencionan en D.E. Troutner, J. Simon, A.R. Ketring, W.A. Volkert, R.A. Holmes, J. Nucl. Med. 21 (1980), 443 o S.A. Zuckman, G.M. Freeman, De.E. Troutner, W.A. Volkert, R.A. Holmes, D.G. van der Keer, E.K. Barefiled, Inorg. Ch. 20 (1981), 3386 o J. Simon, D. Troutner, W.A. Volkert, R.A. Holmes, Radiochem, Radioanal. Lett. 47 (1981), 111. También ciclamas sustituidas, tanto en el nitrógeno 1 como también sustituidas en el carbono 6, son conocidas (A.R. Ketring, D.E. Troutner et al., Int. J. Nucl. Med. Biol. 11 (1984), 113 o J. Simon. Diss. Abstr. Int. B42 (1981), 645 o M. Struden, T.A. Kaden, Helv. Chim. Acta 69 (1986), 2081 o E. Kimura, R. Machida, M. Kodama, J. Am. Chem. Soc. 106 (1984), 5497. Todos los intentos realizados hasta ahora de conjugar ligandos de amina y también otros ligandos a proteínas (véase Fritzberg et al., J. Nucl. Med. 27 (1986), 957 o Tolman et al., J. Nucl. Med. 25 (1984), 20 o Arano et al., Int. J. Nucl. Med. Biol. 12 (1986) 425) conducían a productos que no cumplían, o sólo lo hacían en parte, los elevados requisitos de estabilidad in vivo.

Se ha encontrado ahoa un procedimiento que permite marcar sustancias con isótopos de tecnecio o renio con ayuda de aminas macrocíclicas sustituidas, en particular ciclamas.

Por las "sustancias" que se pueden marcar con ayuda del procedimiento de acuerdo con el invento, se entienden en primer lugar compuestos que pueden emplearse en el diagnóstico médico como "sustancias de transporte", es decir, la mayor parte de la veces compuestos que presentan una muy elevada especificidad para el órgano, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos F(ab')<sub>2</sub> ó F(ab'), proteínas, tales como fibrinógeno, albúmina de suero humano, esteroides, lípidos, enzimas, tales como estreptoquinasa, lactato-deshidrogenasa, azúcares, tales como dextrano, glucosa o también polímeros. Por otra parte, con ayuda del procedimiento de acuerdo con el invento se pueden marcar sin embargo también en general sustancias que reaccionan con el grupo funcional junto a la cadena lateral de la amina macrocíclica con formación de un enlace químico. En este caso se piensa en la "vigilancia" de sustancias químicas en instalaciones de producción, la determinación de su concentración, velocidad de flujo, tiempo de permanencia, etc.

Por consiguiente, el invento concierne a un procedimiento para la marcación de sustancias con isótopos de tecnecio o renio, que está caracterizado porque

a) se hace reaccionar la sustancia a marcar con un derivado de amina macrocíclica sustituido en N o sustituido en C de la fórmula I y/o II



en donde

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> significan hidrógeno y  
 m, n, o, p, f, h, i, j son iguales o diferentes y significan 1, 2, 3 ó 4 y g significa 0, 1, 2, 3 ó 4 e  
 Y significa un grupo de la fórmula -X-NH<sub>2</sub>, -X-NCS, -X-COOH, -X-OH, -X-N<sub>2</sub><sup>+</sup> ó -X-COCl o  
 significa un grupo de la fórmula -X-Z, significando Z fluoro, cloro, bromo o yodo y X significa  
 un grupo alquileo con 1 a 40 átomos de C ó X significa un grupo orto-, meta- o para -  
 fenileno o un grupo orto-, meta- o para-fenilmetilo, y el compuesto, así obtenido, se marca con

tecnecio-99m o renio-186 ó -188, mezclándolo con pertecnetato-99m o o perrenato-186 ó -188 y un agente reductor para pertecnetato -99m o perrenato-186 ó -188 o porque

- b) primeramente se prepara el complejo de tecnecio-99m y/o renio-186 ó -188 por reacción de un compuesto de fórmula I y/o II con pertecnetato-99m y/o perrenato-186 ó 188 y un agente reductor para pertecnetato-99m y/o perrenato -186 ó -188 y, a continuación, se hace reaccionar este complejo de tecnecio-99m y/o renio-186 ó -188 con la sustancia a marcar.

En particular, el invento concierne a un procedimiento para la marcación de sustancias con isótopos de tecnecio o renio, en el que se emplean amins macrocíclicas de fórmula I y/o II, en donde  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  significan hidrógeno y m, n, o, p, f, i y j son iguales o diferentes y significan 2 ó 3, y g significa 0, 1 ó 2 y h significa 1 ó 2 e Y significa un grupo de las fórmulas  $-X-NH_2$ ,  $-X-NCS$ ,  $-X-COOH$ ,  $-X-OH$ ,  $-X-N_2^+$  ó  $-X-COCl$  o significa un grupo de la fórmula  $-X-Z$ , significando Z fluoro, cloro, bromo o yodo y X significa un grupo alquileo con 1 a 20 átomos de C.

Muy particularmente preferido es un procedimiento para la marcación de sustancias con isótopos de tecnecio o renio, en el que se emplean amins macrocíclicas de la fórmula I y/o II, en donde

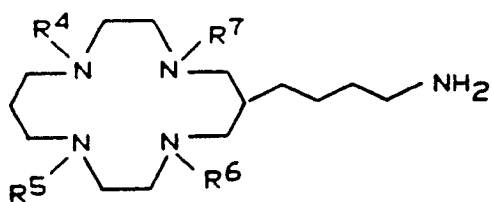
$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  significan hidrógeno y m, p y j significan 3 y n, o, f e i significan 2 y g y h significan 1 e Y significa un grupo de la fórmula  $-X-NH_2$ , significando X un grupo alquileo con 1 a 15 átomos de C.

Además, el invento concierne el empleo de las sustancias marcadas, en particular en el diagnóstico médico.

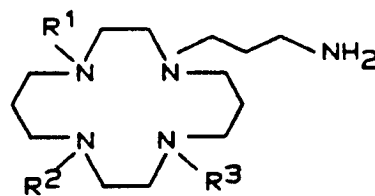
Por arilo se entiende fenilo y naftilo, en particular fenilo. Los grupos alquilo con más de 2 átomos de C pueden ser tanto de cadena lineal como también ramificados. En el caso del grupo alquileo X se trata preferentemente de alquileo de cadena lineal con hasta 40 átomos de C, de preferencia hasta 20, de manera particularmente preferida hasta 15 átomos de C.

En el procedimiento de acuerdo con el invento, un derivado de amina macrocíclica sustituida en N o sustituida en C, que lleva en el extremo del sustituyente un grupo funcional, se fija con ayuda de este grupo funcional a la sustancia a marcar. Eventualmente, después de la correspondiente purificación del producto conjugado (por ejemplo por ultrafiltración o diálisis en el caso de proteínas o polímeros, por cromatografía en columna en el caso de sustancia de bajo peso molecular, tales como esteroides o lípidos), tecnecio -99m en forma de pertecnetato o renio-186 ó -188 en forma de perrenato y un agente reductor adecuado para la reducción del pertecnetato o perrenato se agregan, en una secuencia arbitraria o juntos, en la etapa de oxidación requerida para la formación del complejo. El sustrato marcado se purifica eventualmente de nuevo.

Alternativamente, también se puede producir en primer lugar el complejo de tecnecio o renio de la amina cíclica y después hacer reaccionar éste con la sustancia para dar el producto conjugado. En este caso, la formación del complejo y la reducción discurren tal como se ha descrito antes. De preferencia, la reacción de formación de complejos se lleva a cabo a pH básico (7 a 14). De preferencia, se emplean amins macrocíclicas de las fórmulas III ó IV



III



IV

en calidad de formadores de complejos.

La preparación de las aminas macrocíclicas según la fórmula I o II se consigue de la forma más sencilla haciendo reaccionar bis-( $\omega$ -aminoalquil)-aminas, que primeramente se tritosilan y a continuación se transforman en la sal disódica, con  $\alpha, \omega$ -dihidroxicicloalquilamina triplemente etoxilada, seguido de una destosilación. Un método de síntesis correspondiente se ha descrito por J. Richman y T. Atkins en J. Am. Chem. Soc. 96 (1974), 2268. Los radicales  $R^1$  a  $R^7$  se pueden introducir según procedimientos conocidos por la bibliografía, por ejemplo por alquilación de halogenuros de metales alcalinos.

La copulación de la cadena lateral exocíclica con grupo reactivo en posición terminal a un grupo NH se efectúa por ejemplo por reacción de las aminas macrocíclicas con halogenuros de ácidos  $\omega$ -nitroalquilcarboxílicos, de preferencia cloruros de ácidos  $\omega$ -nitroalquilcarboxílicos y subsiguiente hidrogenación, reduciéndose los grupos carbonilo y nitro en un grupo  $CH_2$  ó  $NH_2$ . Una reacción análoga con bromuros se ha descrito por ejemplo en A.R. ketring, D.E. Troutner et al., Int. J. Nucl. Med. Biol., 11 (1984), 113.

Para la preparación de las aminas macrocíclicas sustituidas en C se puede proceder por ejemplo de la siguiente forma:  $N,N'$ -(aminoalquil)- $\alpha, \omega$ -alcanodiamina se transforma con cloruro de tosilo y alcoholato de sodio en el derivado disódico de tetratosilo, que se hace reaccionar (preferentemente) con un  $\alpha, \omega$ -alquiltosilato de tosilaminoalquilo para dar el tetraazacicloalcano sustituido con C-aminoalquilo.

Todas estas variantes de la síntesis de aminas macrocíclicas se basan, en mayor o menor medida, en el procedimiento de J. Richman y T. Atkins (véase cita anterior). Por simples variaciones de este procedimiento se pueden preparar las más diversas aminas macrocíclicas - por ejemplo aminas con cadenas alquilenas de diferente longitud o también aminas con cadenas laterales exocíclicas sustituidas en C-.

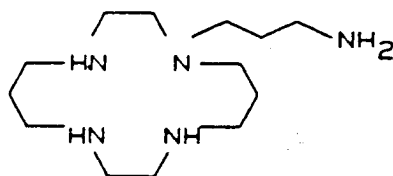
La mayoría de los compuestos de partida antes descritos, por ejemplo muchas  $N,N'$ -diaminoalquil- $\alpha, \omega$ -alcanodiaminas y muchos  $\alpha, \omega$ -alcanodiolos sustituidos en "Y" se obtienen en el comercio o se pueden preparar de manera sencilla.

La reducción del pertecnetato o del perrenato se puede realizar según procedimientos conocidos por la bibliografía, de preferencia con un compuesto de estaño-II. De manera particularmente preferida, la reducción se realiza con una sal de estaño-II estabilizada con complejos, según un "procedimiento de marcación", tal como se propuso en la memoria de patente alemana DE-A 3728599. En este caso, el compuesto de estaño-II se mezcla primero con un formador de complejos, preferentemente un compuesto de fósforo, tal como un fosfonato o pirofosfato que procura que el compuesto de estaño permanezca en solución, sobre todo en el intervalo fisiológico de pH. Esta solución de sal de estaño-II estabilizada con complejo se puede agregar a la sustancia a marcar, tras lo cual se realiza la adición de la solución de pertecnetato o perrenato, o se puede agregar a una mezcla a base de la sustancia a marcar y la solución de pertecnetato o perrenato.

En lo que sigue se explica más detalladamente el invento con ayuda de ejemplos y se define en las reivindicaciones.

#### Ejemplo 1

Preparación de la ciclama N-sustituida 1-(3-aminopropil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.



a) 5 g de ácido 3-nitropropiónico se disuelven en aproximadamente 40 ml de  $SOCl_2$  y se hierven a reflujo durante 2 h. El  $SOCl_2$  se elimina y el producto se seca en vacío.

b) 6,6 g de ciclama (1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano) y 0,18 g de  $Na_2CO_3$  se disponen previamente en 100 ml de  $CHCl_3$   $0^\circ C$ . A ello se añaden gota a gota 0,45 g de cloruro de ácido 3-nitropropiónico. Después de agitar a lo largo de 24 h, se hierve a reflujo durante 8 h y después se encuentra la solución y se seca. El residuo se recoge en HCl acuoso (pH 1,5) y se extrae 2 veces con sendos 100 ml de dietiléter. Se concentra de nuevo hasta sequedad.

El residuo se agrega a 100 ml de NaOH al 40%, se titula y la mezcla se extrae 2 veces con sendos 50 ml de  $(C_2H_5)_2O$ . La fase etérea se desecha. La extracción de la base con 2 veces 100 ml de acetato de etilo proporciona, después de la separación y el secado de la fase orgánica un residuo amarillento a partir del cual se separa por sublimación a  $100^\circ C/0,1$  torr ciclama en exceso. Después de la recrystalización en  $H_2O$  se obtiene la (3-nitropropil)-amidociclama en forma de un material sólido higroscópico amarillento (descomposición a  $175^\circ C$ ), caracterizado por análisis de C, H, N, espectro de masas y  $^1H$ -RMN así como IR.

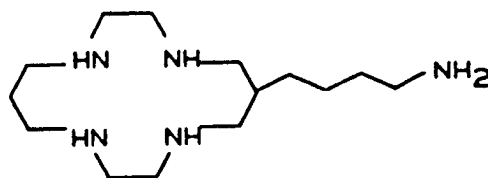
Rendimiento: 0,22 g (25%)

A una solución acuosa saturada con  $H_2$  de un catalizador a base de 10% de Pt sobre carbono activo se agregan a  $0^\circ C$  una solución acuosa de 0,2 g de (3-nitropropil)-amidociclama y amoníaco (pH 10). La mezcla se lleva bajo una atmósfera de  $H_2$ . La reacción finaliza cuando ya no se consume más  $H_2$ . La solución se filtra a través de tierra de diatomeas y se liofiliza. El 1-(3-aminopropil)-1,4,8,11-tetraazaciclodecano se obtiene en forma de un material sólido amarillento y se caracteriza por análisis de C, H, N, espectros de masas y  $^1H$ -RMN.

Rendimiento: 100 g ( $\cong$  58% del teórico).

## Ejemplo 2

Preparación de 6-(4-aminobutil)-1,4,8,11-tetraazaciclodecano



### a) Síntesis de $TsHN-(CH_2)_2-NTs-(CH_2)_3-NTs-(CH_2)_2-NHTs$

2 g de  $N,N'$ -(diaminoetil)-1,3-propandiamina se disuelven junto con 2 g de NaOH en 250 ml de agua y durante 30 minutos se añaden gota a gota, con fuerte agitación y a temperatura ambiente, 9,4 g de cloruro de p-toluensulfonilo, disueltos en 80 ml de dietiléter. Después de 1 h se evapora lentamente el éter por introducción de  $N_2$ , precipitando el producto tetratosilano. Se separa por filtración a partir de la solución, se lava cuidadosamente con gran cantidad de agua y se seca en vacío. El producto sólido incoloro se puede identificar en  $CDCl_3$  por su espectro de  $^1H$ -RMN. Rendimiento 6,5 g (67% de la teoría).

### b) Síntesis de $NaTsN-(CH_2)_2-NTs-(CH_2)_3-NTs-(CH_2)_2-NTsNa$

El tetratosilato (6,5 g) se dispone previamente en aproximadamente 200 ml de  $C_2H_5OH$  y a ello se añade gota a gota un solución de 0,4 g de Na en 40 ml de  $C_2H_5OH$ . Después de hervir a reflujo durante 1 h, la solución se concentra en el evaporador rotatorio y la sal sódica del tetratosilato se seca en vacío. Rendimiento: 6,8 g, sublimación /descomposición a  $110^\circ C$ .

### c) Síntesis de éster dietílico de ácido 2-(3-cianopropil)malónico

5,2 g de NaH se lavan 3 veces con éter de petróleo y luego se recogen en 300 ml de THF. A  $0^\circ C$  se añade lentamente gota a gota malonato de dietilo (16g) bajo nitrógeno, después se calienta la mezcla hasta temperatura ambiente, se hierve a reflujo durante 2 h, después se enfría de nuevo hasta  $0^\circ C$  seguido de la adición gota a gota del 4-bromobutironitrilo (8,2 ml) en aproximadamente 20 ml de tetrahidrofurano. Después de agitar durante 15 horas a temperatura ambiente, se hierve a reflujo durante 1 h, se enfría, se separa por filtración a partir del NaBr y se concentra para formar un aceite. Después de la adición de aproximadamente 50 ml de  $CH_2Cl_2$  se extrae 2 veces con sendos 100 ml de  $H_2O$  y después se separa la fase orgánica, se seca sobre  $MgSO_4$  y se concentra. El residuo oleoso se destila en vacío y se transforma a  $105-112^\circ C/0,1-0,5$  mm de Hg. La  $^1H$ -RMN en  $CDCl_3$  muestra el producto. Rendimiento 6,02 g (32% de la teoría).

### d) Síntesis de 2-(aminobutil)-propan-1,3,diol

6 g de éster dietílico de ácido 2-(butilnitril)-malónico se añaden gota a gota bajo  $N_2$  a  $-10^\circ C$  a una suspensión de 3 g de  $LiAlH_4$  en 100 ml de dietiléter seco. La mezcla se calienta lentamente

hasta temperatura ambiente y luego se hierve a reflujo durante 3 h. Después de nuevo enfriamiento hasta  $-10^{\circ}\text{C}$ , el hidruro en exceso se descompone con agua. El precipitado se separa a través de una frita y se lava varias veces con dietiléter. La solución en éter se seca a través de  $\text{MgSO}_4$ , se filtra y se concentra en el evaporador rotatorio. Rendimiento, 0,66 g del 2-(aminobutil)-propan-1,3-diol, determinable en  $^1\text{H-RMN}$  y por análisis de C, H. Material sólido vítreo, p.f.:  $126^{\circ}\text{C}$  (a partir de  $60^{\circ}\text{C}$ , meloso).

e) Transformación del 2-(aminobutil)-propan-1,3-diol en el O,O,N-tritosilato

El 2-(aminobutil)-propan-1,3-diol (0,6 g) se dispone previamente en 50 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , después se añaden 1,22 ml de piridina y a esta solución se añaden gota a gota, a  $20^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, 2,35 g de  $\text{TsCl}$  en 20 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Después de agitar durante 20 horas, se lava varias veces con  $\text{HCl}$  2 N, la fase orgánica se separa, se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentra en el evaporador rotatorio. El producto 2-(aminobutil)-propan-1,3-diol tosilado - se puede purificar por cromatografía en columna con butanol/gel de sílice. Determinación por análisis de C, H, N y  $^1\text{H-RMN}$ . Rendimiento: 2,36 g (95%).

f) Ciclación

1,74 g de la sal disódica del Ejemplo 2b) se disponen previamente en 5 ml de dimetilformamida, se calientan hasta  $100^{\circ}\text{C}$  y a ello se añade gota a gota a  $100^{\circ}\text{C}$  el dioltritosilato procedente del Ejemplo 2e), disuelto en 10 ml de DMF. Después de agitar durante 4 h a  $100^{\circ}\text{C}$ , la solución se enfría hasta temperatura ambiente y después se agita todavía durante otras 15 h. Después de la adición de aproximadamente 10-15 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  precipita 6-(4-aminobutil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano tosilado que se lava varias veces con agua y se seca. Rendimiento 1,43 g (66% de la teoría). Caracterización por  $^1\text{H-RMN}$  en  $\text{CDCl}_3$ . Descomposición a partir de  $132^{\circ}\text{C}$ , totalmente descompuesto a  $236^{\circ}\text{C}$ .

g) Destosilación

El pentatosilato procedente del Ejemplo 2f) (1,4 g) se añade a 20 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y se mezcla a  $95^{\circ}\text{C}$ . Tan pronto como una muestra sea soluble en agua, se enfría hasta  $-10^{\circ}\text{C}$  y el producto se precipita con 20 ml de dietiléter. Después de la filtración, el material sólido gris secado se añade a  $\text{NaOH}$  al 40% (40 ml) y después se extrae varias veces con dietiléter. A partir del éter se obtiene el 6-(4-aminobutil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano que puede ser purificado por cromatografía. Rendimiento: 0,3 g (85%). Caracterización por análisis de C, H, N, espectro de masas y  $^1\text{H-RMN}$ .

### Ejemplo 3

#### Síntesis de 6-(11-hidroxiundecil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano

a) Síntesis del éster metílico de ácido 11-bromoundecanoico

En un matraz de tres bocas con refrigerador, contador en burbujas, termómetro y embudo de goteo se disponen previamente 26,5 g (0,10 moles) de ácido 11-bromoundecanoico y se añaden gota a gota, bajo enfriamiento con hielo, 17,8 g (0,15 moles) de cloruro de tionilo, de modo que la temperatura no rebase  $20^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se calienta en un baño de agua hasta  $70^{\circ}\text{C}$  y se agita hasta finalizado el desprendimiento de gas ( $\text{HCl}$ ,  $\text{SO}_2$ ). el cloruro de tionilo no consumido se condensa en vacío por chorro de agua en una trampa de refrigeración.

Al cloruro de ácido 11-bromoundecanoico no purificado se añaden 3,52 g (0,11 moles) de metanol anhidro y se agita en un baño de agua a  $40^{\circ}\text{C}$  hasta finalizado el desprendimiento de ácido clorhídrico. El producto bruto obtenido se destila a través de una columna Vigreux (p.e.:  $105$  a  $108^{\circ}\text{C}/0,1$  mbar). Rendimiento: 26,19 g (96,8%), caracterización por  $^1\text{H-RMN}$ , espectro de masas, análisis de C, H.

b) Síntesis del éster metílico de ácido 12,12-dicianododecanoico

En un matraz de tres bocas con agitador, enfriador a reflujo y embudo de goteo se disponen previamente 100 ml de tetrahidrofurano anhidro y se suspenden con agitación 11,22 g (0,10 moles) de terc-butolato de potasio. A ello se agregan gota a gota bajo enfriamiento con hielo, 6,61 g (0,10 moles) de 1,1-dicianometano, disueltos en 20 ml de tetrahidrofurano anhidro, de modo que la temperatura no rebase  $10^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se añaden 28,0 g (0,10 moles) de éster metílico de ácido 11-bromoundecanoico y se hierve durante 15 h a reflujo. Después de enfriar, se separa por filtración el bromuro de potasio precipitado, el filtrado se concentra a sequedad en el evaporador rotatorio, el residuo se recoge en 100 ml de dietiléter y se lava tres veces con sendos 50 ml de agua.



La fase etérea se seca a través de sulfato de sodio, se concentra en el evaporador rotatorio hasta sequedad y el producto bruto obtenido se destila a través de un corto puente de destilación (p.e.: 150 a 160°C/0,6 mbar).

Rendimiento: 25,56 g (96%)

P.f.: 36°C, caracterización por <sup>1</sup>H-RMN, espectros de masas, análisis de C, H, N

c) Reducción de éster metílico de ácido 12,12-dicianododecanoico en dihidrocloruro de 12-aminometil-13-aminotridecanol

En un matraz de dos bocas con embudo de goteo, refrigerador a reflujo y calentador de burbujas aplicado se disuelven 5 g de éster metílico de ácido 12,12-dicianododecanoico (19 mmol) en 200 ml de tetrahidrofurano y se enfría hasta 0°C. A ello se agregan gota a gota 200 ml de una solución de complejo de BH<sub>3</sub>-THF 1 molar en tetrahidrofurano. Después se hierve durante 3 horas a reflujo, se enfría hasta temperatura ambiente, se agita durante 1 a 2 horas, se enfría de nuevo hasta 0°C y cuidadosamente se agrega gota a gota metanol seco (aproximadamente 100 a 150 ml), con el fin de destruir borano en exceso. Los disolventes se separan por centrifugación y después se recoge el residuo pegajoso en aproximadamente 100 ml de metanol. De nuevo se separa por centrifugación el metanol se recoge de nuevo en 100 ml de metanol y se incorpora por centrifugación. Al residuo se añade etanol seco hasta que se forme precisamente una solución transparente. Esta se enfría hasta -10°C y se trata durante una hora con HCl gaseoso. La mezcla se hierve entonces a reflujo durante 5 h. De nuevo se enfría hasta -10°C y la solución se satura con HCl gaseoso. Después de enfriar hasta -10°C en el matraz herméticamente cerrado, el producto precipita durante una noche en forma de un precipitado blanco cristalino. Se puede obtener más producto bruto mediante incorporación por centrifugación de la solución. El producto bruto se purifica por lavado con un poco de etanol frío y subsiguiente secado en vacío.

Rendimiento: 5,1 g (79%)

Caracterización por <sup>1</sup>H-RMN, IR y análisis de C, H, N.

d) Síntesis de N,N'-bis-(p-toluensulfonil)-12-aminometil-13-aminotridecanol

0,9 milimoles de la sustancia procedente del Ejemplo 3c se disuelven en aproximadamente 5 ml de piridina y el cloruro de tosilo se agrega en estado sólido con agitación a 20°C. Después de agitar durante 20 h a 20°C, el cloruro de tosilo se agrega en estado sólido con agitación a 20°C. Después de agitar durante 20 h a 20°C, el disolvente se evapora y el residuo se recoge en HCl 2 N. La solución ácida se extrae 2 veces con dietiléter y la fase etérea proporciona 250 mg de material sólido ligeramente amarillento (50%). Caracterización por <sup>1</sup>H-RMN.

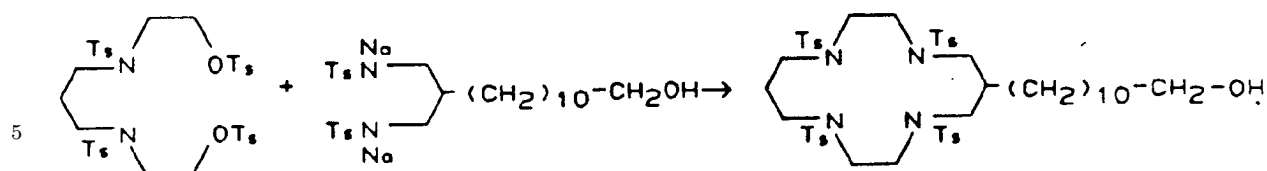
e) Síntesis de N,N'-disodio-N,N'-bis(p-toluensulfonil)-12-aminometil-13-aminotridecanol

14 mg de Na se disuelven en 5 ml de etanol y se añaden a una solución de 200 mg de la sustancia procedente del Ejemplo 3d en 10 ml de etanol. Después de agitar durante dos horas a temperatura ambiente, se hierve a reflujo durante 2 h. La solución se incorpora por centrifugación y el residuo se seca en vacío. Caracterización del producto (226 mg, 97% de la teoría) por <sup>1</sup>H-RMN (material sólido incoloro).

f) Preparación de N,N'-bis-(p-toluensulfonil)-N,N'-bis-[2-(toluensulfonilo)etil]-propan-1,3-diamina a partir de bis-N,N'-(hidroxietil)-propandiamina-(1,3)

4 g de N,N'-bis(2-hidroxietil)-propandiamina-(1,3) se disuelven en 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se mezclan a 20°C con 7,8 g de piridina. Después se añaden 18,8 g de cloruro de tosilo en 70 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Después de 50 h a 20°C, la solución se mezclan con HCl 2 N (100 ml) y se extrae 3 veces con sendos 50 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A partir de la fase orgánica secada a través de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada y evaporada, el residuo sólido se recoge de nuevo en 50 ml de HCl 2 N, se extrae 3 veces con sendos 50 ml de dietiléter y después 2 veces con sendos 50 ml de acetato de etilo. La fracción en acetato de etilo proporciona, después del secado a través de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la filtración e incorporación por centrifugación, 5,7 g (30% de la teoría) de un material sólido amarillento que se caracterizaba por <sup>1</sup>H-RMN y cromatografía en capa delgada.

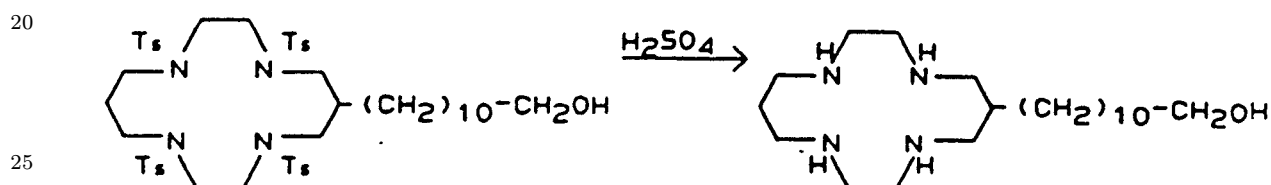
g) Ciclación de N,N'-disodio-N,N'-bis(p-toluensulfonil)-12-aminometil-13-aminotridecanol con N,N'-bis-(p-toluensulfonil)-N,N'-bis-[2-(p-toluensulfonilo)etil]-propan-1,3-diamina para dar 6-(11-hidroxidodecil)-1,4,8,11-tetra-(p-toluensulfonil)-1,4,8,11-tetraazaciclodecane



10 A 100°C se añade gota a gota una solución de 220 mg de la sustancia procedente del Ejemplo 3e en 10 ml de dimetilformamida a una solución de 288 mg de la sustancia procedente del Ejemplo 3f en 10 ml de dimetilformamida. Después de agitar durante 4 h a 100°C se enfría hasta temperatura ambiente y el producto bruto se precipita con agua.

15 El material sólido amarillo pagajoso se lava con agua (varias veces) y después se precipita en acetona/agua. El material sólido secado (140 mg, 38%) se puede purificar ulteriormente por cromatografía en columna sobre gel de sílice 60 con éter en calidad de agente eluyente (Rf = 0,72).

h) Destosilación de 6-(11-hidroxiundecil)-1,4,8,11-tetra-(p-toluensulfonyl)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para dar 6-(11-hidroxiundecil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.



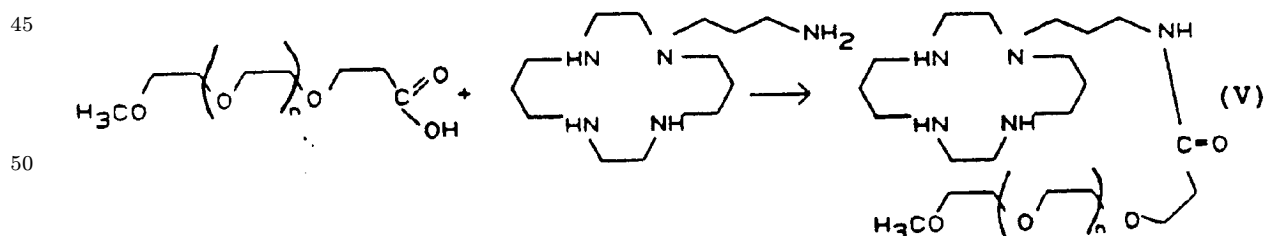
30 140 mg de la sustancia procedente del Ejemplo 3g se suspenden en aproximadamente 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se agitan a 100°C durante varias horas. La reacción finaliza cuando una muestra de la solución es soluble en agua. Después se enfría hasta 4°C y la sal de polisulfato precipita por adición de dietiléter y se separa por filtración bajo N<sub>2</sub>. El producto se agrega a NaOH al 40% y después se extrae 6-(11-hidroxiundecil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano con benceno. El producto se caracteriza por <sup>1</sup>H-RMN, espectro de masas, análisis de C, H, N y espectro IR, después de haber eliminado el disolvente y de haber secado en vacío al residuo.

35 Rendimiento: 45 mg (87%).

#### Ejemplo 4

40 Marcación de un polímero con contenido de grupos COOH con tecnecio-99m con ayuda de una ciclama bifuncional procedente del Ejemplo 1

a) Reacción de monocarboxilato de monometoxipolietilenglicol con 1-(3-aminopropil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano



55 368 mg de polímero (PM= 5000), preparado según K. Geckeler. E. Bayer, Polymer Bull.3 (1980), 347, se disuelven con 7 mg de N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>, 17,6 mg de un derivado de ciclama procedente del Ejemplo 1, 15,2 mg de diclohexilcarbodiimida y 8,4 mg de 1-hidroxibenzotriazol en 5 ml de acetato de etilo, 5ml de N,N'-dimetilformamida y 10 gotas de agua. Después de agitar durante 16 h, los disolventes se eliminan en vacío y después el residuo se ultrafiltra varias veces en solución acuosa. A partir del concentrado se pueden aislar 345 mg de producto (V) (90%). (Ningún p.f. definido al existir polímero).

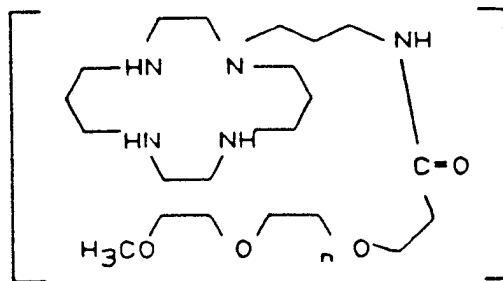
60

b) Marcación de (V)

con  $^{99m}\text{Tc}$ 

5

10



15

20

8 mg del conjugado de polímeros procedente del Ejemplo 3a) se disuelven en 0,5 ml de NaCl al 0,9%, el pH se ajusta a 11 con NaOH 0,1 N, se agrega 1 ml del componente de PTP-Sn descrito en la memoria de publicación alemana DE-A 3728599 (= documento EP-A 0271806 y documento US n° de serie 130183) descrito en el Ejemplo 7 (disuelto en NaCl 0,9 N) y después se agregan 0,3 ml de solución de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (aproximadamente 59 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ ). Después de 5 minutos a temperatura ambiente, el pH esá en aproximadamente 7. La cromatografía en capa delgada en comparación con ciclama no sustituida, pertecnetato libre, el polímero de partida así como el componente PTP, cromatografiado en cada caso en condiciones iguale 5 minutos después de la adición de pertecnetato, proporcionaba:

aproximadamente 10% del  $^{99m}\text{Tc}$  se encuentran fijados al conjugado de polímero. Los datos de cromatografía en los que se fundamenta este resultado están recopilados en la Tabla 1.

25

(Sistemas de cromatografía ITLC SG/metiletilcetona  
ITLC SG/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 m  
celulosa sobre Al/  
 $\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$  al 10%:  $\text{CH}_3\text{OH}$  1:1  
papel Whatman 1/ $\text{NaCl}$  al 0,9%  
ITLC SG/ $\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$  0,5 M)

30

(Tabla 1 pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

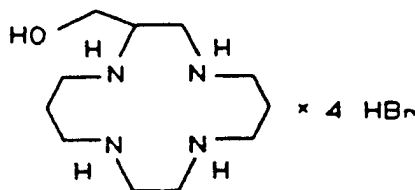
60

Tabla 1

	Sistema de ITLC SG cromato- Sustan grafía	metil- etilcetona	ITLC SG Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2M	Celulosa/Al NH <sub>4</sub> OAc al 10%: MeOH 1:1	Whatman/ NaCl al 0,9%	ITLC SG NH <sub>4</sub> OAc 0,5M
5						
10	<sup>99m</sup> Tc-PEG	Rf=0 43,2% Rf=1 56,8%	Rf=0,6-1 100%	Rf=0,1 97,7% Rf=0,7 2,9%	Rf=0,1 98,3% Rf=0,8 1,4%	Rf=0,1 11,4% Rf=0,2 18,1% Rf=1 70,5%
15	<sup>99m</sup> Tc-PEG -COOH	Rf=0 67,2% Rf=32,8%	Rf=0,6-1 100%	Rf=0,1 98,0% Rf=0,7 2,0%	Rf=0,1 96,8% Rf=0,8 3,2%	Rf=0,1 23,7% Rf=0,2 37,6% Rf=1 48,7%
20	<sup>99m</sup> Tc-PEG -NH <sub>2</sub> propil- ciclano	Rf=0 78,6% Rf=1 21,4%	Rf=0 9,5% Rf=0,2-0,9 90,5%	Rf=0,1 45,6% Rf=0,7-0,9 54,4%	Rf=0,1 40,2% Rf=0,9 59,8%	Rf=0,1 35,1% Rf=0,2 37,6% Rf=1 27,3%
25		Rf=0	Rf=0	Rf=0,7-1	Rf=0,8-1	Rf=0-0,1
30	<sup>99m</sup> Tc- ciclama	Rf=0,1-0,2 100% Rf=0-0,2	Rf=0 1,5% Rf=0,7-6 98,5% Rf=1	Rf=0,9 100% Rf=0,9	Rf=0,1 1,2% Rf=0,4 98,8% no teñible	Rf=0-0,3 15,6% Rf=0,3-0,9 84,4% Rf=0,3 Rf=0,3
35	<sup>99m</sup> Tc-PTP	Rf=0 98,9% Rf=1 1,1%	Rf=0 4,6% Rf=1 95,4%	Rf=0 100%	Rf=0,1 100%	Rf=0,1 29,2% Rf=0,1-0,8 41,3% Rf=0,8-1 10,0%
40	<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Rf=0 2,9% Rf=1 97,1%	Rf=1 100%	Rf=0,7 100%	Rf=1 100%	Rf=1 100%

## Ejemplo 5

Preparación de tetrahidrobromuro de 2-hidroxi-1,4,8,11-tetraazaciclohexadecano



a) y b) La síntesis del compuesto de partida NaTsN-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NTs-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NTs-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NTsNa se lleva a cabo análogamente a los Ejemplos 2a) y b), sólo que la N,N'-(diaminoetil)-1,3-propanodiamina se reemplaza por N,N'-(diaminopropil)-1,2-etilendiamina.

c) Síntesis de 1-fenoximetil-1,2-etanodiol

El fenilglicidiléter se prepara según la prescripción bibliográfica de D.M. Dishong, C.J. Diamong, M.I. Cinoman, G.W. Gokel, J. Am. Chem. Soc. 105 (1983), 586-593.

## d) Preparación de ditosilato de 1-fenoximetil-1,2-etanodiol

5 g del diol de partida (c) se disponen previamente en 25 ml de piridina y se agregan 10,5 g de cloruro de ácido p -toluensulfónico (reacción ligeramente exotérmica). Después de aproximadamente 30 minutos se manifiesta un precipitado. La mezcla se agita durante otras 5 h a temperatura ambiente, se deja reposar durante 20 h y después se separa en vacío la piridina. El residuo se recoge en HCl 2 N, se extrae 2 veces con dietiléter, las fases etéreas se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el producto se obtiene por concentración. Rendimiento, 11,2 g de material sólido (83% de la teoría). Identificación por <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) y cromatografía en capa delgada (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Rf= 0,6).

## e) Ciclación para dar 2-fenoximetil-1,4,8,11-tetratosil -1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano

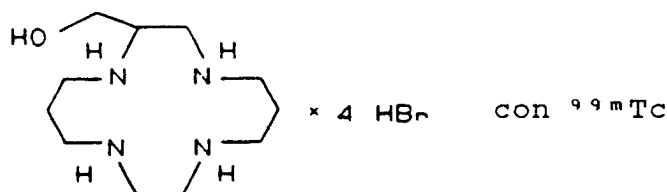
8,53 g de la sal 1,12-disódica del 1,5,8,12-tetratosil -1,5,8,12-tetraazadodecano (tal como se ha descrito en el aparato b)) se disponen previamente en aproximadamente 40 ml de N,N-dimetilformamida (DMF), se calienta hasta 100°C y después se añade gota a gota una solución de 4,75 g de ditosilato de 1-fenoximetil-1,2-etanodiol en 40 ml de DMF. Se agita durante otras 6 h a 100°C, seguido de agitación durante 20 h a 20°C. Después se agregan gota a gota aproximadamente 200 ml de H<sub>2</sub>O, se agita intensamente durante una hora (precipitado pegajoso), se agrega NaCl sólido para la precipitación salina y se separa por filtración el precipitado blanco. La torta de filtración se lava varias veces con agua y después se seca en vacío. A partir de la solución madre se puede aislar algo más de producto por adición ulterior de agua. Rendimiento, 4,7 g de material sólido blanco correspondiente a 50% de la teoría. Caracterización por cromatografía en capa delgada (gel de sílice, acetato de etilo, Rf = 0,8) y <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>),

## f) Destosilación de 2-fenoximetil-1,4,8,11-tetratosil -1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano para dar tetrahidrobromuro de 2-hidroximetil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.

El compuesto de partida tetratosilado (10,8 g) se hierve a reflujo en 80 ml de HBr al 48% + 80 ml de ácido acético glacial durante 3 días, se deja reposar durante 1 día a temperatura ambiente y después se recoge en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, la fase orgánica se lava 1 vez con H<sub>2</sub>O, después se extrae la solución acuosa 5 veces con sendos 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (hasta que el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sea incoloro) y la fase acuosa se concentra. El residuo (secado en vacío) se tritura 13 veces en un baño de ultrasonidos con partes en total de 800 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta que quede un residuo pulverulento blanco amarillento. El secado en vacío proporciona un producto que corresponde a tetrahidrobromuro de 2-hidroximetil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano con un grupo tosilo (RMN). Este se añade en 100 ml con ácido acético glacial saturado con HBr gaseoso y se hierve a reflujo durante 4 días. El producto bruto precipita en forma de un material sólido gris amarillento que se agrega a través de un intercambiador de aniones fuertemente básico (elución con H<sub>2</sub>O) con el fin de eliminar ácido acético. Un espectro de masas muestra M<sup>+</sup> = 230 así como fracciones a m/e = 200 (ciclama) con m/e = 174 (material de partida de cadena abierta). Análisis C, H, N: 21,8% de C, 5,3% de H, 9,9% de N, 58,7% de Br, calculado para tetrahidrobromuro de 2-hidroximetil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano: 23,8% de C, 5,4% de H, 10,1% de N, 57,7% de Br. También el <sup>1</sup>H-RMN muestra el tetrahidrobromuro de 2-hidroximetil-1,4,8,11 -tetraazaciclotetradecano, diferenciándose el tetrahidrobromuro de 2-hidroximetil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano del compuesto de partida de cadena abierta (en D<sub>2</sub>) principalmente por una relación integral modificada. Una nueva purificación del producto (900 mg = 34%) se puede efectuar por CLAP preparativa (columna RP8, metanol/H<sub>2</sub>O/HCl/pH 2,7 con gradiente de mezcla, tiempo de elución 8-10 minutos).

## Ejemplo 6

## Marcación de



1 mg de tetrahidrobromuro de 2-hidroximetil-1,4,8,11 -tetraazaciclotetradecano se disuelve en 1 ml de NaCl al 0,9%. Se agregan 0,1 ml de una solución de 1 mg de SnCl<sub>2</sub> x 5 H<sub>2</sub>O en 1 ml de HCl 0,1 N, y el valor del pH se ajusta a pH 5-6 con 0,1 ml de NaOH 0,1 N. Después de la adición de 0,15 ml de producto eluido de <sup>99m</sup>Tc, se determina la actividad de la solución. Esta asciende a 79,12 MBq/ml. 30

## 2 024 601

minutos después se lleva a cabo una cromatografía por ITLC-SG (tiras de 2 x 10 cm). Se cromatografían al mismo tiempo dos muestras, una en metiletilcetona ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$  libre discurre con la parte frontal) y una en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 M (el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  coloidal permanece en la salida). En la metiletilcetona aparece toda la radiactividad a  $R_f = 0,43$ , en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aparecen aproximadamente 90% de la radiactividad a  $R_f = 1,0$  y el resto mancha entre  $R_f = 0,4$  y  $1,0$ . Esto significa que  $> 90\%$  del tecnecio está formando complejos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

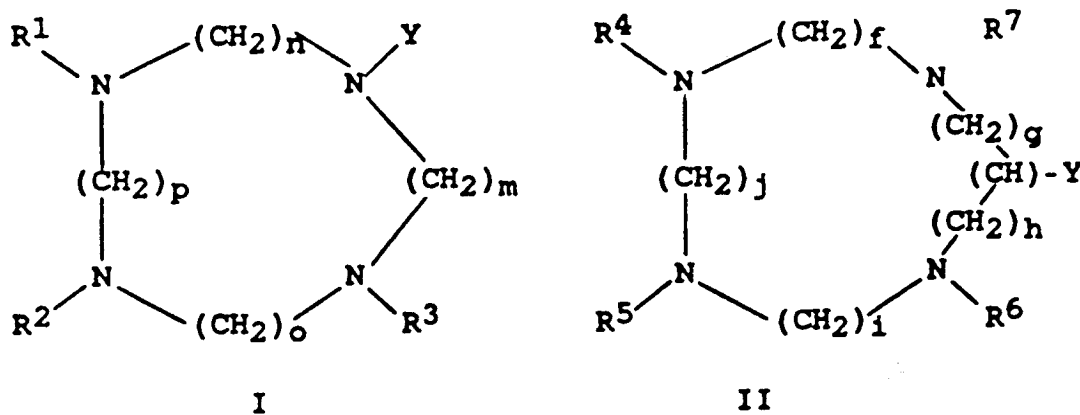
55

60

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la marcación de sustancias con isótopos de tecnecio o renio, **caracterizado** porque

- a) la sustancia a marcar se hace reaccionar con un derivado de amina macrocíclica N-sustituida o C-sustituida de las fórmulas I ó II



en donde

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  significan hidrógeno y

$m$ ,  $n$ ,  $o$ ,  $p$ ,  $f$ ,  $h$ ,  $i$ ,  $j$  son iguales o diferentes y significan 1, 2, 4 ó 4 y  $g$  significan 0, 1, 2, 3 ó 4 e

$Y$  significa un grupo de la fórmula  $-X-NH_2$ ,  $-X-NCS$ ,  $-X-COOH$ ,  $-X-OH$ ,  $-X-N_2^+$  ó  $-X-COCl$  o significa un grupo de la fórmula  $-X-Z$ , significando  $Z$  fluoro, cloro, bromo o yodo y  $X$  significa un grupo alquileo con 1 a 40 átomos de C ó  $X$  significa un grupo orto-, meta- o para-fenileno o un grupo orto-, meta- o para-fenilmetilo,

y el compuesto, así obtenido, se marca con tecnecio-99m o perrenato-186 ó -188 y un agente reductor para pertecnetato-99m o perrenato-186 ó -188

o porque

- b) primeramente se prepara el complejo de tecnecio-99m y/o renio-186 ó -188 por reacción de un compuesto de fórmula I y/o II con pertecnetato-99m y/o perrenato-186 ó -188 y un agente reductor para pertecnetato-99m y/o perrenato-186 ó -188 y, a continuación, se hace reaccionar este complejo de tecnecio-99m y/o renio-186 ó -188 con la sustancia a marcar.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por derivados de amina macrocíclicos de las fórmulas I ó II según la reivindicación 1, en donde  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  significan hidrógeno y  $m$ ,  $n$ ,  $o$ ,  $p$ ,  $f$ ,  $i$  y  $j$  son iguales o diferentes y significan 2 ó 3 y  $g$  significa 0, 1, ó 2 y  $h$  significa 1 ó 2 e  $Y$  significa un grupo de la fórmulas  $X-NH_2$ ,  $-X-NCS$ ,  $-X-COOH$ ,  $-X-OH$ ,  $-X-N_2^+$  ó  $-X-COCl$  o significan un grupo de la fórmula  $-X-Z$ , significando  $Z$  fluoro, cloro, bromo o yodo y  $X$  significa un grupo alquileo con 1 a 20 átomos de C.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por derivados de amina macrocíclicos de las fórmulas I ó II, según la reivindicación 1, en donde  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  significan hidrógeno y  $m$ ,  $p$  y  $j$  significan 3 y  $n$ ,  $o$ ,  $f$  e  $i$  significan 2 y  $g$  y  $h$  significan 1 e  $Y$  significa un grupo de la fórmula  $-X-NH_2$  ó  $-X-OH$ , significan  $X$  un grupo alquileo con 1 a 15 de C.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la sustancia a marcar contiene un grupo reactivo que reacciona con el grupo reactivo que se encuentra en la cadena lateral exocíclica de la amina macrocíclica, con formación de un enlace químico.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el grupo reactivo de la sustancia a marcar es un grupo  $-NH_2$ -,  $-COOH$ -,  $-COCl$ -,  $-OH$ - ó  $-NH-NH_2$ -.

6. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la sustancia a marcar es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo monoclonal

(fragmento  $F(ab')_2$  o  $F(ab')$ ), una proteína, una enzima, un azúcar, un ácido graso, una hormona o un polímero.

5 7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el polímero contiene al menos una cadena lateral de la fórmula  $-B-NH_2$ ,  $-B-COOH$ ,  $-B-NH-NH_2$ ,  $-B-COCl$  ó  $-B-OH$ , representando B un radical o-, m- ó p-arilo o una cadena de alquileo con 1 a 40 átomos de C que, en el caso de una cadena de alquileo de  $C_2-C_{40}$  también puede estar interrumpida con una unidad  $-NH-$ ,  $-NH-CO-$ ,  $-CO-NH-$ ,  $-CO-O-$  ó  $-O-CO$  y poseyendo el polímero un peso molecular de 1000 a 200.000 (Dalton).

10 8. Estuche para ensayo para la determinación de tumores, consistente en dos componentes separados liofilizados en los que uno es un anticuerpo que está dirigido frente a antígenos asociados a tumores a su fragmento  $F(ab')_2$  en mezcla con tampón, estando unido el anticuerpo o su fragmento con una amina macrocíclica según la reivindicación 1, y el otro contiene un agente reductor que se requiere para la reducción y la fijación del tecnecio al componente de anticuerpo.

15 9. Estuche para ensayo según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el agente reductor es una sal de estaño-II.

20 10. Estuche para ensayo según la reivindicación 9, **caracterizado** porque se emplea la sal de estaño-II del ácido metandifosfónico, ácido aminometandifosfónico, ácido 3,3-difosfonopropiónico, ácido 3,3-difosfono-1,2-propanodicarboxílico o del ácido propan-1,1,3,3-tetrafosfónico.

25 11. Agente de diagnóstico, preparado al disolver una sustancia liofilizada específica para el órgano que está químicamente unida a una amina macrocíclica según la reivindicación 1, en una solución de tecnecio-99m y pertecnetato y que determina después la reducción y fijación del tecnecio a la amina macrocíclica por adición de un agente reductor.

30 12. Agente de diagnóstico, preparado al disolver la sustancia liofilizada específica para el órgano que está químicamente unida a una amina macrocíclica según la reivindicación 1, primero en la solución del agente reductor y, a continuación, por adición de solución de tecnecio-99m y pertecnetato, al marcar la amina macrocíclica y con ello la sustancia específica para el órgano, con tecnecio-99m.

35 13. Agente terapéutico que contiene una sustancia específica para el órgano, que está químicamente copulada a una amina macrocíclica, marcada con renio-186 ó renio-188 según la reivindicación 1.

35

40

45

50

55

60