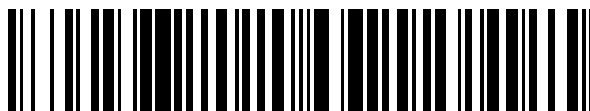


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 926**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/08** (2006.01)

**A61K 51/04** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2001** **E 01941895 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014** **EP 1286704**

54 Título: **Conjugados de etilendicisteína y un análogo de glucosa**

30 Prioridad:

**02.06.2000 US 587583**

**21.06.2000 US 599152**

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

**05.11.2014**

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF  
TEXAS SYSTEM (100.0%)  
201 WEST 7TH STREET  
AUSTIN, TEXAS 78701, US**

72 Inventor/es:

**YANG, DAVID, J.;  
LIU, CHUN-WEI;  
YU, DONG-FANG y  
KIM, E., EDMUND**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 518 926 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Conjugados de etilendicisteína y un análogo de glucosa

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN****1. Campo de la invención**

10 **[0001]** La presente invención se refiere en general a los campos de marcaje, formación de imágenes radiológicas y síntesis química. Más particularmente, se refiere a una estrategia para radiomarcarse ligandos diana. Se refiere además a métodos de uso de esos ligandos radiomarcados en la formación de imágenes de tumores y la formación de imágenes de una enfermedad específica de tejido.

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

20 **[0002]** La mejora de la formación de imágenes escintigráficas de tumores se determina ampliamente mediante el desarrollo de más radiofármacos específicos de tumores. Debido a una mayor especificidad tumoral, los ligandos radiomarcados, así como los anticuerpos radiomarcados, han abierto una nueva era en la detección escintigráfica de tumores y han experimentado un amplio desarrollo y evaluación preclínica. (Mathias et al., 1996, 1997a, 1997b). Las modalidades de imágenes con radionucleidos (tomografía por emisión de positrones, PET, tomografía computerizada por emisión de fotón único, SPECT) son técnicas de diagnóstico de formación de imágenes transversales que trazan la ubicación y concentración de radiotrazadores marcados con radionucleidos. Aunque la TC y la MRI proporcionan una información anatómica considerable sobre la ubicación y la extensión de los tumores, estas modalidades de imagen no pueden diferenciar adecuadamente las lesiones invasivas de edemas, necrosis por radiación, graduación o gliosis. Pueden utilizarse PET y SPECT para localizar y caracterizar los tumores mediante la medición de la actividad metabólica.

30 **[0003]** El desarrollo de nuevos agentes de hipoxia tumoral es clínicamente deseable para la detección de lesiones primarias y metastásicas, así como para predecir la radiorespuesta y el tiempo hasta la recurrencia. Ninguna de las modalidades de imágenes contemporáneas mide con precisión la hipoxia ya que el diagnóstico de la hipoxia tumoral requiere un examen patológico. A menudo es difícil predecir el resultado de una terapia para el tumor hipóxico sin saber por lo menos la línea base de la hipoxia en cada tumor tratado. Aunque el microelectrodo de oxígeno polarográfico Eppendorf puede medir la tensión de oxígeno en un tumor, esta técnica es invasiva y requiere un operador hábil. Además, esta técnica sólo se puede utilizar en tumores accesibles (por ejemplo, de cabeza y cuello, de cuello uterino) y son necesarias múltiples lecturas. Por lo tanto, un método preciso y fácil de medir la hipoxia tumoral será útil para la selección de pacientes. Sin embargo, las relaciones de captación de tumor con respecto a tejido normales varían dependiendo de los radiofármacos usados. Por lo tanto, sería racional correlacionar la técnica de tumor con respecto a tejido normal con las medidas de electrodo de oro estándar Eppendorf de hipoxia cuando se introducen nuevos radiofármacos en la práctica clínica.

40 **[0004]** Se ha utilizado [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO para diagnosticar tumores de cabeza y cuello, infarto de miocardio, inflamación e isquemia cerebral (Martin et al 1992; Yeh et al 1994; Yeh et al 1996; Liu et al 1994.). La relación de captación de tumor con respecto a tejido normal se utilizó como una línea de base para evaluar la hipoxia tumoral (Yet, et al. 1996). Aunque la hipoxia tumoral con [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO se demostró claramente, la introducción de nuevos agentes de formación de imágenes en la práctica clínica depende de algunos otros factores, tales como la fácil disponibilidad y el coste de isótopos. Aunque la formación de imágenes metabólicas del tumor utilizando [ $^{18}\text{F}$ ]FDG se demostró claramente, la introducción de agentes de formación de imágenes moleculares en la práctica clínica depende de algunos otros factores tales como la fácil disponibilidad y el coste de isótopos. La [ $^{18}\text{F}$ ] fluorodesoxiglucosa (FDG) se ha utilizado para diagnosticar tumores, infarto de miocardio y enfermedad neurológica. Además, la radiosíntesis con PET debe ser rápida debido a la corta vida media de los isótopos de positrones. La química del  $^{18}\text{F}$  también es compleja. La química  $^{18}\text{F}$  no es reproducible en diferentes moléculas. Por lo tanto, sería ideal para desarrollar un quelante que pueda conjugarse a diversos fármacos. El isótopo preferido sería  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  debido al bajo costo (0,21 \$/mCi frente a 50 \$/mCi para  $^{18}\text{F}$ ) y baja energía (140 Kev vs. 571 Kev para  $^{18}\text{F}$ ). El  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se obtiene fácilmente a partir de un generador de  $^{99\text{m}}\text{Mo}$ . Debido a las características físicas favorables, así como el precio extremadamente bajo, el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se ha preferido para marcar radiofármacos.

55 **[0005]** Varios compuestos han sido marcados con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  usando quelatos de nitrógeno y azufre (Blondeau et al, 1967; Davison et al, 1980.). Los ligandos tetradentados de bis-aminoetanotiol, también llamados compuestos diaminoditiol, son conocidos por formar complejos  $\text{Tc(V)O}$  muy estables en base a una unión eficiente del grupo oxotecnecio a dos azufres tiol y dos átomos de nitrógeno de amina. La  $^{99\text{m}}\text{Tc-L,L-etilendicisteína}$  ( $^{99\text{m}}\text{Tc-EC}$ ) es un ejemplo reciente y exitoso de quelatos  $\text{N}_2\text{S}_2$ . EC puede marcarse con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  fácil y eficientemente con alta pureza y estabilidad radioquímica, y se excreta a través del riñón por el transporte tubular activo (Surma et al, 1994; Van Nerom et al, 1990,1993; Verbruggen et al. 1990,1992). Otras aplicaciones de EC serían quelada con galio-68 (un emisor de positrones,  $t_{1/2} = 68$  min) para PET y gadolinio, hierro o manganeso para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). La  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-neomicina}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-desoxiglucosa}$  se desarrollaron y se evaluó su uso potencial en la caracterización de tumores.

[0006] Zareneyrizi F. et al., Anti-Cancer Drugs (1999), 10(7) 685-692 describen la síntesis de [ $^{99m}\text{Tc}$ ]etilendicisteína-colquicina para la evaluación del efecto antiangiogénico.

## DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0007] La presente invención supera estos y otros inconvenientes de la técnica anterior proporcionando una nueva estrategia de radiomarcaje a los tejidos diana para la formación de imágenes. La invención proporciona un reactivo para preparar un agente para la formación de imágenes escintigráficas tal como se especifica en la reivindicación 1, un método de síntesis de dicho reactivo, un agente para la formación de imágenes que comprende dicho reactivo, el uso del agente para la formación de imágenes y un kit para la preparación de una preparación radiofarmacéutica.

[0008] La presente invención proporciona agentes para la formación de imágenes de enfermedades específicas de tejido. Estos agentes incluyen un marcador radionucleido quelado con etilendicisteína unido covalentemente a un ligando específico de tejido en uno o ambos brazos de ácido, en el que el ligando específico de tejido es un agente que mimetiza la glucosa seleccionado entre glucosa, glucosamina, micromicina y aminoglicósidos.

[0009] La etilendicisteína forma un quelato  $\text{N}_2\text{S}_2$  con la etiqueta radionucleido. Naturalmente, el quelato incluirá un enlace iónico entre el radionucleido y el compuesto quelante. Los términos "conjugado de ligando específico de tejido-EC", "derivado de EC" y "conjugado de EC-fármaco" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse al compuesto de ligando específico de tejido-etilendicisteína sin marcar. Tal como se utiliza aquí, el término "conjugado" se refiere a un compuesto unido covalentemente.

[0010] La etilendicisteína es un ligando tetradentado de bis-aminoetanotiol (BAT), también conocido como compuestos de diaminoditiol (DADT). Dichos compuestos son conocidos por formar complejos  $\text{Tc(V)O}$  muy estables en base a una unión eficiente del grupo oxotecnecio a dos azufres tiol y dos átomos de nitrógeno de amina. El dietiléster marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc-L,L-EC}$ ) es conocido como un agente del cerebro. La  $^{99m}\text{Tc-L,L-EC}$  es su metabolito más polar y se descubrió que se excreta con rapidez y eficacia en la orina. Por lo tanto, el  $^{99m}\text{Tc-L,L-EC}$  se ha utilizado como un agente de la función renal. (Verbruggen et al., 1992).

[0011] Un ligando específico de tejido es un compuesto que, cuando se introduce en el cuerpo de un mamífero o paciente, se unirá específicamente a un tipo específico de tejido. Se prevé que el ligando específico de tejido según la presente sea un poliaminoácido, un péptido soluble en agua, o un único aminoácido. Por ejemplo, cuando el grupo funcional en el ligando específico del tejido, o el medicamento, es OH alifático o fenólico, el enlazador puede ser ácido poli-glutámico (PM de aproximadamente 750 a aproximadamente 15.000), ácido poliaspártico (PM de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 15.000), acetato de bromoetilo, ácido glutámico o ácido aspártico. Cuando el grupo funcional del fármaco es  $\text{NH}_2$  alifático o aromático, o péptido, el enlazador puede ser ácido poliglutámico (PM de aproximadamente 750 a aproximadamente 15.000), ácido poli-aspártico (PM de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 15.000), ácido glutámico o ácido aspártico. Cuando el grupo funcional del fármaco es ácido carboxílico o un péptido, el enlazador puede ser etilendiamina, o lisina.

[0012] Mientras que el radionucleido preferido para la formación de imágenes es  $^{99m}\text{Tc}$ , se prevé que otros radionucleidos pueden quelarse a los conjugados de ligando específico de tejido-EC o reactivos de la invención, especialmente para su uso como agentes terapéuticos. Por ejemplo, otros radionucleidos útiles son  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{80}\text{Sr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{153}\text{Gd}$  y  $^{59}\text{Fe}$ . Los ligandos específicos de tejido son útiles para suministrar los radionucleidos terapéuticos a una lesión específica en el cuerpo, tal como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata (usando, por ejemplo,  $^{186/188}\text{Re-EC-folato}$ ) y cáncer de cabeza y cuello (usando, por ejemplo,  $^{186/188}\text{Re-EC-nitroimidazol}$ ).

[0013] Las realizaciones específicas de la presente invención incluyen  $^{99m}\text{Tc-EC-neomicina}$ ,  $^{99m}\text{Tc-EC-kanamicina}$ ,  $^{99m}\text{Tc-EC-aminoglucósidos}$ , (glucosamina, EC-desoxiglucosa),  $^{99m}\text{Tc-EC-gentamicina}$ , y  $^{99m}\text{Tc-EC-tobramicina}$ .

[0014] La presente invención proporciona además un método de síntesis de un reactivo según la presente invención y el marcaje con radionucleido del mismo para la formación de imágenes o el uso terapéutico. El método incluye obtener un ligando específico de tejido, tal como se define en las reivindicaciones, mezclar el ligando con etilendicisteína (EC) para obtener un derivado de ligando específico de tejido-EC, y mezclar el derivado de ligando específico de tejido-EC con un radionucleido y un agente reductor para obtener un derivado de ligando específico de tejido-EC marcado con radionucleido, es decir, un agente para formación de imágenes según la presente invención. El radionucleido se quela a la EC a través de un quelato  $\text{N}_2\text{S}_2$ . El ligando específico del tejido se conjuga a uno o ambos brazos ácidos de la EC, ya sea directamente o a través de un enlazador tal como se describe anteriormente. El agente reductor es preferiblemente un ion ditionito, un ion estannoso o un ion ferroso.

[0015] En otra realización, la presente invención proporciona el uso de un agente para la formación de imágenes para la fabricación de un compuesto farmacéutico para formar imágenes de un tumor, un sitio de infección, un corazón, un pulmón, un cerebro, un hígado, un bazo, un páncreas, o un intestino. El agente para la formación de

imágenes se puede utilizar para formar imágenes de un sitio en un cuerpo humano. El método de formación de imágenes incluye las etapas de administrar una cantidad diagnóstica eficaz del agente para la formación de imágenes y detectar una señal radioactiva del radionucleido (por ejemplo,  $^{99m}\text{Tc}$ ) localizado en el sitio. La etapa de detección típicamente se llevará a cabo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas después de la introducción del agente para la formación de imágenes en el cuerpo del mamífero. Lo más preferiblemente, la etapa de detección se realizará aproximadamente 1 hora después de la inyección del agente para la formación de imágenes en el cuerpo del mamífero.

[0016] El sitio es un sitio de infección, un tumor, un corazón, un pulmón, un cerebro, un hígado, un bazo, un páncreas, o un intestino. El tumor o sitio de infección pueden estar situados en cualquier lugar dentro del cuerpo de un mamífero pero generalmente estarán en la mama, ovario, próstata, endometrio, pulmón, cerebro o el hígado. El sitio también puede ser un cáncer de positivo de folato o cáncer positivo de estrógeno.

[0017] La invención también proporciona un kit para preparar una preparación radiofarmacéutica. El kit incluye generalmente un vial o bolsa sellada, o cualquier otro tipo de recipiente adecuado, que contiene una cantidad predeterminada del reactivo tal como se especifica en la reivindicación 1 y una cantidad suficiente de un agente reductor para marcar el conjugado con  $^{99m}\text{Tc}$ . En ciertos casos, el reactivo también incluye un enlazador, tal como se define anteriormente, entre la etilendicisteína y el ligando específico de tejido.

[0018] Los componentes del kit pueden estar en cualquier forma apropiada, tal como en forma líquida, congelada o seca. En una realización preferida, los componentes del kit se proporcionan en forma liofilizada. El kit también puede incluir un antioxidante y/o un atrapante ("scavenger"). El antioxidante puede ser cualquier antioxidante conocido, pero es preferiblemente la vitamina C. Los atrapantes también pueden estar presentes para unirse a los radionucleidos sobrantes. La mayoría de los kits disponibles comercialmente contienen glucoheptonato como atrapante. Sin embargo, el glucoheptonato no reacciona completamente con los componentes típicos del kit, dejando aproximadamente del 10 al 15% sobrante. Este glucoheptonato sobrante se destinará a resultados de imágenes de tumores y distorsionadas. Por lo tanto, los inventores prefieren usar EDTA como el atrapante, ya que es más barato y reacciona más completamente.

[0019] Además, está disponible un método de pronóstico para determinar la utilidad potencial de un compuesto candidato para el tratamiento de tumores específicos. Actualmente, la mayoría de los tumores son tratados con el "fármaco habitual de elección" en quimioterapia sin ninguna indicación de si el fármaco es realmente eficaz contra ese tumor particular hasta meses, y muchos miles de dólares, después. Los agentes de formación de imágenes de la invención son útiles en la liberación de un medicamento particular a la zona del tumor en forma de un conjugado EC-fármaco marcado y a continuación la formación de imágenes del sitio en cuestión de horas para determinar si el fármaco particular es eficaz.

[0020] A este respecto, el método de pronóstico incluye las etapas de determinar el sitio de un tumor dentro de un cuerpo de mamífero, obtener un agente de formación de imágenes que incluye un radionucleido quelado a la EC que está conjugado a un fármaco candidato de quimioterapia para un cáncer específico de tumor, administrar el agente para la formación de imágenes al cuerpo del mamífero y formar imágenes del sitio para determinar la eficacia del fármaco candidato contra el tumor. Típicamente, la etapa de formación de imágenes se realizará dentro de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas después de la inyección del agente de formación de imágenes en el cuerpo de un mamífero. Preferiblemente, la etapa de formación de imágenes se realizará dentro de aproximadamente 1 hora después de la inyección del agente de formación de imágenes en el cuerpo de un mamífero.

[0021] Otra realización de la presente invención es un reactivo para preparar un agente de formación de imágenes, tal como se define en la reivindicación 1. El reactivo de la invención incluye un ligando específico de tejido que tiene una afinidad por los sitios diana in vivo suficientes para producir una imagen detectable por escintigrafía, unido covalentemente a un grupo de unión a radionucleido (por ejemplo,  $^{99m}\text{Tc}$ ). El grupo de unión a radionucleido  $^{99m}\text{Tc}$  está unido directamente al ligando específico de tejido o está unido al ligando a través de un enlazador tal como se describe anteriormente. El grupo de unión a radionucleido  $^{99m}\text{Tc}$  es preferiblemente un quelato  $\text{N}_2\text{S}_2$  entre  $^{99m}\text{Tc}$  en el estado de oxidación +4 y etilendicisteína (EC). El ligando específico del tejido se unirá covalentemente a uno o ambos brazos ácidos de EC, ya sea directamente o a través de un enlazador tal como se describe anteriormente.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0022]

**Figura 24.** Relaciones de tumor a músculo y tumor a sangre en función del tiempo para  $^{99m}\text{Tc}$ .

**Figura 26.** Estudios de imágenes in vivo en ratas que tienen tumor de mama con  $^{99m}\text{Tc}$ .

**Figura 36.** Esquema sintético de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-neomicina.

**Figura 37A.** Imagen escintigráfica de ratas que tienen tumor de mama después de la administración de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC y  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-neomicina (100  $\mu\text{Ci}$ /rata, iv), mostró que el tumor se podía visualizar bien a partir de 0,5-4 horas después de la inyección.

**Figura 37B.** Escintimamografía con  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-neomicina (30 mCi, iv) de un paciente con cáncer de mama. Las imágenes están tomadas dos horas después de la inyección.

**Figura 38A.**  $^1\text{H}$  RMN de EC.

**Figura 38B.**  $^1\text{H}$  RMN de neomicina.

**Figura 38C.**  $^1\text{H}$  RMN de EC-neomicina.

**Figura 39.** Espectrometría de masas de EC-neomicina ( $M+ 1112,55$ ).

**Figura 40A.** Rastreo con longitud de onda UV de EC.

**Figura 40B.** Rastreo con longitud de onda UV de neomicina.

**Figura 40C.** Rastreo con longitud de onda UV de EC-neomicina.

**Figura 41.** Análisis radio-TLC de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-neomicina.

**Figura 70.** Efecto de d-glucosa y l-glucosa en la captación celular de la mama (línea celular 13762) de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-DG.

**Figura 73.** Efecto de d-glucosa y l-glucosa en la captación celular de la mama (línea celular A549) de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-DG.

**Figura 74.** Efecto del nivel de glucosa en sangre in vivo inducido por glucosamina y ED-DG (1,2 mmol/kg i.v.)

**Figura 76.** Relaciones de densidad de recuento del tumor con respecto a tejido de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-desoxiglucosa en ratas que tienen tumor de mama.

**Figura 77.** Biodistribución in vivo de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-desoxiglucosa en ratas que tienen tumor de mama.

**Figura 78.** Captación de tejido in vivo de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-desoxiglucosa en ratones que tienen tumor de pulmón.

**Figura 79.** Captación de tejido in vivo de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-neomicina en ratones que tienen tumor de pulmón.

**Figura 81.** Imagen plana de ratas que tienen tumor de mama después de la administración de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC y  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-desoxiglucosa (100  $\mu\text{Ci}$ /rata, iv), mostró que el tumor se podía visualizar bien a partir de 0,5-4 horas después de la inyección.

**Figura 82A.** MRI de un paciente con astrocitoma maligno.

**Figura 82B.** SPECT con  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-DG de un paciente con astrocitoma maligno.

**Figura 82C.** MRI de un paciente con astrocitoma hemorrágico.

**Figura 83B.** SPECT con  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-DG de un paciente con astrocitoma maligno.

**Figura 84A.** MRI de un paciente con meningioma benigno.

**Figura 84B.** SPECT con  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-DG de un paciente con meningioma benigno no mostró una captación focal intensa.

**Figura 85A.** CT de un paciente con TB en pulmón.

**Figura 85B.** SPECT con  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-DG de un paciente con TB no mostró una captación focal intensa.

**Figura 86A.** CT de un paciente con cáncer en pulmón.

**Figura 86B.** Imágenes de cuerpo completo de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-DG de un paciente con cáncer de pulmón

**Figura 86C.** SPECT con  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-DG de un paciente con cáncer de pulmón, el tumor mostró una captación focal intensa.

## **DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS**

**[0023]** En el campo de la medicina nuclear, ciertas condiciones patológicas se localizan, o se evalúa su extensión, detectando la distribución de pequeñas cantidades de compuestos trazadores marcados radiactivamente administrados internamente (denominados radiotrazadores o radiofármacos). Los métodos para detectar estos radiofármacos son conocidos generalmente como métodos de formación de imágenes o radioimágenes.

**[0024]** En la formación de radioimágenes, el radiomarcador es un radionucleido emisor de radiación gamma y el radiotrazador se localiza usando una cámara para la detección de radiación gamma (este proceso se denomina a menudo como escintigrafía gamma). El sitio fotografiado es detectable porque el radiotrazador se elige para localizarse en un sitio patológico (denominado contraste positivo) o, alternativamente, el radiotrazador se elige específicamente para no localizarse en dichos sitios patológicos (denominado contraste negativo).

**[0025]** Se sabe que una variedad de radionucleidos son útiles para formación de radioimágenes, incluyendo  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{169}\text{Yb}$  o  $^{186}\text{Re}$ . Debido a mejores características de formación de imágenes y el precio más bajo, se han hecho intentos para sustituir los compuestos marcados con  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{111}\text{In}$  por los correspondientes compuestos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$ , cuando sea posible. Debido a las características físicas favorables, así como el precio extremadamente bajo (\$ 0,21/mCi), se ha preferido el  $^{99m}\text{Tc}$  para marcar radiofármacos. Aunque se ha descrito que un conjugado DTPA-fármaco podría marcarse con  $^{99m}\text{Tc}$  de manera eficaz (Mathias et al., 1997), el grupo DTPA no se quela con  $^{99m}\text{Tc}$  de manera tan estable como con  $^{111}\text{In}$ . (Goldsmith, 1997).

**[0026]** Deben considerarse un conjunto de factores para una formación óptima de radioimágenes en los seres humanos. Para maximizar la eficacia de la detección, se prefiere un radionucleido que emite energía gamma en el rango de 100 a 200 keV. Para minimizar la dosis de radiación absorbida por el paciente, la semivida física del radionucleido debe ser tan corta como el procedimiento de formación de imágenes lo permita. Para permitir que se realicen exámenes en cualquier día y en cualquier momento del día, es ventajoso tener una fuente del radionucleido siempre disponible en el sitio clínico. El  $^{99m}\text{Tc}$  es un radionucleido preferido porque emite radiación gamma a 140 keV, tiene una semivida física de 6 horas, y está fácilmente disponible en el sitio usando un generador de molibdeno-99/tecnecio- $^{99m}$ .

[0027] Los ligandos tetradentados de bis-aminoetanotiol, también llamados compuestos diaminoditiol, son conocidos por formar complejos Tc(V)O muy estables en base a una unión eficiente del grupo oxotecnecio a dos azufres tiol y dos átomos de nitrógeno de amina. (Davison et al, 1980;. 1981;. Verbruggen et al, 1992). La  $^{99m}\text{Tc}$ -L,L-etilendicisteína ( $^{99m}\text{Tc}$ -EC) es el ejemplo más reciente y exitoso de quelatos de  $\text{N}_2\text{S}_2$ . (Verbruggen et al, 1992; Van Nerom et al, 1993;. Surma et al, 1994). La EC, un nuevo agente de formación de imágenes renales, se puede marcar con  $^{99m}\text{Tc}$  de manera fácil y eficiente con alta pureza y estabilidad radioquímica y se excreta a través del riñón mediante el transporte tubular activo. (Verbruggen et al, 1992; Van Nerom et al, 1993; Surma et al., 1994; Verbruggen et al., 1990; Van Nerom et al., 1990; Jamar et al., 1993). Otras aplicaciones de la EC sería quelarse con Galio-68 (un emisor de positrones,  $t_{1/2} = 68$  minutos) para el PET y gadolinio, hierro o manganeso para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI).

[0028] La presente invención utiliza  $^{99m}\text{Tc}$ -EC como un agente de marcaje para dirigir ligandos a tipos de tejido específicos para la formación de imágenes. La ventaja de conjugar la EC con ligandos dirigidos a tejido es que las propiedades de unión específica del ligando dirigido a tejido concentra la señal radiactiva sobre el área de interés. Si bien se prevé que el uso de  $^{99m}\text{Tc}$ -EC como una estrategia de marcaje puede ser eficaz con prácticamente cualquier tipo de compuesto, en este documento se proporcionan algunos ligandos sugeridos preferidos para fines de ilustrativos. Se contempla que los conjugados  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-fármaco de la invención pueden ser útiles para la formación de imágenes no sólo de tumores, sino también de otras afecciones específicas de tejido, tales como infección, tejido hipóxico (ictus), infarto de miocardio, células apoptóticas, enfermedad de Alzheimer y endometriosis.

[0029] En la técnica anterior se han descrito proteínas y péptidos radiomarcados. (Ege et al., Patente de Estados Unidos No. 4.832.940, Abrams et al., 1990; Bakker et al., 1990; Goldsmith et al, 1995,1997.; Olexa et al. 1982; Ranby et al. 1988; Hadley et al. 1988; Lees et al. 1989; Sobel et al. 1989; Stuttle, 1990; Maraganore et al. 1991; Rodwell et al. 1991; Tubis et al. 1968; Sandrehagen 1983). Sin embargo, la  $^{99m}\text{Tc}$ -EC no se ha utilizado conjuntamente con cualquier otro ligando, diferente del éster dietílico (Kabasakal, 2000), antes de la presente invención. El éster dietílico de EC fue utilizado como un agente del flujo sanguíneo cerebral (Kikukawa, et al., 2000).

[0030] Aunque óptima para la formación de radioimágenes, la química del  $^{99m}\text{Tc}$  no se ha estudiado tan a fondo como la química de otros elementos y por esta razón los métodos de radiomarcaje con  $^{99m}\text{Tc}$  no son abundantes. El  $^{99m}\text{Tc}$  normalmente se obtiene como pertecnetato con  $^{99m}\text{Tc}$  ( $\text{TcO}_4^-$ ; tecnecio en el estado de oxidación +7), habitualmente a partir de un generador de molibdeno-99/tecnecio- $^{99m}$ . Sin embargo, el pertecnetato no se une bien con otros compuestos. Por lo tanto, con el fin de radiomarcarse un compuesto, el pertecnetato con  $^{99m}\text{Tc}$  debe ser convertida a otra forma. Dado que el tecnecio no forma un ion estable en solución acuosa, debe mantenerse en dichas soluciones en forma de un complejo de coordinación que tiene una cinética suficiente y una estabilidad termodinámica para evitar la descomposición y conversión resultante del  $^{99m}\text{Tc}$  ya sea a dióxido de tecnecio insoluble o de nuevo a pertecnetato.

[0031] Para el propósito de radiomarcaje, es particularmente ventajoso que se forme el complejo de  $^{99m}\text{Tc}$  como un quelato en el cual todos los grupos donantes que rodean al ion de tecnecio son proporcionados por un único ligando quelante, en este caso, etilendicisteína. Esto permite que el  $^{99m}\text{Tc}$  quelado se una covalentemente a un ligando específico de tejido, ya sea directamente o a través de un solo enlazador entre la etilendicisteína y el ligando.

[0032] El tecnecio tiene una serie de estados de oxidación: +1, +2, +4, +5, +6 y +7. Cuando está en el estado de oxidación +1, se llama Tc MIBI. El Tc MIBI debe producirse con una reacción con calor. (Seabold et al., 1999). Para los propósitos de la presente invención, es importante que el Tc esté en el estado de oxidación +4. Este estado de oxidación es ideal para la formación del quelato de  $\text{N}_2\text{S}_2$  con EC. De este modo, en la formación de un complejo de tecnecio radiactivo con los conjugados de fármaco (reactivos) de la invención, el complejo de tecnecio, preferiblemente una sal de pertecnetato con  $^{99m}\text{Tc}$ , se hace reaccionar con los conjugados de fármaco (reactivos) de la invención en presencia de un agente reductor.

[0033] El agente reductor preferido para utilizar en la presente invención es el ion estannoso en la forma de cloruro de estaño ( $\text{SnCl}_2$ ) para reducir el Tc a su estado de oxidación +4. Sin embargo, se contempla que otros agentes reductores, tales como el ion ditionito o ion ferroso, pueden ser útiles en conjunción con la presente invención. También se contempla que el agente reductor puede ser un agente reductor en fase sólida. La cantidad de agente reductor puede ser importante ya que es necesario para evitar la formación de un coloide. Es preferible, por ejemplo, usar de aproximadamente 10 a aproximadamente 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{SnCl}_2$  por aproximadamente 100 a aproximadamente 300 mCi de pertecnetato con Tc. La cantidad más preferida es de aproximadamente 0,1 mg de  $\text{SnCl}_2$  por aproximadamente 200 mCi de pertecnetato con Tc y aproximadamente 2 ml de solución salina. Esto normalmente produce suficiente conjugado de Tc-EC-ligando específico de tejido para utilizar en 5 pacientes.

[0034] A menudo también es importante incluir un antioxidante en la composición para evitar la oxidación de la etilendicisteína. El antioxidante preferido para su uso en conjunción con la presente invención es la vitamina C (ácido ascórbico). Sin embargo, se contempla que otros antioxidantes, tales como tocoferol, piridoxina, tiamina o rutina, también pueden ser útiles.

**[0035]** En general, los ligandos para su uso en conjunción con la presente invención poseerán grupos amino o hidroxilo que son capaces de conjugarse a EC en uno o ambos brazos de ácido. Si los grupos amino o hidroxilo no están disponibles (por ejemplo, grupo funcional ácido), todavía se puede conjugar un ligando deseado con EC y marcarse con  $^{99m}\text{Tc}$  usando los métodos de la invención mediante la adición de un enlazador, tal como etilendiamina, aminopropanol, dietilentriamina, ácido aspártico, ácido poliaspártico, ácido glutámico, ácido glutámico o lisina.

**[0036]** La propia EC es soluble en agua. Es necesario que el conjugado EC-fármaco de la invención también sea soluble en agua. Muchos de los ligandos utilizados en conjunción con la presente invención serán solubles en agua, o formarán un compuesto soluble en agua cuando se conjuga con EC. Si el ligando específico de tejido no es soluble en agua, sin embargo, puede utilizarse un enlazador que aumentará la solubilidad del ligando. Los enlazadores pueden unirse a un alcohol alifático o aromático, amina o péptido o a un grupo carboxílico y/o péptido. Los enlazadores pueden ser poli aminoácidos (péptido) o de aminoácidos, tales como ácido glutámico, ácido aspártico o lisina. La tabla 1 ilustra enlazadores deseados para grupos funcionales del fármaco específicos.

Tabla 1

Grupo funcional del fármaco	Enlazador	Ejemplo
-OH alifático o fenólico	EC-poli (ácido glutámico) (PM 750-15.000) o EC-poli (ácido aspártico) (PM 2.000-15.000) o acetato de bromoetilo o EC-ácido glutámico o EC-ácido aspártico	A
-NH <sub>2</sub> alifático o aromático o péptido	EC-poli (ácido glutámico) (PM 750-15.000) o EC-poli (ácido aspártico) (PM 2.000-15.000) o EC-ácido glutámico (monoéster o diéster) o EC-ácido glutámico o EC-ácido aspártico	B
Ácido carboxílico o péptido	Etilendiamina, lisina	C

Ejemplos:

A. estradiol, topotecan, paclitaxel, raloxifeno, etopósido

B. doxorubicina, mitomicina C, endostatina, annexina V, LHRH, octreótido, VIP

C. metotrexato, ácido fólico

**[0037]** También se prevé que los conjugados (reactivos) de fármaco-ligando específico de tejido-EC de la invención se puedan quelar a radionucleidos y utilizarse para la terapia con radionucleidos. Generalmente, se cree que prácticamente se puede utilizar cualquier emisor  $\alpha, \beta$ , emisor  $\gamma$  o emisor  $\beta, \gamma$  en conjunción con la presente invención. Los emisores  $\beta, \gamma$  preferidos incluyen  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$  y  $^{89}\text{Sr}$ . Los emisores  $\beta$  preferidos incluyen  $^{90}\text{Y}$  y  $^{225}\text{Ac}$ . Los emisores  $\gamma$  preferidos incluyen  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$  y  $^{111}\text{In}$ . Los emisores  $\alpha$  preferidos incluyen  $^{211}\text{At}$  y  $^{212}\text{Bi}$ . Se prevé también que pueden quelarse sustancias paramagnéticas, tales como Gd, Mn y Fe, con EC para su uso en conjunción con la presente invención.

**[0038]** Los complejos y medios para preparar tales complejos se proporcionan convenientemente en forma de kit que incluye un vial sellado que contiene una cantidad predeterminada de un conjugado de ligando específico de tejido-EC (reactivos) de la invención para ser marcado y una cantidad suficiente de agente reductor para marcar el conjugado con  $^{99m}\text{Tc}$ . Los agentes de formación de imágenes escintigráficas marcados con  $^{99m}\text{Tc}$ , según la presente invención, se pueden preparar mediante la adición de una cantidad apropiada de  $^{99m}\text{Tc}$  o complejo de  $^{99m}\text{Tc}$  en un vial que contiene el reactivo y agente reductor y la reacción bajo las condiciones descritas en Ejemplo 1 a continuación. El kit también puede contener materiales auxiliares farmacéuticos convencionales, tales como, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables, para ajustar la presión osmótica, tampones, conservantes, antioxidantes, y similares. Los componentes del kit pueden estar en forma líquida, congelada o seca. En una realización preferida, los componentes del kit se proporcionan en forma liofilizada.

**[0039]** Los reactivos o conjugados marcados radiactivamente proporcionados por la presente invención se proporcionan con una cantidad adecuada de radiactividad. En la formación de complejos radiactivos de  $^{99m}\text{Tc}$ , en general se prefiere formar complejos radiactivos en soluciones que contienen radiactividad en concentraciones de aproximadamente 0,01 milicurios (mCi) a aproximadamente 300 mCi por ml.

**[0040]** Los agentes de formación de imágenes escintigráficas marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  proporcionados por la presente invención se pueden usar para la visualización de sitios en el cuerpo de un mamífero. De acuerdo con la presente invención, los agentes de formación de imágenes escintigráficas marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  se administran en una dosis inyectable con una única unidad. Se puede utilizar cualquiera de los portadores habituales conocidos por los expertos en la materia, tales como solución salina estéril o plasma, después del radiomarcado para la preparación de la solución inyectable para formar imágenes para el diagnóstico de diversos órganos, tumores y similares de acuerdo

con la presente invención. Generalmente, la dosis unitaria a administrar tiene una radiactividad de aproximadamente 0,01 mCi a aproximadamente 300 mCi, preferiblemente de 10 mCi a aproximadamente 200 mCi. La solución a inyectar en la dosis unitaria es de aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 10 ml. Después de la administración intravenosa, la formación de imágenes del órgano o tumor in vivo puede tener lugar, si se desea, en horas o incluso más tiempo, después de que el reactivo radiomarcado se introduzca en un paciente. En la mayoría de los casos, una cantidad suficiente de la dosis administrada se acumulará en el área a mostrar en imágenes en aproximadamente 0,1 de una hora para permitir la toma de escintifotos. De acuerdo con la presente invención se puede utilizar cualquier método convencional de formación de imágenes escintigráficas con fines de diagnóstico o pronóstico.

[0041] La estrategia de marcaje con  $^{99m}\text{Tc}$ -EC de la presente invención también puede usarse para fines de pronóstico. Se prevé que la EC se puede conjugar a fármacos conocidos de elección para la quimioterapia del cáncer. Estos conjugados EC-fármaco pueden entonces radiomarcarse con  $^{99m}\text{Tc}$  y administrarse a una paciente que tiene un tumor. Los conjugados EC-fármaco (reactivos) marcados se unirán específicamente al tumor. La formación de imágenes se puede realizar para determinar la eficacia del fármaco para quimioterapia contra el cáncer frente al tumor particular de ese paciente en particular. De esta manera, los médicos pueden determinar rápidamente qué modo de tratamiento seguir, que fármaco para quimioterapia será más eficaz. Esto representa una mejora espectacular sobre los métodos actuales que incluyen la elección de un fármaco y la administración de una ronda de quimioterapia. Esto implica meses de tiempo del paciente y muchos miles de dólares antes de que se pueda determinar la eficacia del fármaco.

[0042] Los conjugados de ligando específico de tejido-EC marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  proporcionados por la presente invención se pueden administrar por vía intravenosa en cualquier medio convencional para inyección intravenosa, tal como en un medio de solución salina acuosa o en medio de plasma sanguíneo. Dicho medio también puede contener materiales auxiliares farmacéuticos convencionales, tales como, sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la presión osmótica, tampones, conservantes, antioxidantes y similares. Entre los medios preferidos se encuentran la solución salina normal y el plasma.

[0043] A continuación, se describen con más detalle estrategias dirigidas o reconocimiento específicas preferidas.

#### Reconocimiento de la glicólisis del tumor

[0044] Los ligandos radiomarcados, tales como polisacáridos (neomicina, kanamicina, tobramicina) y monosacárido (glucosamina) se unen al transportador de glucosa celular, seguido por la fosforilación que se sobreexpresa en células tumorales (Rogers et al, 1968; Fanciulli et al, 1994; Popovici et al, 1971; Jones et al, 1973; Hermann et al, 2000). El nivel de glucosa inducido por polisacárido (neomicina, kanamicina, tobramicina) y monosacárido (glucosamina) podría suprimirse por la insulina (Harada et al, 1995; Moller et al, 1991; Offield et al, 1996; Shankar et al, 1998; Yoshino et al, 1999; Villevalois-Cam et al., 2000). Dado que estos ligandos no son inmunogénicos y se depuran rápidamente del plasma, la formación de imágenes metabólicas parece ser más prometedora en comparación con la formación de imágenes de anticuerpos.

#### EJEMPLO 1: RECONOCIMIENTO DEL RECEPTOR DE FOLATO EN EL TUMOR

##### Síntesis de la EC

[0045] La EC se preparó en una síntesis de dos etapas de acuerdo con los métodos descritos previamente (Ratner y Clarke, 1937; Blondeau et al, 1967; cada uno incorporado en este documento por referencia). Se sintetizó el precursor, el ácido L-tiazolidin-4-carboxílico, (p.f. 195, descrito 196-197°). A continuación, se preparó la EC (p.f. 237°, descrito 251-253°). La estructura se confirmó mediante  $^1\text{H}$ -RMN y espectroscopia de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB-MS).

##### Síntesis del análogo aminoetilamido de metotrexato (MTX-NH<sub>2</sub>)

[0046] Se disolvió MIX (227 mg, 0,5 mmol) en 1 ml de solución de HCl (2N). El valor de pH fue <3. A esta solución agitada, se añadieron 2 ml de agua y 4 ml de N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ, 6,609% en metanol, 1 mmol) a temperatura ambiente. Se añadió lentamente etilendiamina (EDA, 0,6 ml, 10 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche y el disolvente se evaporó a vacío. El material sólido bruto se lavó con éter dietílico (10 ml), acetonitrilo (10 ml) y alcohol etílico al 95% (50 ml) para eliminar la EEDQ y EDA sin reaccionar. A continuación, el producto se secó por liofilización y se usó sin purificación adicional. El producto pesó 210 mg (84,7%) como un polvo amarillo. P.f. del producto: 195-198°C (MIX);  $^1\text{H}$ -NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  2,98-3,04 (d, 8H, - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH(CHO)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4,16-4,71 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-pteridinilo, aromático-NCH<sub>3</sub>, NH-CH-COOH glutamato), 6,63-6,64 (d, 2H, aromático-CO), 7,51-7,53 (d, 2H, aromático-N), 8,36 (s, 1H, pteridinilo). FAB MS m/z calculado para C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (M)<sup>+</sup> 496,515, hallado 496,835.

##### Síntesis del análogo aminoetilamido de ácido fólico (folato-NH<sub>2</sub>)



**[0047]** Se añadió ácido fólico dihidratado (1 g, 2,0 mmol) en 10 ml de agua. El valor de pH se ajustó a 2 usando HCl (2 N). A esta solución agitada, se añadieron lentamente N-etoxycarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ, 1 g en 10 ml de metanol, 4,0 mmol) y etilendiamina (EDA, 1,3 ml, 18 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó al vacío. El producto se precipitó en metanol (50 ml) y se lavó adicionalmente con acetona (100 ml) para eliminar la EEDQ y EDA sin reaccionar. A continuación, el producto se secó por liofilización y se usó sin purificación adicional. La pulverización con ninhidrina (2% en metanol) indicó la positividad de grupo amino. El producto pesó 0,6 g (rendimiento 60%) como un polvo amarillo. P.f. del producto: 250°C. <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O) δ 1,97-2,27 (m, 2H, CH<sub>2</sub> glutamato de folato), 3,05-3,40 (d, 6H, -CH<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4,27-4,84 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-pteridinilo, NH-CH-COOH glutamato), 6,68-6,70 (d, 2H, aromático-CO), 7,60-7,62 (d, 2H, aromático-N), 8,44 (s, 1H, pteridinilo). FAB MS m/z calculado para C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub> (M)<sup>+</sup> 483, encontrado 483,21.

#### Síntesis de etilendicisteína-folato (EC-folato)

**[0048]** Para disolver EC, se añadió NaOH (2 N, 0,1 ml) a una solución agitada de EC (114 mg, 0,425 mmol) en agua (1,5 ml). A esta solución incolora, se añadieron sulfo-NHS (92,3 mg, 0,425 mmol) y EDC (81,5 mg, 0,425 mmol). A continuación, se añadió folato-NH<sub>2</sub> (205 mg, 0,425 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se dializó durante 48 horas utilizando una membrana porosa molecular Spectra/POR con un corte de moléculas de 500 (Spectrum Medical Industries Inc., Houston, TX). Después de la diálisis, el producto se liofilizó. El producto pesó 116 mg (rendimiento 35%). P.f. 195°C; <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O) δ 1,98-2,28 (m, 2H, CH<sub>2</sub> glutamato de folato), 2,60-2,95 (m, 4H y -CH<sub>2</sub>-SH de EC), 3,24-3,34 (m, 10H, CH<sub>2</sub>-CO, etilendiamina de folato y etilendiamina de EC), 4,27-4,77 (m, 5H, CH-pteridinilo, NH-CH-COOH glutamato de folato y NH-CH-COOH de EC), 6,60-6,62 (d, 2H, aromático-CO), 7,58-7,59 (d, 2H, aromático-N), 8,59 (s, 1H, pteridinilo). Calculado analíticamente para C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>11</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub> (8H<sub>2</sub>O), FAB MS m/z (M)<sup>+</sup> 777,3 (libre de agua). C, 37,79; H, 5,75; N, 16,72; S, 6,95. Encontrado: m/z (M)<sup>+</sup> 777,7 (20), 489,4 (100). C, 37,40; H, 5,42; N, 15,43; S, 7,58.

#### Radiomarcaje de EC-folato y EC con <sup>99m</sup>Tc

**[0049]** La radiosíntesis de <sup>99m</sup>Tc-EC-folato se consiguió añadiendo la cantidad requerida de pertecnetato con <sup>99m</sup>Tc en un kit casero que contenía el residuo liofilizado de EC-folato (3 mg), SnCl<sub>2</sub> (100 µg), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (13,5 mg), ácido ascórbico (0,5 mg) y NaEDTA (0,5 mg). El pH final de la preparación fue de 7,4. La <sup>99m</sup>Tc-EC también se obtuvo usando el kit casero que contenía el residuo liofilizado de EC (3 mg), SnCl<sub>2</sub> (100 µg), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (13,5 mg), ácido ascórbico (0,5 mg) y NaEDTA (0,5 mg) a pH 10. A continuación, el pH final de la preparación se ajustó a 7,4. La pureza radioquímica se determinó mediante TLC (ITLC SG, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) eluida con, respectivamente, acetona (sistema A) y acetato de amonio (1 M en agua):metanol (4:1) (sistema B). A partir del análisis de radio-TLC (Bioscan, Washington, DC), la pureza radioquímica fue > 95% para ambos radiofármacos.

### RECONOCIMIENTO DE LA GLUCÓLISIS EN EL TUMOR

#### EJEMPLO 2: DESARROLLO DE <sup>99m</sup>Tc-EC-NEOMICINA

##### Síntesis de EC

**[0050]** La EC se preparó en una síntesis de dos etapas de acuerdo con los métodos descritos previamente (Ratner y Clarke, 1937; Blondeau et al, 1967). Se sintetizó el precursor, el ácido L-tiazolidin-4-carboxílico, (p.f. 195, descrito 196-197°). A continuación, se preparó la EC (p.f. 237°, descrito 251-253°). La estructura se confirmó mediante <sup>1</sup>H-RMN y espectroscopia de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB-MS).

##### Síntesis de etilendicisteína-neomicina (EC-neomicina)

**[0051]** Se añadió hidróxido de sodio (2 N, 0,2 ml) a una solución agitada de EC (134 mg, 0,50 mmol) en agua (5 ml). A esta solución incolora, se añadieron sulfo-NHS (217 mg, 1,0 mmol) y EDC (192 mg, 1,0 mmol). A continuación, se añadió la sal trisulfato de neomicina (909 mg, 1,0 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se dializó durante 48 horas utilizando una membrana porosa molecular Spectra/POR con un corte de moléculas de 500 (Spectrum Medical Industries Inc., Houston, TX). Después de la diálisis, el producto se liofilizó utilizando un liofilizador (Labconco, Kansas City, MO). El producto pesó 720 mg (rendimiento 83%). El esquema sintético de EC-neomicina se muestra en la figura 36. La estructura se confirmó por <sup>1</sup>H-RMN (figuras 38A-B), espectrometría de masas (figuras 39A-B) y análisis elemental (Galbraith Laboratories, Inc. Knoxville, TN). Análisis elemental C<sub>39</sub>H<sub>75</sub>N<sub>10</sub>S<sub>4</sub>O<sub>19</sub>·15H<sub>2</sub>O (C, H, N, S), Calculado C: 33,77, H: 7,58, N: 10,11, S: 9,23; encontrado C: 32,44, H: 5,90, N: 10,47, S: 10,58. La longitud de onda UV de EC-neomicina se desplazó a 270,5 nm en comparación con EC y neomicina (figuras 40A-C).

#### Radiomarcaje de EC-MN y EC-neomicina con <sup>99m</sup>Tc

**[0052]** La radiosíntesis de <sup>99m</sup>Tc-EC y <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina se consiguieron añadiendo la cantidad requerida de pertecnetato con <sup>99m</sup>Tc en un kit casero que contenía el residuo liofilizado de EC o EC-neomicina (10 mg), SnCl<sub>2</sub>

(100 µg), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (13,5 mg) y ácido ascórbico (0,5 mg). A continuación, se añadió NaEDTA (0,5 mg) en 0,1 ml de agua. El pH final de la preparación fue de 7,4. La pureza radioquímica se determinó mediante TLC (ITLC SG, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) eluida con acetato de amonio (1 M en agua):metanol (4:1). A partir del análisis de radio-TLC (Bioscan, Washington, DC) (figura 41) y análisis HPLC (figuras 42-45), la pureza radioquímica fue > 95% para ambos radiotrazadores.

#### Ensayo de estabilidad de <sup>99m</sup>Tc-EC y <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina

[0053] La estabilidad de <sup>99m</sup>Tc-EC y <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina se analizó en muestras de suero de perro. Brevemente, se incubaron 740 KBq de 1 mg de <sup>99m</sup>Tc-EC y <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina en suero de perro (200 µl) a 37°C durante 4 horas. Las muestras de suero se diluyeron con metanol al 50% en agua y se repitió la radio-TLC a las 0,5, 2 y 4 horas tal como se describió anteriormente.

#### Estudios de distribución tisular de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina

[0054] Se inocularon ratas Fischer 344 hembra (150 ± 25 g) (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) por vía subcutánea con 0,1 ml de células tumorales mamarias de la suspensión de la línea celular tumoral 13762 (10<sup>6</sup> células/rata, una línea celular de tumor específica para ratas Fischer) en las patas traseras utilizando agujas de calibre 25. Los estudios se realizaron entre 14 y 17 días después de la administración, cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 1 cm de diámetro. Las ratas se anestesiaron con ketamina (10-15 mg/rata, por vía intraperitoneal) antes de cada procedimiento.

[0055] En estudios de distribución tisular, cada animal se inyectó intravenosamente con 10-20 µCi de <sup>99m</sup>Tc-EC o de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina (n = 3/punto de tiempo). La masa inyectada de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina fue de 200 µg por rata. A las 0,5, 2 y 4 horas después de la administración de los radiotrazadores, las ratas se sacrificaron y los tejidos seleccionados se extirparon, se pesaron y se contó la radiactividad. La biodistribución del trazador en cada muestra se calculó como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de peso húmedo de tejido (% ID/g). Las relaciones de densidad del recuento de tejido tumoral/no diana se calcularon a partir de los valores de %ID/g correspondientes. Cuando se compararon con <sup>99m</sup>Tc-EC y tecnecio libre (Tabla 3), las relaciones de tumor con respecto a tejido aumentaron en función del tiempo en el grupo de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina (Tabla 2).

#### Estudios de la formación de imágenes escintigráficas

[0056] Se obtuvieron imágenes escintigráficas usando una cámara gamma (Siemens Medical Systems, Inc., Hoffman Estates, IL) equipada con un colimador de agujeros paralelos de baja energía 0,5, 2 y 4 horas después de la inyección i.v de 100 µCi de cada radiotrazador. En comparación con <sup>99m</sup>Tc-EC, se observó una alta captación en los tumores (Figura 37A). Se llevaron a cabo estudios de formación de imágenes clínicas preliminares en un paciente con cáncer de mama. El tumor se visualizó bien a las 2 horas posteriores a la administración de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina (Figura 37B).

**TABLA 2**  
**Biodistribución de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina en ratas que tienen tumor de mama**

	30 min	1 hora	2 horas	4 horas
Sangre	0,463±0,007	0,262±0,040	0,139±0,016	0,085±0,004
Pulmón	0,344±0,011	0,202±0,030	0,114±0,014	0,080±0,003
Hígado	0,337±0,012	0,269±0,013	0,221±0,020	0,195±0,012
Estómago	0,279±0,039	0,147±0,001	0,061±0,008	0,054±0,008
Bazo	0,159±0,008	0,114±0,013	0,095±0,007	0,089±0,003
Riñón	8,391±0,395	8,804±0,817	8,356±0,408	8,638±0,251
Tiroides	0,349±0,008	0,202±0,028	0,114±0,007	0,086±0,001
Músculo	0,093±0,001	0,049±0,010	0,021±0,006	0,010±0,001
Intestino	0,159±0,004	0,093±0,014	0,061±0,004	0,266±0,200
Orina	25,402±8,621	21,786±2,690	0,224±0,000	2,609±2,377
Tumor	0,419±0,023	0,279±0,042	0,166±0,023	0,131±0,002
Cerebro	0,022±0,001	0,014±0,003	0,010±0,001	0,007±0,001
Corazón	0,147±0,009	0,081±0,012	0,040±0,004	0,029±0,002
Tumor/sangre	0,906±0,039	1,070±0,028	1,196±0,061	1,536±0,029
Tumor/músculo	4,512±0,220	5,855±0,458	8,364±1,469	12,706±0,783
Tumor/cerebro	19,945±1,823	20,001±0,890	17,515±2,035	20,255±1,693

Los valores mostrados representan la media ± desviación estándar de los datos de 3 animales

**TABLA 3**  
**Biodistribución de pertecnetato con <sup>99m</sup>Tc en ratas que tienen tumor de mama**

	30 min	2 horas	4 horas
Sangre	1,218±0,328	0,666±0,066	0,715±0,052
Pulmón	0,646±0,291	0,632±0,026	0,387±0,024
Hígado	0,541±0,232	0,304±0,026	0,501±0,081
Bazo	0,331±0,108	0,187±0,014	0,225±0,017
Riñón	0,638±0,197	0,489±0,000	0,932±0,029
Tiroides	24,821±5,181	11,907±15,412	17,232±5,002
Músculo	0,130±0,079	0,076±0,002	0,063±0,003
Intestino	0,153±0,068	0,186±0,007	0,344±0,027
Tumor	0,591±0,268	0,328±0,016	0,423±0,091
Cerebro	0,038±0,014	0,022±0,002	0,031±0,009
Corazón	0,275±0,089	0,145±0,015	0,166±0,012
Tumor/sangre	0,472±0,093	0,497±0,073	0,597±0,144
Tumor/músculo	4,788±0,833	4,302±0,093	6,689±1,458
Tumor/cerebro	1,084±0,023	1,084±0,115	0,865±0,279
Los valores mostrados representan la media ± desviación estándar de los datos de 3 animales			

### Captación celular in vitro de conjugados <sup>99m</sup>Tc-EC-fármaco

[0057] Para evaluar la captación celular de conjugados <sup>99m</sup>Tc-EC-fármaco, a cada pocillo que contenía 80.000 células (línea celular de cáncer de pulmón A549) se añadió 2 µCi de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina y <sup>18</sup>F-FDG. Después de incubación a 0,5-4 horas, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato 3 veces, seguido por tratamiento con tripsina para despegar las células. A continuación, se contaron las células mediante un contador gamma. La <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina mostró la mayor captación entre los agentes probados en la línea celular de cáncer de pulmón humano (Figura 46).

### Efecto de la glucosa en la captación celular de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina y <sup>18</sup>F-FDG

[0058] Se sabe que la neomicina influye en la absorción de glucosa (Rogers et al, 1968; Fanciulli et al, 1994.). Experimentos previos han demostrado que la <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina tiene una mayor captación que <sup>18</sup>F-FDG en la línea celular de cáncer de pulmón humano (A549). Para determinar si la captación de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina está mediada a través de un mecanismo relacionado con la glucosa, se añadió glucosa (0,1 mg-2,0 mg) a cada pocillo que contenía 50.000 células (mama) o 80.000 células (pulmón), junto con 2 µCi de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina y <sup>18</sup>F-FDG. Después de la incubación, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato 3 veces, seguido por tratamiento con tripsina para despegar las células. A continuación, se contaron las células mediante un contador gamma.

[0059] Mediante la adición de glucosa a la concentración de 0,1-2,0 mg/pocillo, se observó la disminución de la captación de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina en dos líneas celulares de cáncer de pulmón y una línea de células de mama. Se observaron resultados similares en los grupos con <sup>18</sup>F-FDG grupos. La <sup>99m</sup>Tc-EC (control) no mostró captación. Los hallazgos sugieren que la captación celular de <sup>99m</sup>Tc-EC-neomicina puede estar mediada a través de mecanismos relacionados con la glucosa (figuras 47, 48A y 48B).

### EJEMPLO 3: FORMACIÓN DE IMÁGENES METABÓLICAS DE TUMOR CON <sup>99m</sup>Tc-EC-DESOXIGLUCOSA

#### Síntesis de EC-desoxiglucosa (EC-DG)

[0060] Se añadió hidróxido de sodio (1N, 1 ml) a una solución agitada de EC (110 mg, 0,41 mmol) en agua (5 ml). A esta solución incolora, se añadieron sulfo-NHS (241,6 mg, 1,12 mmol) y EDC (218,8 mg, 1,15 mmol). A continuación, se añadió sal de clorhidrato de D-glucosamina (356,8 mg, 1,65 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se dializó durante 48 horas utilizando una membrana porosa molecular Spectra/POR con un corte de moléculas de 500 (Spectrum Medical Industries Inc., Houston, TX). Después de la diálisis, el producto se liofilizó utilizando un liofilizador (Labconco, Kansas City, MO). El producto en forma de sal pesó 568,8 mg. El esquema de síntesis se muestra en la figura 59. La estructura se confirmó por espectrometría de masas (Figura 60) y RMN de protón (figuras 61 y 62). La pureza radioquímica de <sup>99m</sup>Tc-EC-DG fue del 100% determinada mediante radio-TLC (Figura 63) y análisis HPLC (Figuras 64 y 65).

#### Ensayo de hexoquinasa

[0061] Para determinar si la EC-DG mimetiza la fosforilación de glucosa, se llevó a cabo un ensayo de hexoquinasa. Utilizando un kit prefabricado (Sigma Chemical Company), se ensayaron EC-DG, glucosamina y glucosa (estándar) a la longitud de onda UV de 340 nm. La glucosa, la EC-DG y la glucosamina dieron positivo en el ensayo de hexoquinasa (Figuras 66-68).

**Ensayo de captación celular in vitro**

[0062] Se llevó a cabo un ensayo de captación celular in vitro mediante el uso de una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549). Se añadieron a pocillos que contenían 80.000 células cada uno dos  $\mu\text{Ci}$  de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-DG}$  y  $^{18}\text{F-FDG}$ . Después de incubación a 0,5-4 horas, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato 3 veces, seguido por tratamiento con tripsina para despegar las células. A continuación, se contaron las células mediante un contador gamma. La captación de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-DG}$  era comparable con FDG (Figura 69).

**Efecto de la d- y l-glucosa en la captación celular de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-desoxiglucosa}$  y  $^{18}\text{F-FDG}$** 

[0063] Para evaluar si la captación de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-desoxiglucosa}$  está mediada por el mecanismo de la d-glucosa, se añadieron d- y l-glucosa (1 mg y 2,0 mg) a cada pocillo que contenía células de cáncer de mama o de pulmón (50.000/0,5 ml/pocillo), junto con 2  $\mu\text{Ci}$  de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-desoxiglucosa}$  y  $^{18}\text{F-FDG}$ . Después de 2 horas de incubación, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato 3 veces, seguido por tratamiento con tripsina para despegar las células. A continuación, se contaron las células mediante un contador gamma.

[0064] Mediante la adición de glucosa a la concentración de 1 a 2,0 mg/pocillo, se observó una disminución de la captación de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-desoxiglucosa}$  y  $^{18}\text{F-FDG}$  por la d-glucosa en las células de cáncer de mama y de pulmón. Sin embargo, no hubo ninguna influencia sobre ambos agentes por la l-glucosa (Figuras 70-73). Los hallazgos sugieren que la captación celular de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-desoxiglucosa}$  está mediada a través del mecanismo de la d-glucosa.

**Efecto de la carga de EC-desoxiglucosa en el nivel de glucosa en sangre en ratas normales**

[0065] Experimentos previos han demostrado que la captación celular de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-desoxiglucosa}$  es similar a la de FDG. Por ejemplo, el ensayo de hexoquinasa (fosforilación de glucosa) fue positivo. La captación de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-desoxiglucosa}$  está mediada a través del mecanismo de la d-glucosa. Este estudio es para determinar si el nivel de glucosa en sangre podría ser inducido por cualquiera de FDG o EC-desoxiglucosa y suprimido por la insulina.

[0066] Se pusieron en ayunas ratas Fischer 344 sanas normales (peso 145-155 g) durante la noche antes de los experimentos. La concentración de clorhidrato de glucosamina, FDG y EC-desoxiglucosa preparados fue de 60% y 164% (mg/ml). El nivel de glucosa en sangre (mg/dl) se determinó mediante un medidor de glucosa (Glucometer DEX, Bayer Corporation, Elkhart, IN). Antes del estudio, se obtuvo la línea de base del nivel de glucosa en sangre. A cada rata ( $n = 3/\text{grupo}$ ) se administró 1,2 mmol/kg de glucosamina, FDG y EC-desoxiglucosa. En un experimento separado, a un grupo de ratas se les administró EC-desoxiglucosa y FDG. Se administró insulina (5 unidades) después de 30 minutos. Se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola cada 30 minutos hasta 6 horas después de la administración.

[0067] Se indujo el nivel de glucosa en sangre mediante la administración intravenosa en bolo de glucosamina, FDG y EC-desoxiglucosa. Este aumento del nivel de glucosa en sangre se pudo suprimir mediante la coadministración de EC-desoxiglucosa o FDG e insulina (figuras 74 y 75).

**Estudios de distribución tisular de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-DG}$** 

[0068] Para el modelo de animal con tumor de mama, se inocularon ratas Fischer 344 hembra ( $150 \pm 25$  g) (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) por vía subcutánea con 0,1 ml de células tumorales mamarias de una suspensión de la línea celular tumoral 13762 ( $10^6$  células/rata, una línea celular tumoral específica para ratas Fischer) en las patas traseras con agujas del calibre 25. Los estudios se realizaron de 14 a 17 días después de la administración cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 1 cm de diámetro. Las ratas se anestesiaron con ketamina (10-15 mg/rata, por vía intraperitoneal) antes de cada procedimiento.

[0069] Para el modelo de animal con tumor de pulmón, cada ratón desnudo atímico (20-25 g) se inoculó por vía subcutánea con 0,1 ml de células tumorales de pulmón humano de una suspensión de la línea de células tumorales A549 ( $10^6$  células/ratón) en las patas traseras usando agujas del calibre 25. Los estudios se realizaron de 17 a 21 días después de la administración cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 0,6 cm de diámetro.

[0070] En estudios de distribución tisular, cada animal se inyectó intravenosamente con 10-20  $\mu\text{Ci}$  (por rata) o 1-2  $\mu\text{Ci}$  (por ratón) de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC}$  o de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-DG}$  ( $n = 3/\text{punto de tiempo}$ ). La masa inyectada de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-DG}$  fue de 1 mg por rata. A las 0,5, 2 y 4 horas después de la administración de los radiotrazadores, los roedores se sacrificaron y los tejidos seleccionados se extirparon, se pesaron y se contó la radiactividad. La biodistribución del trazador en cada muestra se calculó como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de peso húmedo de tejido (% ID/g). Las relaciones de densidad del recuento de tejido tumoral/no diana se calcularon a partir de los valores de %ID/g correspondientes. Cuando se compararon con  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC}$  y tecnecio libre (Tabla 3), las relaciones de tumor con respecto a tejido aumentaron en función del tiempo en el grupo de  $^{99\text{m}}\text{Tc-EC-DG}$  (figuras 76-80).

**Estudios de la formación de imágenes escintigráficas**

**[0071]** Se obtuvieron imágenes escintigráficas usando una cámara gamma equipada con un colimador de agujeros paralelos de baja energía 0,5, 2 y 4 horas después de la inyección i.v de 100 µCi de cada radiotrazador. El modelo animal utilizado fue ratas con tumor de mama. Los tumores se pudieron visualizar bien en comparación con <sup>99m</sup>Tc-EC (grupo de control) (figura 81). Se realizaron estudios clínicos preliminares en 5 pacientes (3 con tumores de cerebro y 2 con enfermedades de pulmón). Las imágenes se obtuvieron a las 1-2 horas después de la administración. <sup>99m</sup>Tc-EC-DG fue capaz de diferenciar los tumores benignos frente a los malignos. Por ejemplo, el astrocitoma maligno mostró una alta captación (figuras 82A, 82B, 83A y 83B). El meningioma benigno mostró una escasa captación en comparación con el meningioma maligno (figuras 84A y B). Se observó una escasa captación en pacientes con TB (figura 85A y figura 85B), pero se observó una alta captación en tumor de pulmón (Figura 86A, figura 86B, y figura 86C).

## REFERENCIAS

### [0072]

- Abrams, Juweid, Tenkate, "Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats," *J. Nucl. Med.*, 31:2022-2028, 1990.
- Bakker, Krenning, Breeman, Kiper, Kooij, Reubi, Klijn, Visser, Docter, Lamberts, "Receptor scintigraphy with a radioiodinated somatostatin analogue: radiolabeling, purification, biologic activity and in vivo application in animals," *J. Nucl. Med.*, 31:1501-1509, 1990.
- Blakenberg, Katsikis, Tait et al., "In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death," *Proc Natl. Acad. Sci USA*, 95:6349-6354, 1998.
- Blakenberg, Katsikis, Tait, Davis, Naumovski, Ohtsuki, Kopiwoda, Abrams, Strauss, "Imaging of apoptosis (programmed cell death) with 99mTc annexin V," *J. Nucl. Med.*, 40:184-191, 1999.
- Blondeau, Berse, Gravel, "Dimerization of an intermediate during the sodium in liquid ammonia reduction of Lthiazolidine-4-carboxylic acid," *Can J. Chem*, 45:49-52, 1967.
- Bolhuis, Lamers, Goey et al., "Adoptive immunotherapy of ovarian carcinoma with Bs- MAb targeted lymphocytes. A multicenter study," *Int J Cancer*, 7:78-81, 1992.
- Britton and Granowska, "Imaging of tumors, in tomography in nuclear medicine," *Proceedings of an International Symposium, Vienna, Austria, IAEA*, 91-105, 1996.
- Bush, Jenkins, Allt, Beale, Bena, Dembo, Pringle, "Definitive evidence for hypoxic cells influencing cure in cancer therapy," *Br J Cancer*, (Suppl. III) 37:302-306, 1978.
- Butterfield, Fuji, Ladd, Snow, Tan, Toner, "Segmented chelating polymers as imaging and therapeutic agents," *United States Patent* 4, 730,968, March 24, 1998.
- Campbell, Jones, Foulkes, Trowsdale, "Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer," *Cancer Res*, 51:5329-5338, 1991.
- Canevari, Miotti, Bottero, Valota, Colnaghi, "Ovarian carcinoma therapy with monoclonal antibodies," *Hybridoma*, 12:501-507, 1993.
- Cherif, Yang, Tansey, Kim, Wallace, "Synthesis of [18F]fluoromisonidazole," *Pharm Res.*, 11:466-469, 1994.
- Coenen y Stocklin, "Evaluation of radiohalogenated amino acid analogues as potential tracers for PET and SPECT studies of protein synthesis," *Radioisot Klinik Forschung*, 18:402-440, 1988.
- Coney, Mezzanzanica, Sanborn, Casalini, Colnaghi, Zurawski, "Chimeric murine-human antibodies directed against folate binding receptor are efficient mediators of ovarian carcinoma cell killing," *Cancer Res*, 54:2448-2455, 1994.
- Davison, Jones, Orvig, Sohn, "A new class of oxotechnetium(+5) chelate complexes containing a TcON2S2 Core," *Inorg Chem*, 20:1629-1632, 1980.
- Dickinson and Hiltner, "Biodegradation of poly(l-amino acid) hydrogel. II. In vitro," *J. Biomed Mater Res.*, 15:591, 1981.
- Dische, "A review of hypoxic-cell radiosensitization," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 20:147-152, 1991.
- Fanciulli, Paggi, Bruno, et al., "Glycolysis and growth rate in normal and in hexokinase-transfected NIH-3T3 cells," *Oncol Res*, 6(9):405-9, 1994.
- Franklin, Waintrub, Edwards, Christensen, Prendergrast, Woods, Bunn, Kolhouse, "New anti-lung-cancer antibody cluster 12 reacts with human folate receptors present on adenocarcinoma," *Int J Cancer-Supplement*, 8:89-95, 1994.
- Gatenby, Kessler, Rosenblum, Coia, Moldofsky, Hartz, Broder, "Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 14:831-838, 1988.
- Ginobbi, Geiser, Ombres, Citro, "Folic acid- polylysine carrier improves efficacy of c-myc antisense oligodeoxynucleotides on human melanoma (M14) cells," *Anticancer Res*, 17:29-35, 1997a.
- Goh, Pricher, Lobie, "Growth hormone promotion of tubulin polymerization stabilizes the microtubule network and protects against colchicine-induced apoptosis," *Endocrinology*, 139:4364-4372, 1998.
- Goldsmith, "Receptor imaging: Competitive or complementary to antibody imaging," *Sem Nucl Med.*, 27:85-93, 1997.
- Goldsmith, Macapinlac, O'Brien, "Somatostatin receptor imaging in lymphoma," *Sem Nucl Med*, 25:262-271, 1995.
- Gray, Conger, Elbert, Morsney, Scold, "The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy," *Br J Radiol*, 26:638-648, 1953.
- Hall, "The oxygen effect and reoxygenation," In: E. J. Hall (ed.) *Radiobiology for the radiobiologist*, 3rd edition J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, 137-160, 1988.

- Harada, Smith, Smith et al., "Insulin-induced *egr-1* and *c-fos* expression in 32D cells requires insulin receptor, Shc, and mitogen-activated protein kinase, but not insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase activation," *J. Biol. Chem.* 271(47):30222-6, 1996.
- Hay, Wilson, Moselen, Palmer, Denny, "Hypoxia-selective antitumor agents. Bis(nitroimidazolyl)alkanecarboxamides: a new class of hypoxia-selective cytotoxins and hypoxic cell radiosensitizers," *J Med. Chem.*, 37:381-391, 1994.
- Hermann, Patel. "Adaptive recognition by nucleic acid aptamers," *Science*, 287(5454):820-5, 2000.
- Holm, Hansen, Hoier-Madsen, Sondergaard, Bzorek, "Folate receptor of human mammary adenocarcinoma," *APMIS*, 102:413-419, 1994.
- Hsueh and Dolnick, "Altered folate-binding protein mRNA stability in KB cells grown in folate-deficient medium," *Biochem Pharmacol*, 45:2537-2545, 1993.
- Imbert, "Discovery of podophyllotoxins," *Biochimie*, 80:207-222, 1998.
- Jamar, Stoffel, Van Nerom, et al., "Clinical evaluation of Tc-99m L,L-ethylenedicycysteine, a new renal tracer, in transplanted patients," *J Nucl Med*, 34:129P, 1993a.
- Jamar, Van Nerom, Verbruggen, et al., "Clearance of the new tubular agent Tc-99m L,L-ethylenedicycysteine: Estimation by a simplified method," *J Nucl Med*, 34:129P, 1993b.
- Kabasakal. "Technetium-99m ethylene dicycysteine: a new renal tubular function agent," *Eur. J Nucl. Med.* 27(3):351-7, 2000.
- Kikukawa, Toyama, Katayama, et al., "Early and delayed Tc-99m ECD brain SPECT in SLE patients with CNS involvement," *Ann Nucl Med.* 14(1):25-32, 2000.
- Koh, Rasey, Evans, Grierson, Lewellen, Graham, Krohn, Griffin, "Imaging of hypoxia in human tumors with [<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 22:199-212, 1992.
- Kranz, Patrick, Brigle, Spinella, Roy, "Conjugates of folate and anti-T-cell-receptor antibodies specifically target folate-receptor-positive tumor cells for lysis," *Proc Natl Acad Sci*, 92:9057-9061, 1995.
- Krenning, Kwokkeboom, Bakker, et al., "Somatostatin receptor scintigraphy with [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe] and [I-123-Tyr]-octetide: The Rotterdam experience with more than 1000 patients," *Eur J Nucl Med*, 7:716-731, 1995.
- Lambert, Bakker, Reubi, Krenning, "Somatostatin receptor imaging in vivo localization of tumors with a radiolabeled somatostatin analog," *J. Steroid Biochem Mol Biol*, 37:1079-1082, 1990.
- Leamon and Low, "Cytotoxicity of momordin-folate conjugates in cultured human cells," *J Biol Chem*, 267:24966-24971, 1992.
- Leamon and Low, "Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis," *Proc Natl Acad Sci*, 88:5572-5576, 1991.
- Leamon, Pastan, Low, "Cytotoxicity of folate-pseudomonas exotoxin conjugates toward tumor cells," *J Biol Chem*, 268: 24847-24854, 1993.
- Lee and Low, "Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis," *J Biol Chem*, 269: 3198-3204, 1994.
- Lennon, Martin, Cotter, "Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli," *Cell Prolif*, 24:203-214, 1991.
- Lu, "Antimitotic agents," In: Foye, WO. Ed., "Cancer chemotherapeutic agents," Washington, DC: American Chemical Society, 345-368, 1995.
- Martin, Caldwell, Rasey, Grunbaum, Cerqueira, Krohn, Enhanced binding of the hypoxic cell marker [<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole in ischemic myocardium," *J Nucl Med*, 30:194-201, 1989.
- Mathias, Hubers, Trump, Wang, Luo, Waters, Fuchs, Low, Green, "Synthesis of Tc-99m-DTPA-folate and preliminary evaluation as a folate-receptor-targeted radiopharmaceutical (Abstract)," *J Nucl Med*, (Supplement); 38:87P, 1997a.
- Mathias, Wang, Waters, Turek, Low, Green, "Indium-111-DTPA-folate as a radiopharmaceutical for targeting tumor-associated folate binding protein (Abstract)," *J Nucl Med*, (Supplement) 38:133P, 1997b.
- Mathias, Wang, Lee, Waters, Low, Green, "Tumor-selective radiopharmaceutical targeting via receptor-mediated endocytosis of Gallium-67- deferoxamine- folate," *J Nucl Med*, 37:1003-1008, 1996.
- Moller, Benecke, Flier. "Biologic activities of naturally occurring human insulin receptor mutations. Evidence that metabolic effects of insulin can be mediated by a kinase-deficient insulin receptor mutant," *J Biol Chem.* 266(17):10995-1001, 1991.
- Mochizuki, Inaki, Takeymoto, "Synthesis of polyglutamates containing 5-substituted uracil moieties," *Nucleic Acids Res.*, 16:121-124, 1985.
- Nordmark, Overgaard, Overgaard, "Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck," *Radiother Oncol*, 41:31-39, 1996.
- Offield, Jetton, Labosky, et al., "PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum," *Development*. 122(3):983-95, 1996.
- Orr, Kreisler, Kamen, "Similarity of folate receptor expression in UMSCC 38 cells to squamous cell carcinoma differentiation markers," *J Natl Cancer Inst*, 87:299-303, 1995.
- Patrick, Kranz, van Dyke, Roy, "Folate receptors as potential therapeutic targets in choroid plexus tumors of SV40 transgenic mice," *J Neurooncol*, 32:111-123, 1997.
- Piper, McCaleb, Montgomery, "A synthetic approach to poly(glutamyl) conjugates of methotrexate," *J. Med. Chem.*, 26:291-294, 1983.
- Popovici, Mungiu, Trandafirescu, et al., "The influence of some antibiotics on hexokinase and pyruvate-kinase activity in the rat liver and kidney," *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 193(1):80-6, 1971.

- Raderer, Becherer, Kurtaran, Angelberger, Li, Leimer, Weinlaender, Kornek, Kletter, Scheithauer, Virgolini, "Comparison of Iodine-123-vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy and Indium-111 CFT-102 immunoscintigraphy," *J. Nucl. Med.*, 37:1480-1487, 1996.
- Raffauf, Farren, Ulyot, "Colchicine. Derivatives of trimethylcolchicinic acid," *J. Am Chem Soc*, 75:5292-5294, 1953.
- 5 Rasey, Koh, Griesohn, Grunbaum, Krohn, "Radiolabeled fluoromisonidazole as an imaging agent for tumor hypoxia," *Int. J. Radiat Oncol. Biol Phys*, 17:985-991, 1989.
- Rasey, Nelson, Chin, Evans, Grunbaum, "Characterization of the binding of labeled fluoromisonidazole in cells in vitro," *Radiat Res*, 122:301-308, 1990.
- Ratner and Clarke, "The action of formaldehyde upon cysteine," *J. Am Chem. Soc.*, 59:200-206, 1937.
- 10 Reubi, Krenning, Lamberts et al., "In vitro detection of somatostatin receptors in human tumors," *Metabolism*, 41:104-110 (suplemento 2), 1992.
- Rogers, Bachorik, Nunn. "Neomycin effects on glucose transport by rat small intestine," *Digestion*. 1(3):159-64, 1968.
- Ross, Chaudhuri, Ratnam, "Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissue in vivo and in established cell lines," *Cancer*, 73:2432-2443, 1994.
- 15 Rowinsky, Cazenave, Donehower, "Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent," *J. Natl. Cancer Institute*, 82(15):1247-1259, 1990.
- Seabold, Gurll, Schurrer, Aktay, Kirchner, "Comparison of 99mTc-Methoxyisobutyl Isonitrile and 201 Tl Scintigraphy for Detection of Residual Thyroid Cancer After 131I Ablative Therapy," *J. Nucl. Med.*, 40(9):1434-1440, 1999.
- Shankar, Zhu, Baron et al., "Glucosamine infusion in rats mimics the beta-cell dysfunction of non-insulin-dependent diabetes mellitus," *Metabolism*. 47(5):573-7, 1998.
- 20 Stella and Mathew, "Derivatives of taxol, pharmaceutical compositions thereof and methods for preparation thereof," patente de Estados Unidos 4.960,790, 2 octubre 1990.
- Surma, Wiewiora, Liniecki, "Usefulness of Tc-99m-N,N'-ethylene-1-dicysteine complex for dynamic kidney investigations," *Nucl Med Comm*, 15:628- 635, 1994.
- 25 Tait and Smith, "Site-specific mutagenesis of annexin V: role of residues from Arg-200 to Lys-207 in phospholipid binding," *Arch Biochem Biophys*, 288:141-144, 1991.
- Valk, Mathis, Prados, Gilbert, Budinger, "Hypoxia in human gliomas: Demonstration by PET with [18F]fluoromisonidazole," *J Nucl Med*, 33:2133-2137, 1992.
- Van Nerom, Bormans, Bauwens, Vandecruys, De Roo, Verbruggen, "Comparative evaluation of Tc-99m L,L-ethylenedicysteine and Tc-99m MAG3 in volunteers," *Eur J Nucl Med*, 16:417, 1990.
- 30 Van Nerom, Bormans, De Roo, et al., "First experience in healthy volunteers with Tc-99m-L,L-ethylenedicysteine, a new renal imaging agent," *Eur J Nucl Med*, 20:738-746, 1993.
- Verbruggen, Nosco, Van Nerom et al., "Tc-99m-L,L-ethylenedicysteine: A renal imaging agent. I. Labelling and evaluation in animals," *J Nucl Med*, 33:551-557, 1992.
- 35 Verbruggen, Nosco, Van Nerom, Bormans, Adriacs, De Roo, "Evaluation of Tc-99m-L,L-ethylenedicysteine as a potential alternative to Tc-99m MAG3," *Eur J Nucl Med*, 16:429, 1990.
- Villevalois-Cam, Tahiri, Chauvet, et al., "Insulin-induced redistribution of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor in intact rat liver," *J Cell Biochem*. 77(2):310-22, 2000
- Virgolini, Raderer, Kurtaran, "Vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor imaging in the localization of intestinal adenocarcinomas and endocrine tumors," *N Eng J Med*, 331:1116-1121, 1994.
- 40 Wang, Lee, Mathias, Green, Low, "Synthesis, purification, and tumor cell uptake of Ga-67 deferoxamine-folate, a potential radiopharmaceutical for tumor imaging," *Bioconjugate Chem*, 7:56- 62, 1996.
- Wang, Luo, Lantrip, Waters, Mathias, Green, Fuchs, Low, "Design and synthesis of [111In]DTPA-folate for use as a tumor-targeted radiopharmaceutical," *Bioconjugate Chem*, 8:673-679, 1997.
- 45 Wang, Wang, Ichijo, Giannakakou, Foster, Fojo, Wimalasena, "Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways," *J. Biol. Chem.*, 273:4928-4936, 1998.
- Weitman, Frazier, Kamen, "The folate receptor in central nervous system malignancies of childhood," *J Neuro-Oncology*, 21:107-112, 1994.
- 50 Weitman, Lark, Coney et al., "Distribution of folate GP38 in normal and malignant cell lines and tissues," *Cancer Res*, 52:3396-3400, 1992a.
- Weitman, Weinberg, Coney, Zurawski, Jennings, Kamen, "Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis," *Cancer Res*, 52:6708-6711, 1992b.
- Wester, Herz, Weber, Heiss, Schmidtke, Schwaiger, Stocklin, "Synthesis and radiopharmacology of -O(2-[18F]fluoroethyl)-L-Tyrosine for tumor imaging," *J. Nucl. Med.*, 40:205-212, 1999.
- 55 Westerhof, Jansen, Emmerik, Kathmann, Rijksen, Jackman, Schornagel, "Membrane transport of natural folates and antifolate compounds in murine L1210 leukemia cells: Role of carrier- and receptor- mediated transport systems," *Cancer Res*, 51:5507-5513, 1991.
- Yang, Wallace, Cherif, Li, Gretzer, Kim, Podoloff, "Development of F-18-labeled fluoroerythronitroimidazole as a PET agent for imaging tumor hypoxia," *Radiology*, 194:795-800, 1995.
- 60 Yoshino, Takeda, Sugimoto, et al., "Differential effects of troglitazone and D-chiroinositol on glucosamine-induced insulin resistance in vivo in rats," *Metabolism*. 48(11):1418-23, 1999.

## REIVINDICACIONES

1. Reactivo para la preparación de un agente para la formación de imágenes escintigráficas, comprendiendo el reactivo un ligando específico de tejido unido covalentemente a etilendicisteína (EC), en el que el ligando específico de tejido es un agente que mimetiza la glucosa seleccionado entre glucosa, glucosamina, micromicina, y aminoglicósidos.
2. Reactivo, según la reivindicación 1, en el que el aminoglicósido es neomicina, kanamicina, gentamicina, paromomicina, amikacina, tobramicina, netilmicina, ribostamicina, sisomicina, lividomicina, dibekacina, isepamicina, astromicina.
3. Reactivo, según la reivindicación 1, en el que dicho ligando específico de tejido está unido covalentemente a EC en uno o ambos brazos ácidos de EC.
4. Reactivo, según la reivindicación 1, en el que el reactivo es EC-glucosamina.
5. Reactivo, según la reivindicación 1, comprendiendo el reactivo además un enlazador entre EC y el ligando específico de tejido.
6. Reactivo, según la reivindicación 5, en el que el enlazador es un péptido soluble en agua, un aminoácido, tal como ácido glutámico, ácido aspártico y lisina; un poliaminoácido, tal como ácido poliglutámico y ácido poliaspártico; acetato de bromoetilo; o etilendiamina.
7. Agente para la formación de imágenes que comprende el reactivo, según la reivindicación 1, y que comprende además un radionucleido, en el que la EC que está unida covalentemente al ligando específico de tejido forma un quelato de  $N_2S_2$  con dicho radionucleido.
8. Agente para la formación de imágenes, según la reivindicación 7, en el que dicho radionucleido es  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{183}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{183}\text{Gd}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ , o  $^{62}\text{Cu}$ .
9. Agente para la formación de imágenes, según la reivindicación 8, en el que dicho radionucleido es  $^{99m}\text{Tc}$ .
10. Agente para la formación de imágenes, según la reivindicación 9, en el que el agente para la formación de imágenes (es decir, el reactivo marcado con radionucleido) es  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-glucosamina o  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-GAP-glucosamina (GAP = pentaglutamato).
11. Agente para la formación de imágenes, según la reivindicación 7, en el que el enlazador es un péptido soluble en agua, un aminoácido, tal como ácido glutámico, ácido aspártico y lisina; un poliaminoácido, tal como ácido poliglutámico y ácido poliaspártico; acetato de bromoetilo; o etilendiamina.
12. Composición que comprende un agente para la formación de imágenes, según la reivindicación 9, un medio para inyección intravenosa y uno o más materiales auxiliares farmacéuticamente aceptables.
13. Método de síntesis de un reactivo, según la reivindicación 1, y el marcaje por un radionucleido del mismo, comprendiendo el método las etapas de:
  - a) obtener el ligando específico de tejido, según la reivindicación 1;
  - b) mezclar dicho ligando específico de tejido con EC para obtener un reactivo, según la reivindicación 1; y
  - c) mezclar dicho reactivo, un radionucleido y un agente reductor para obtener un agente para la formación de imágenes, según la reivindicación 7, en el que la EC que está unida covalentemente al ligando específico de tejido forma un quelato de  $N_2S_2$  con el radionucleido.
14. Método, según la reivindicación 13, en el que dicho agente reductor es un ion ditionito, un ion estannoso o un ion ferroso.
15. Utilización de un agente para la formación de imágenes, según la reivindicación 9, para la fabricación de un producto farmacéutico para formar imágenes de un tumor, un sitio de infección, un corazón, un pulmón, un cerebro, un hígado, un bazo, un páncreas, o un intestino en un mamífero.
16. Utilización, según la reivindicación 15, en la que el tumor es un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer positivo en folato o un cáncer positivo en ER.
17. Kit para preparar una preparación radiofarmacéutica, comprendiendo dicho kit un recipiente sellado, tal como una bolsa, incluyendo el recipiente una cantidad predeterminada de un reactivo, según la reivindicación 1, y un agente reductor para marcar el reactivo con  $^{99m}\text{Tc}$ .
18. Kit, según la reivindicación 17, en el que el agente reductor es un ion ditionito, un ion estannoso o un ion ferroso.



19. Kit, según la reivindicación 17, en el que los componentes del kit están en forma líquida, en forma congelada, o en una forma seca, tal como una forma liofilizada.

- 5    20. Kit, según la reivindicación 17, en el que el kit comprende además uno o más materiales auxiliares farmacéuticos, en particular sales farmacéuticamente aceptables, tampones, conservantes, antioxidantes, tales como vitamina C, y un atrapante, tal como glucoheptonato o EDTA.

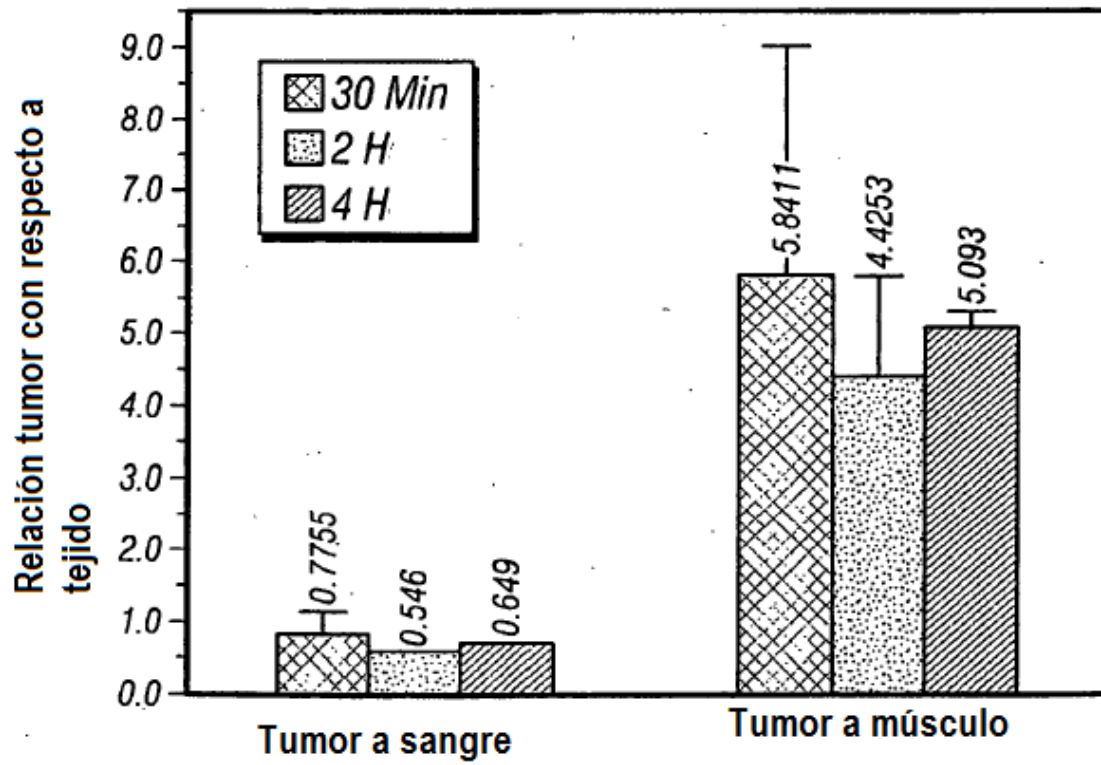


Figura 24

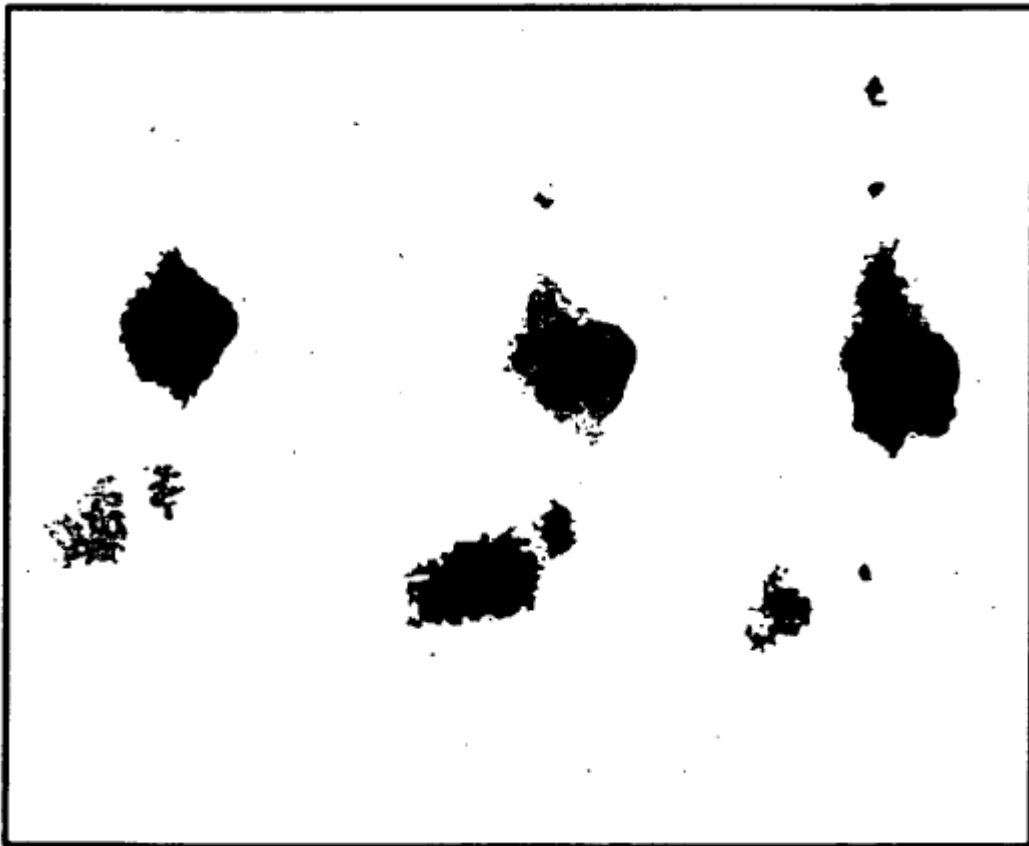


Figura 26

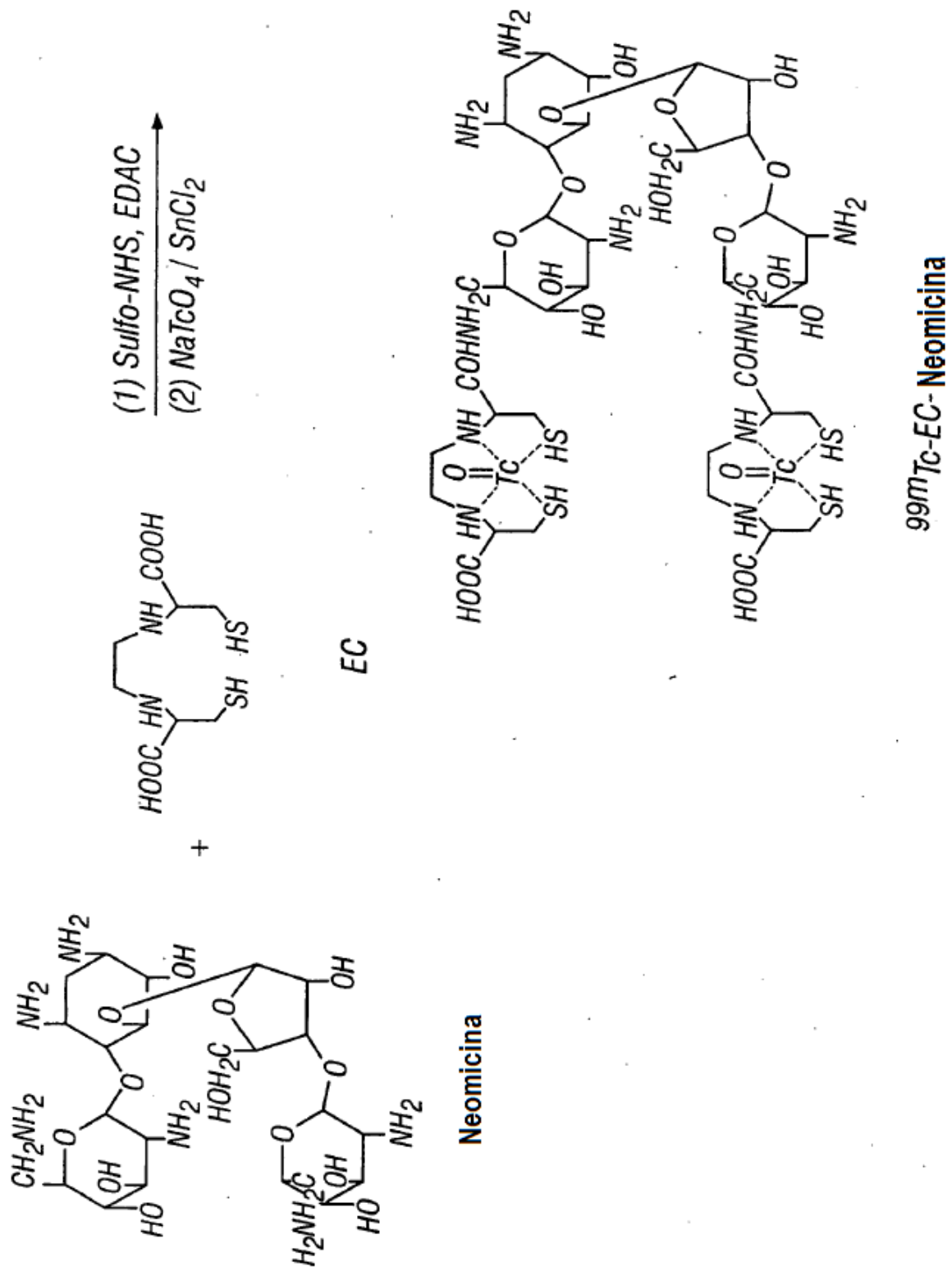


Figura 36

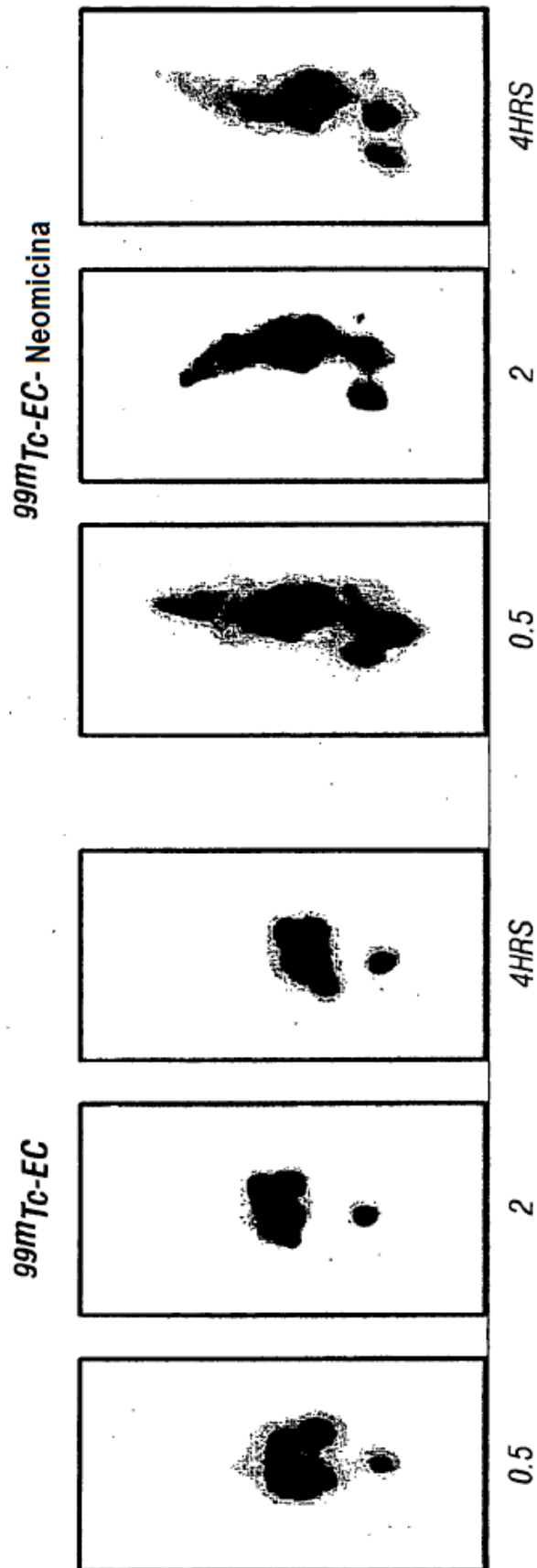


Figura 37A

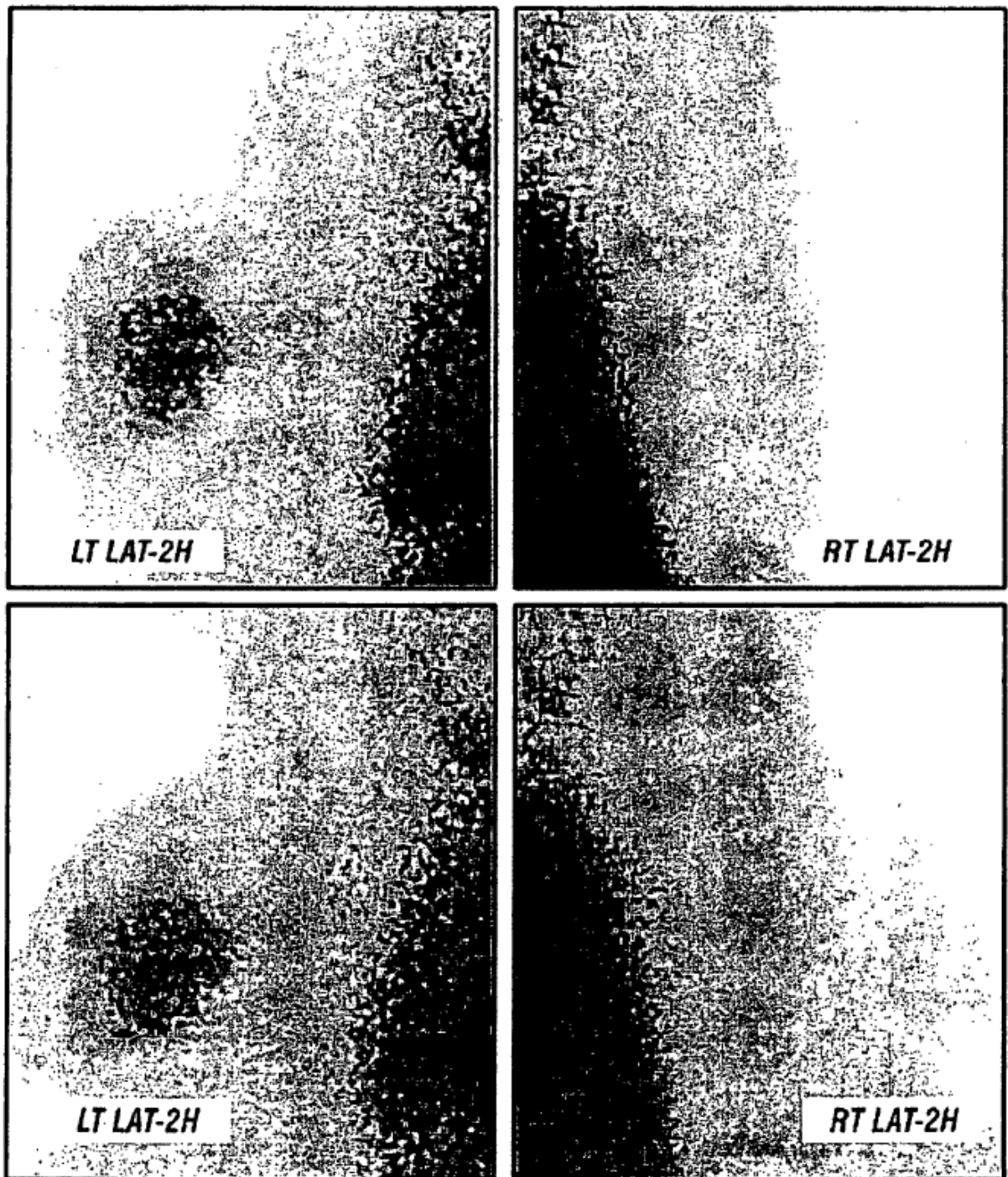
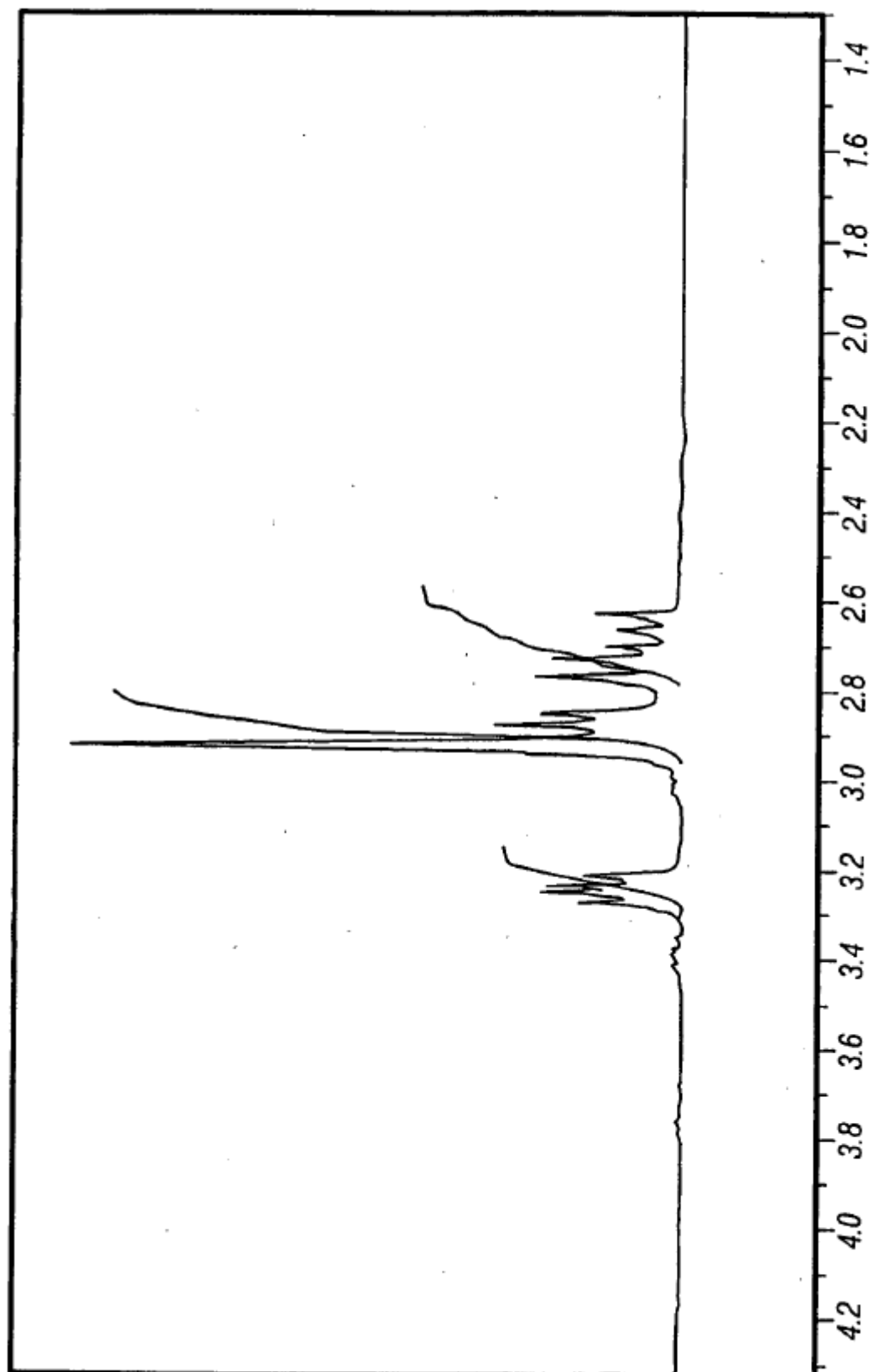
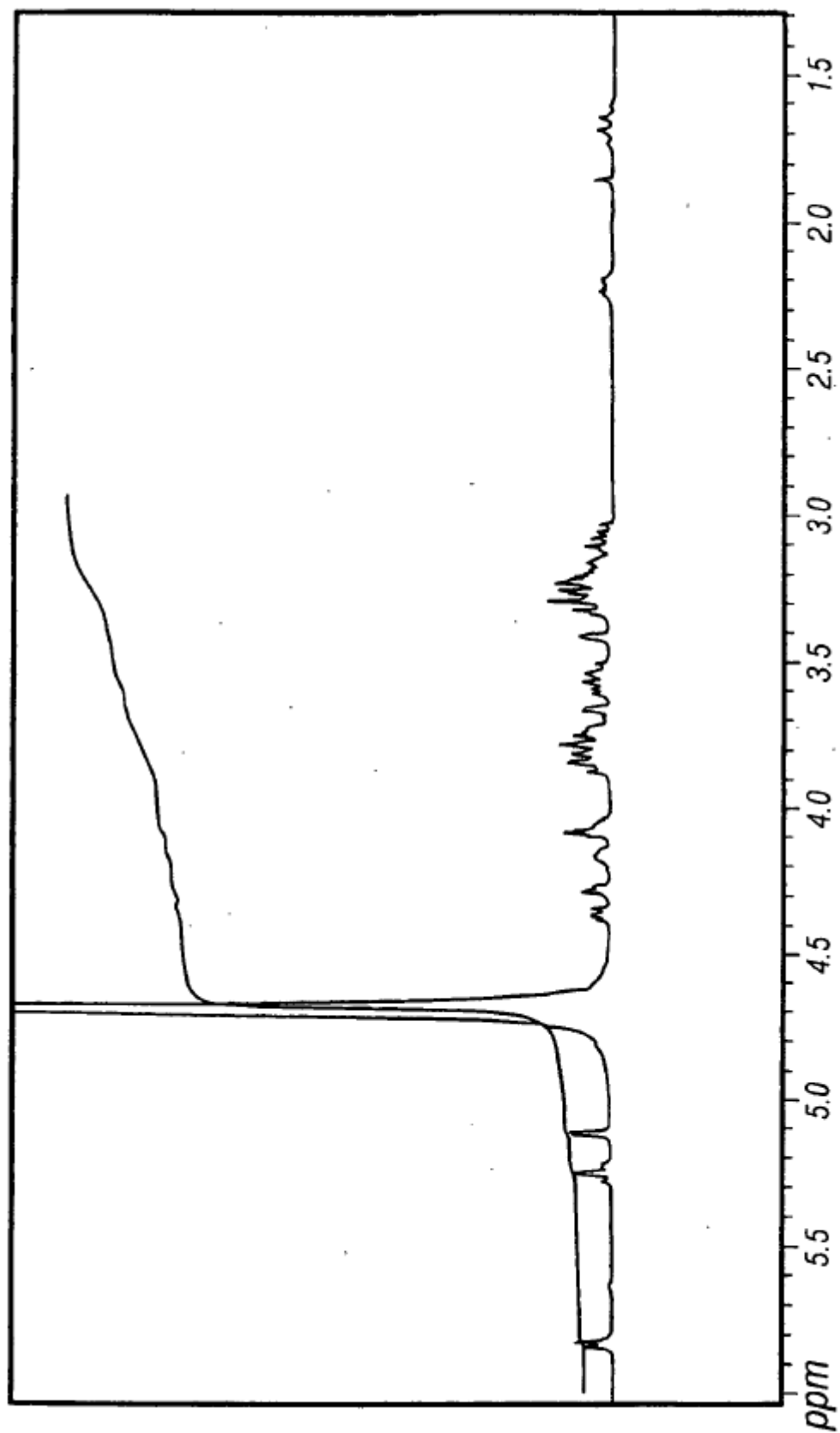


Figura 37B



$^1\text{H}$ -NMR de EC.

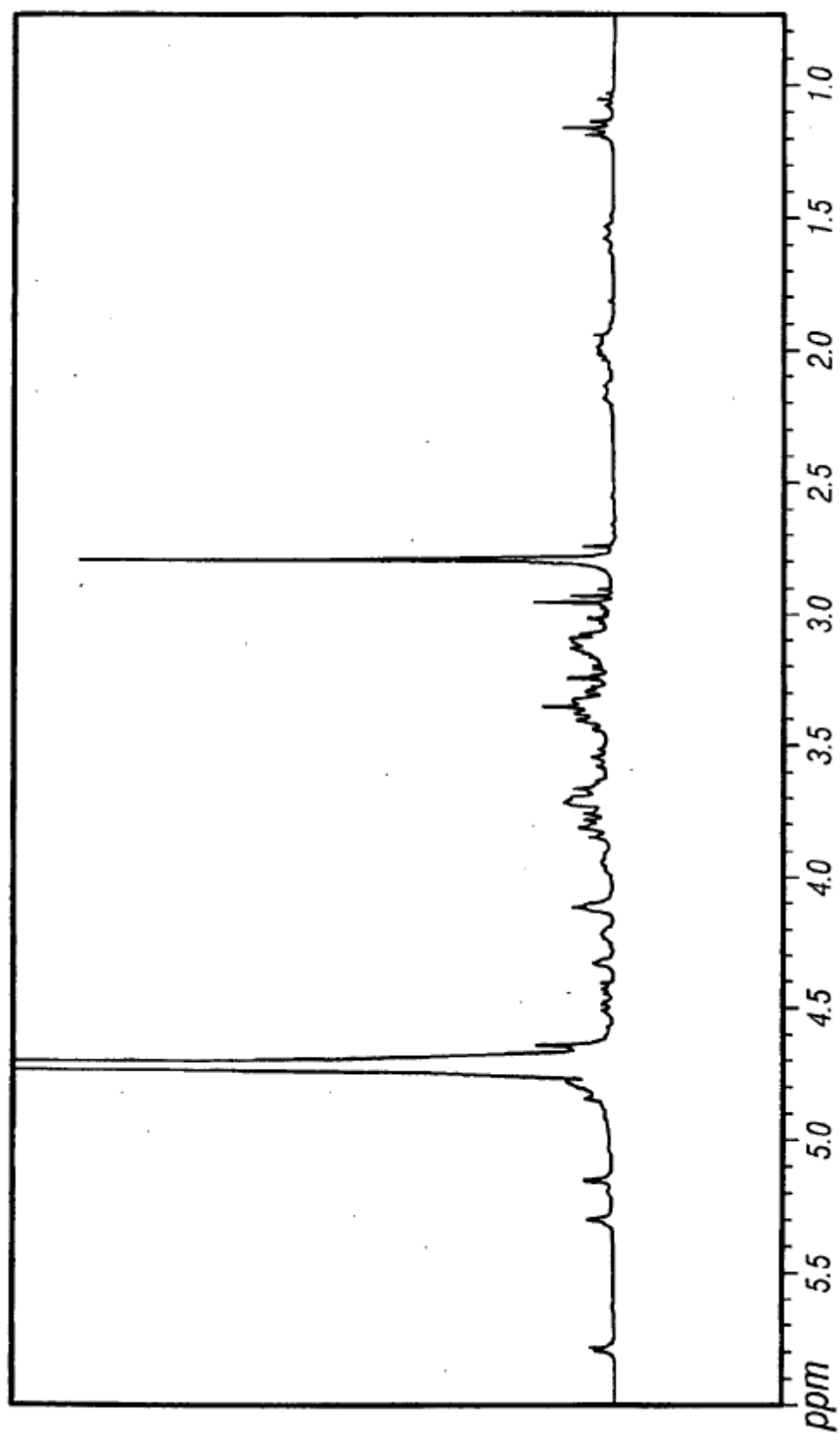
Figura 38A



$^1\text{H-NMR}$  de neomicina

Figura 38B





$^1\text{H}$ -NMR de EC-neomicina

Figura 38C

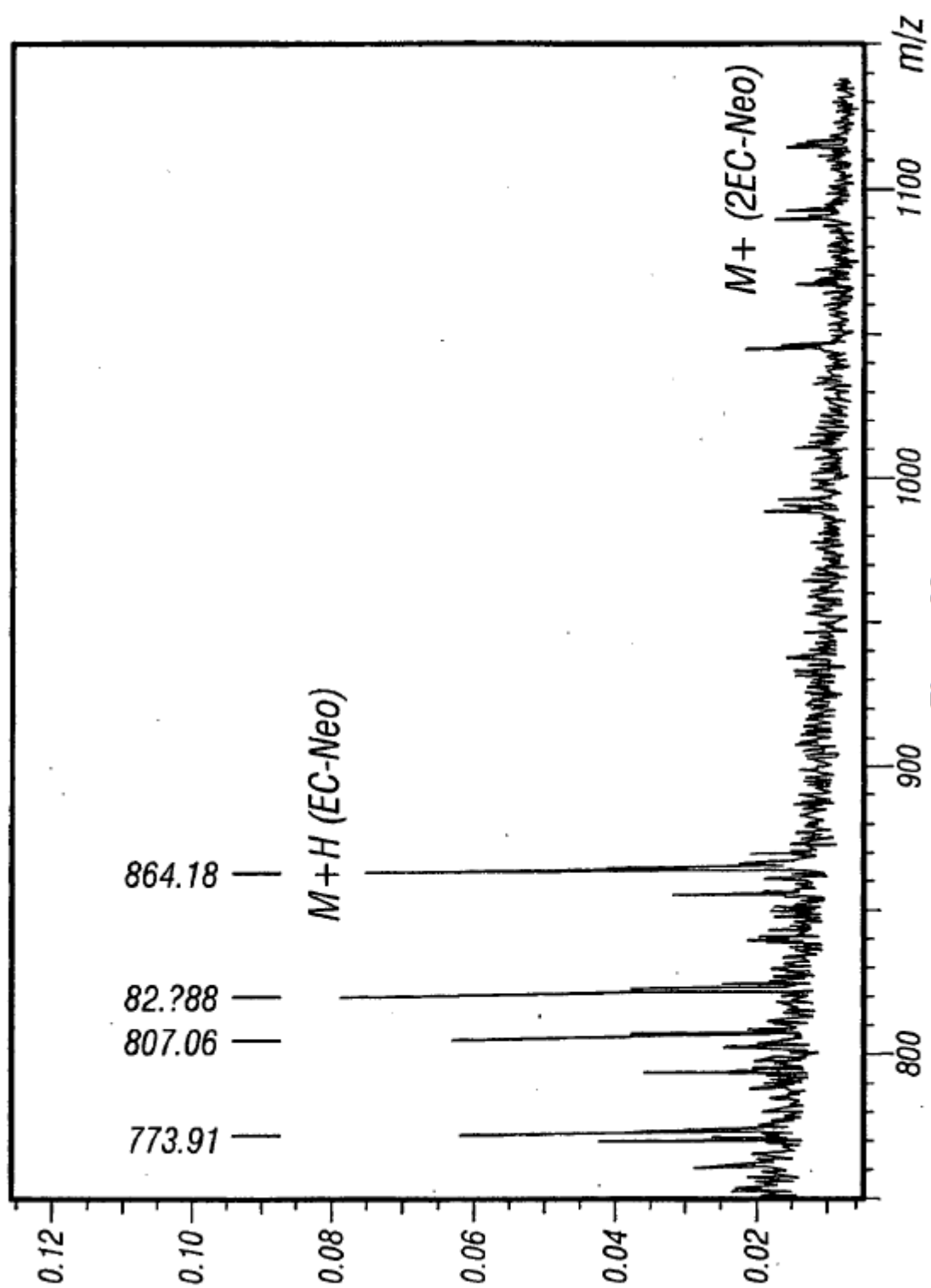


Figura 39

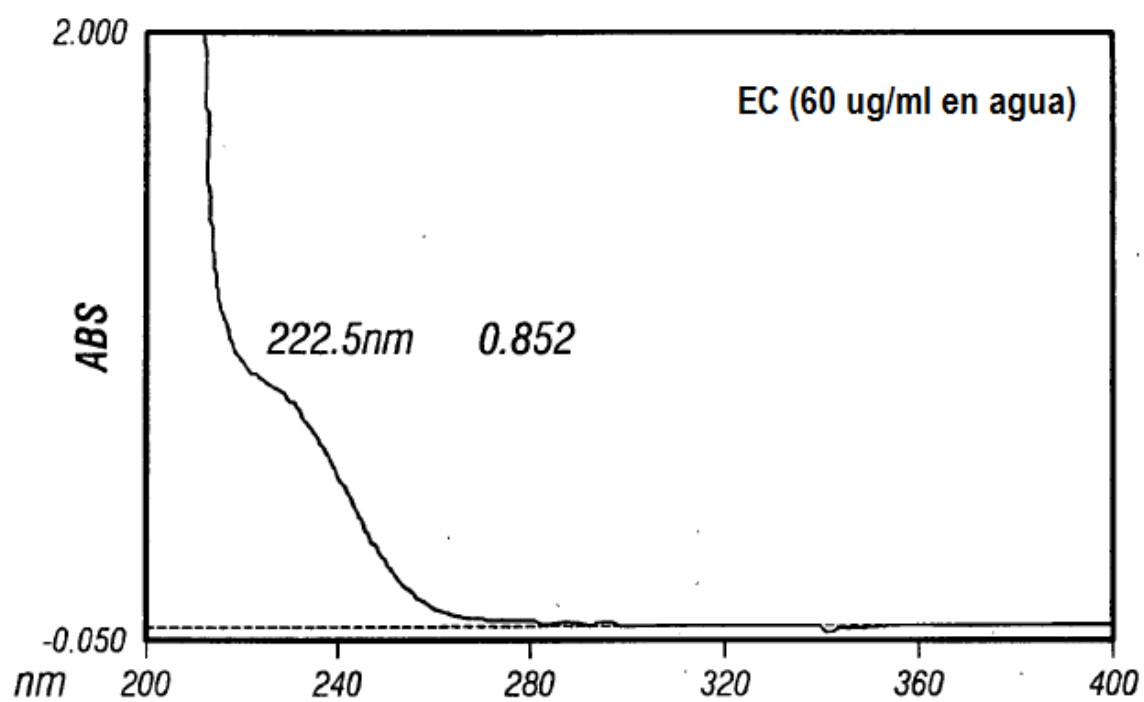


Figura 40A

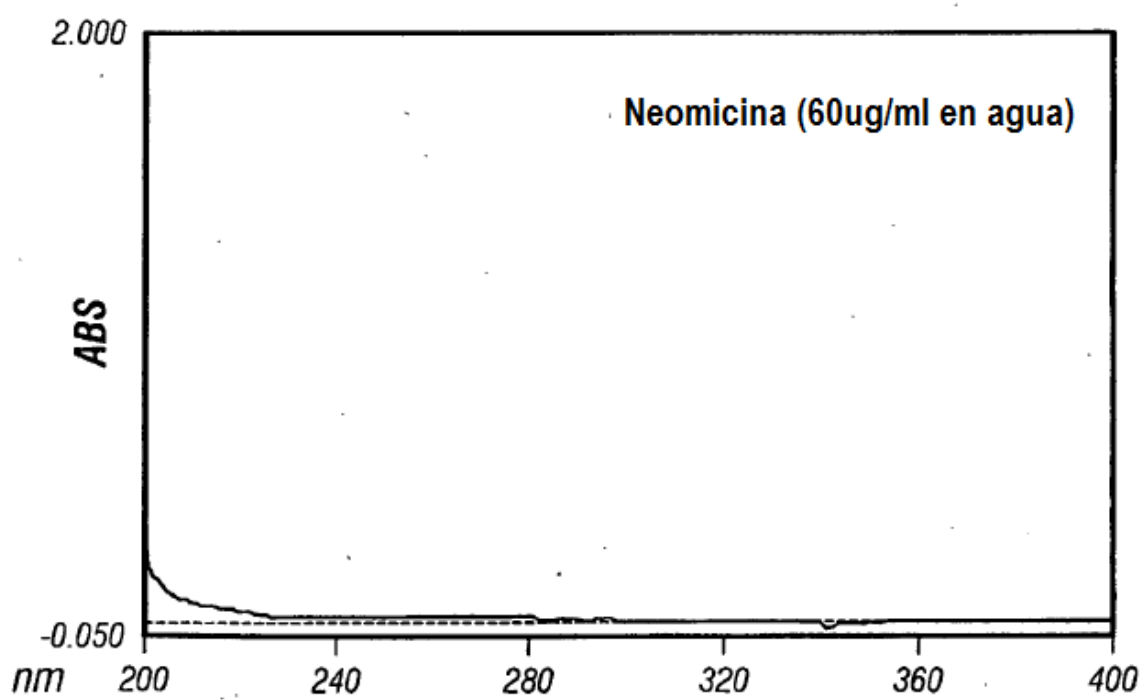


Figura 40B

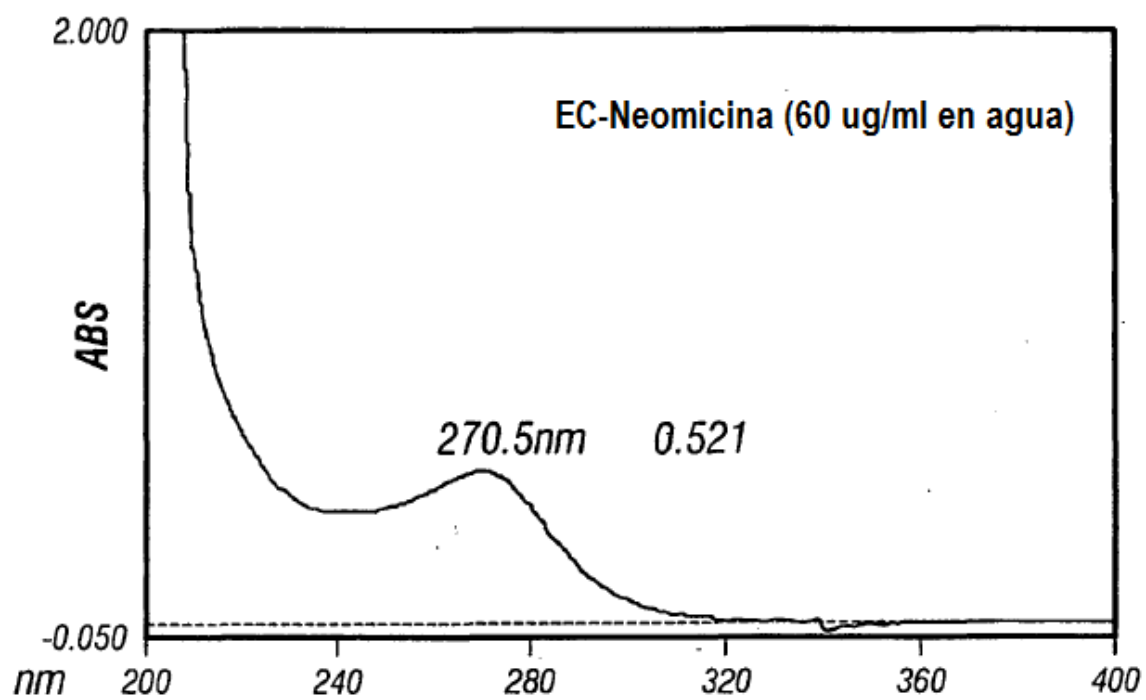


Figura 40C

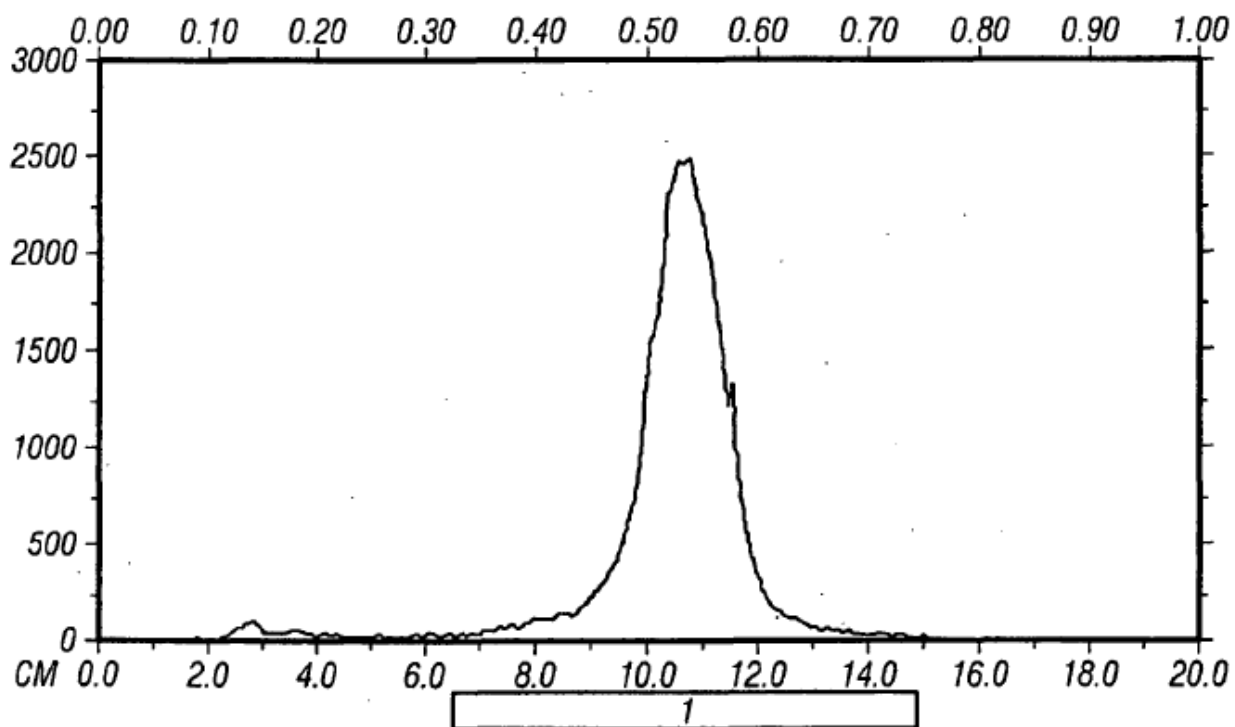


Figura 41

$^{99m}\text{Tc}$ -EC-NEO

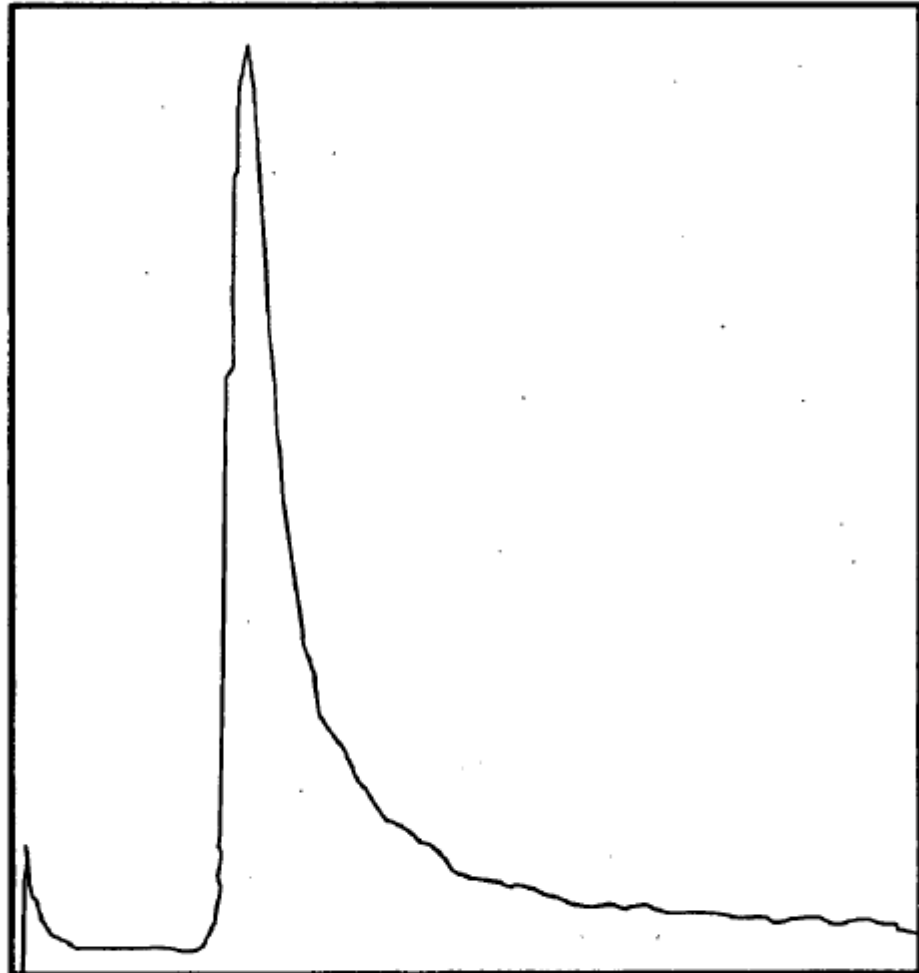


Figura 42

$^{99m}\text{Tc}$ -EC-NEO

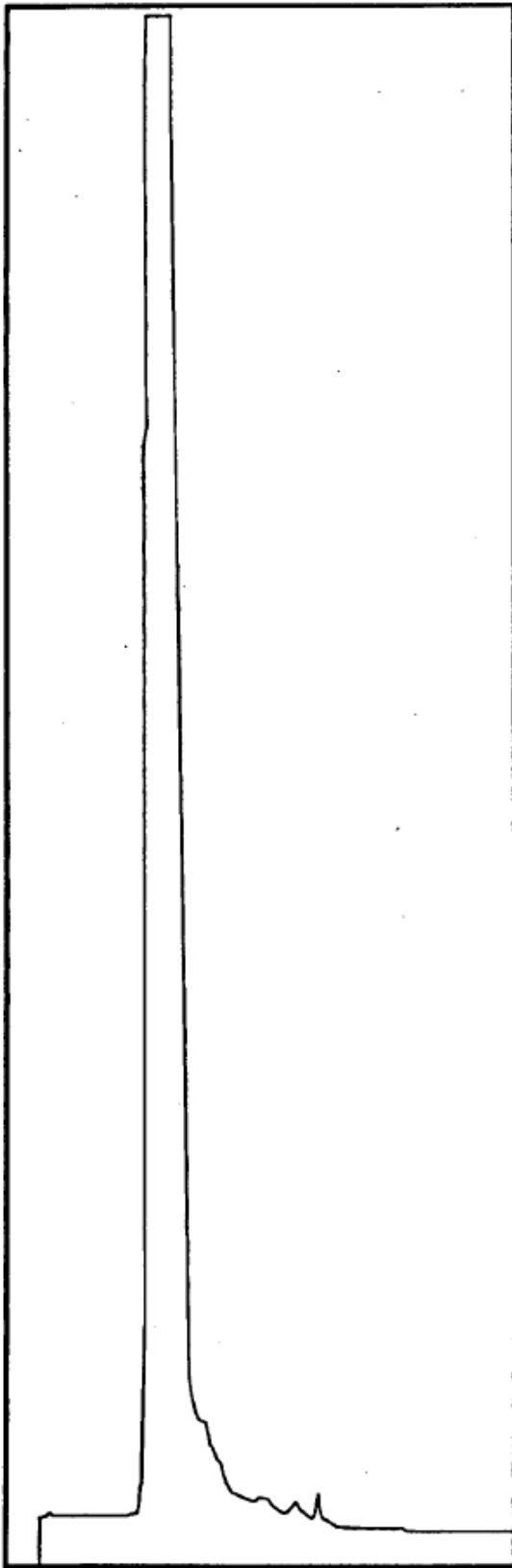
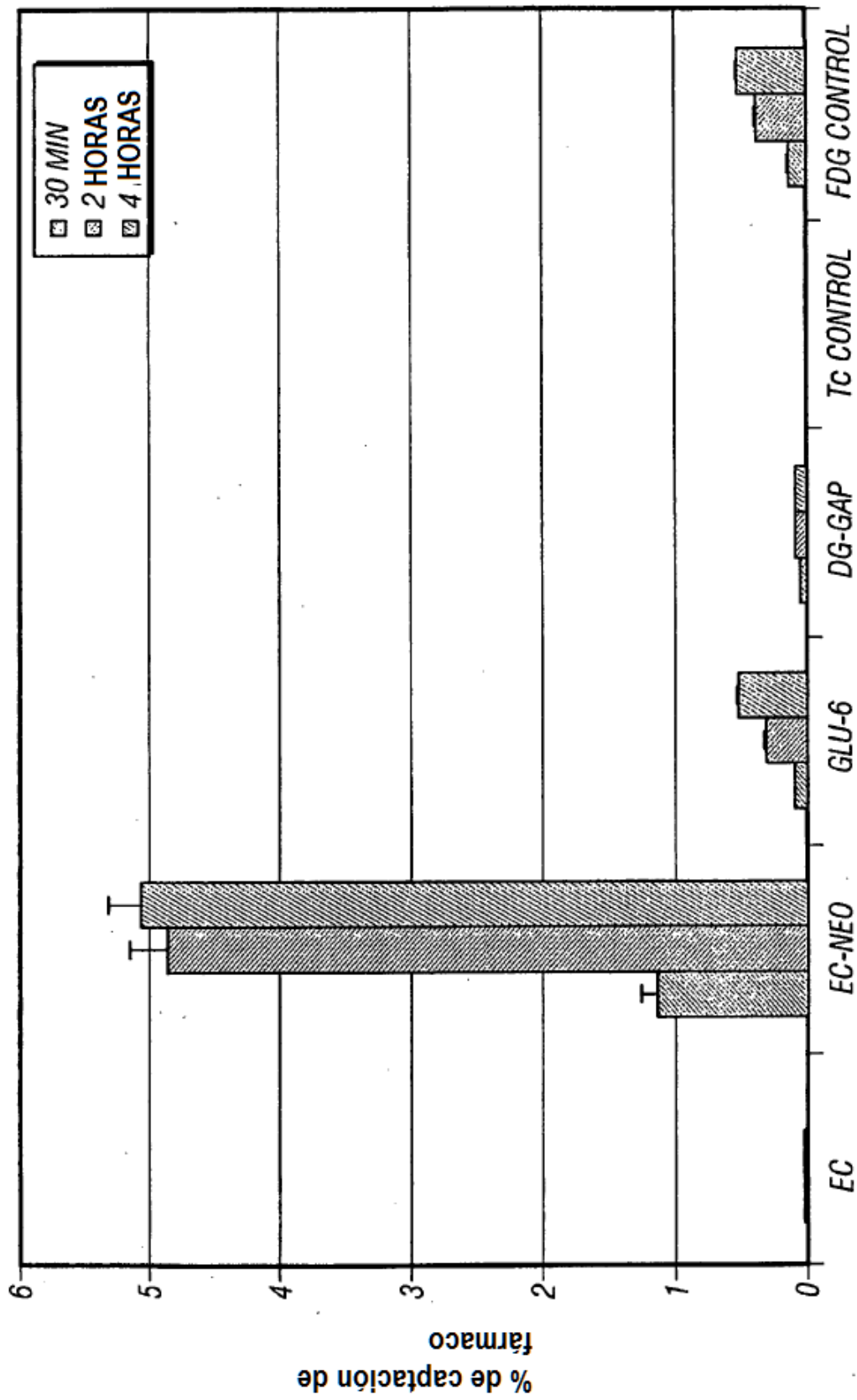


Figura 43



AGENTE

Figura 46

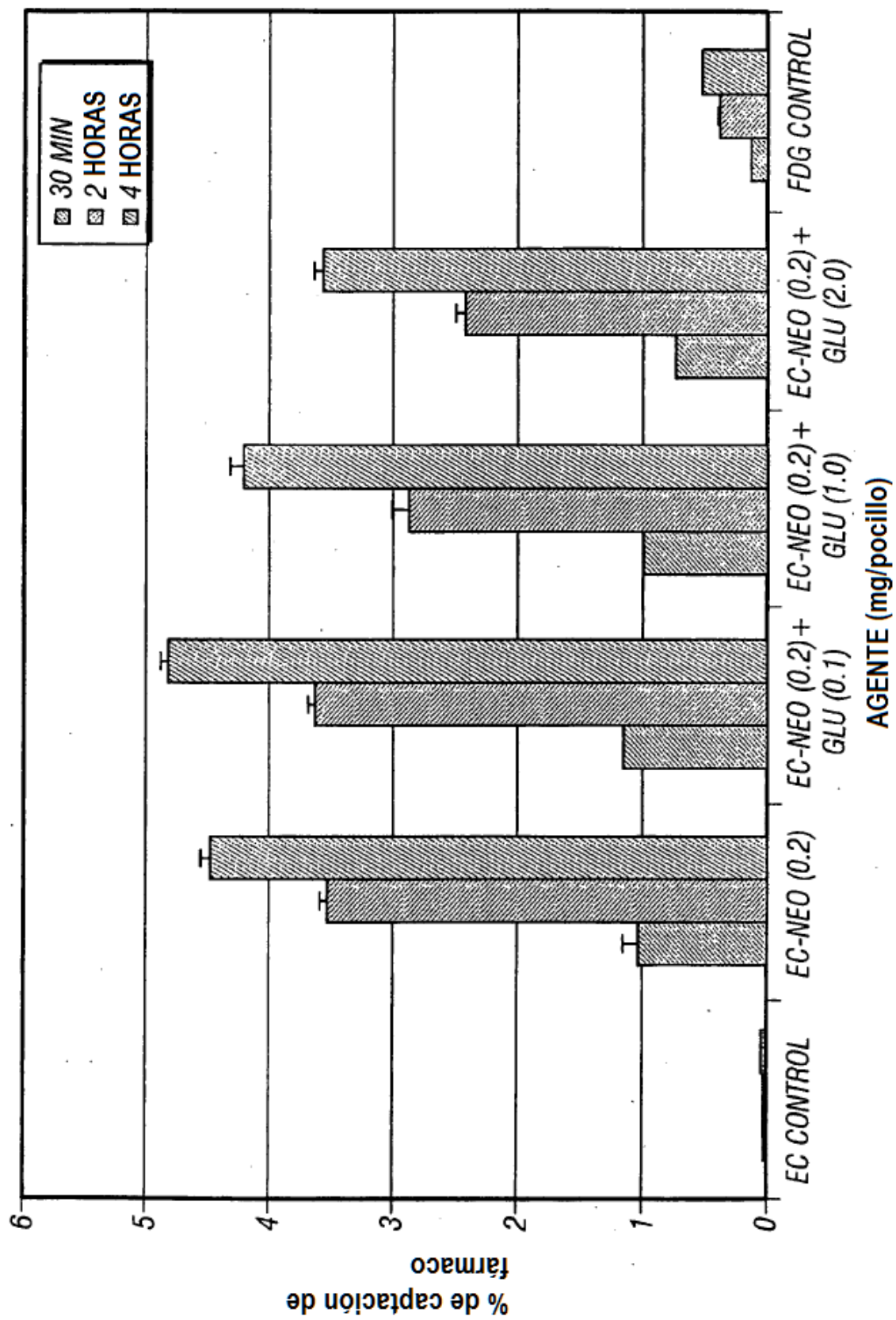


Figura 47



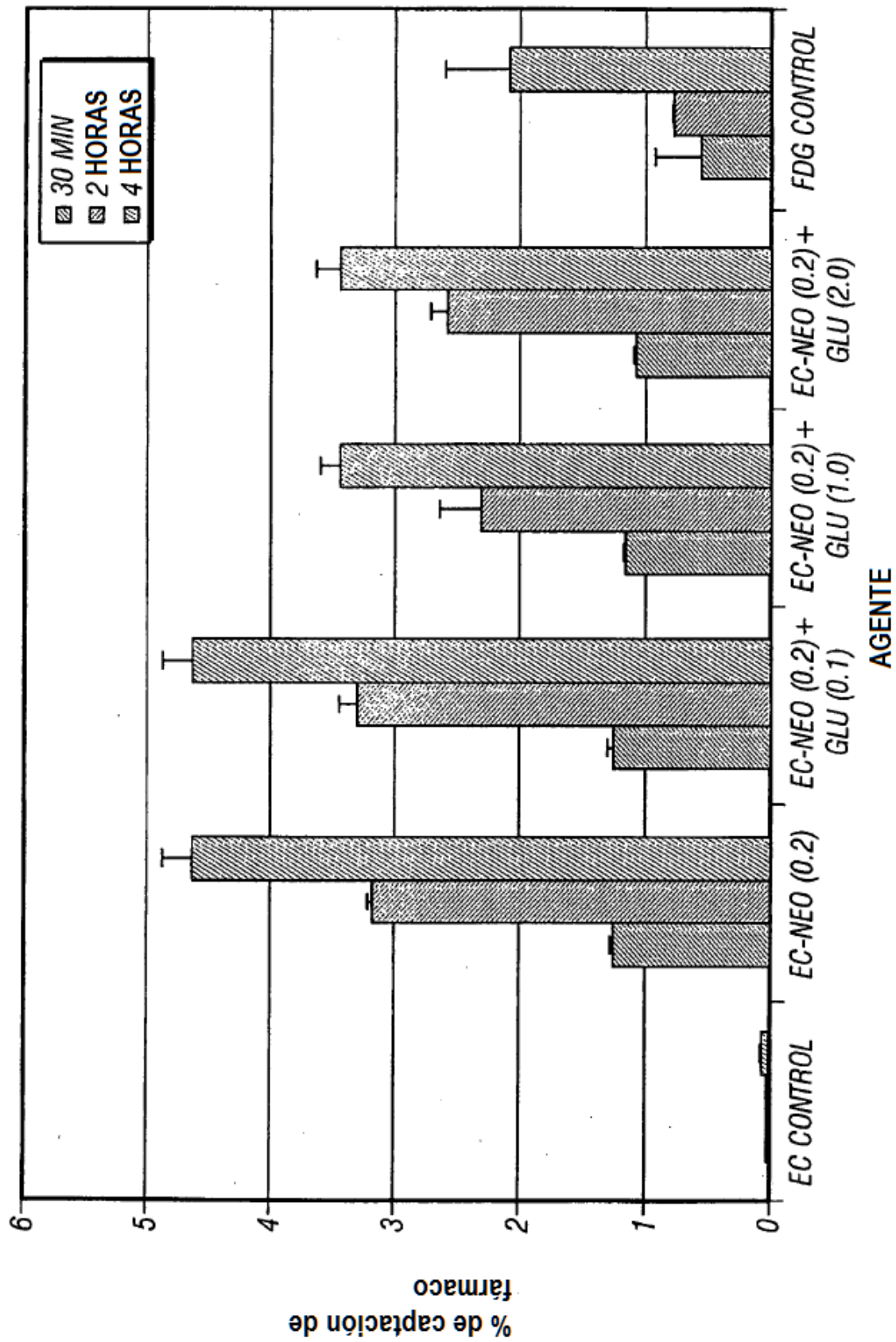


Figura 48A

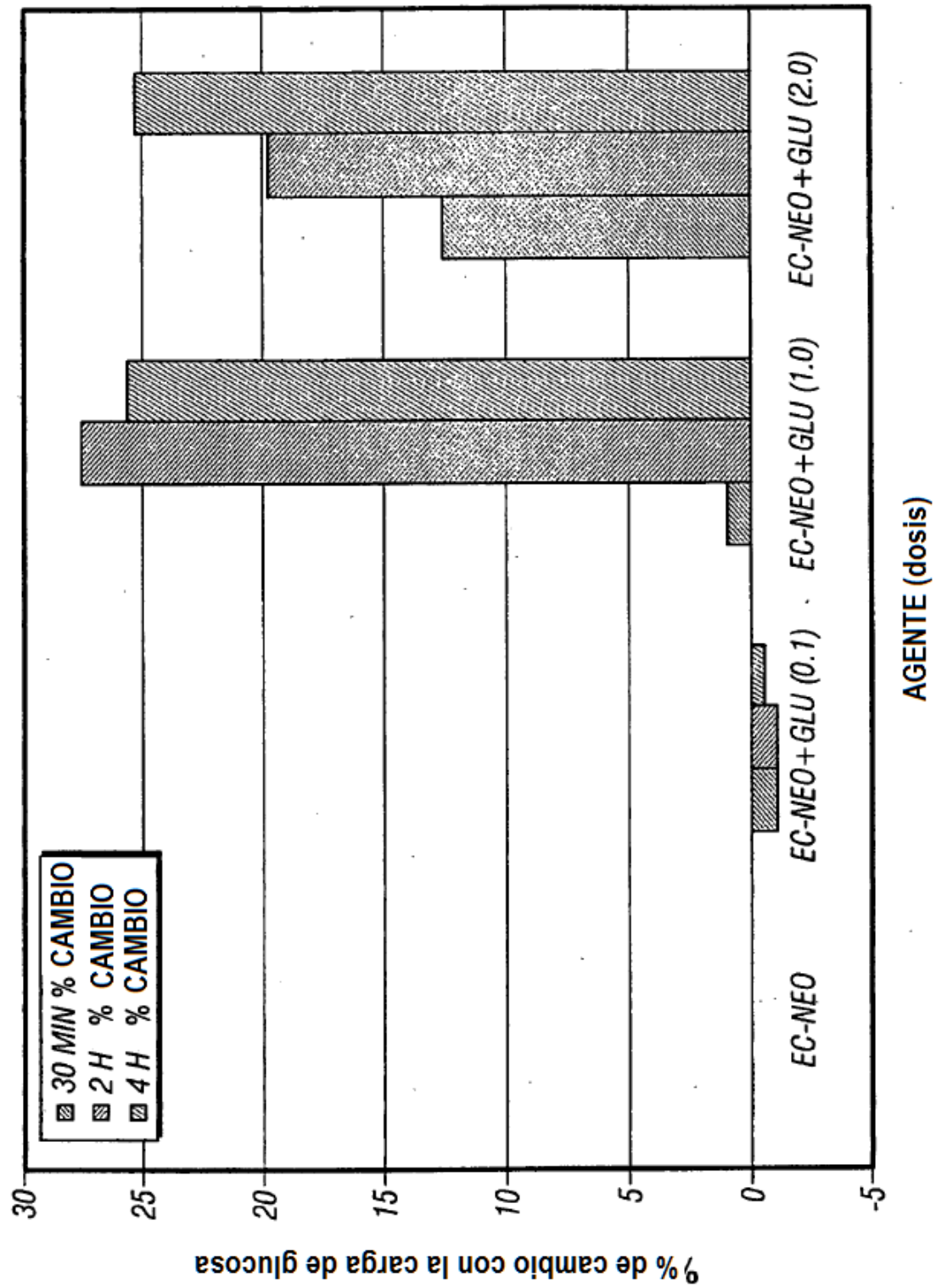


Figura 48B

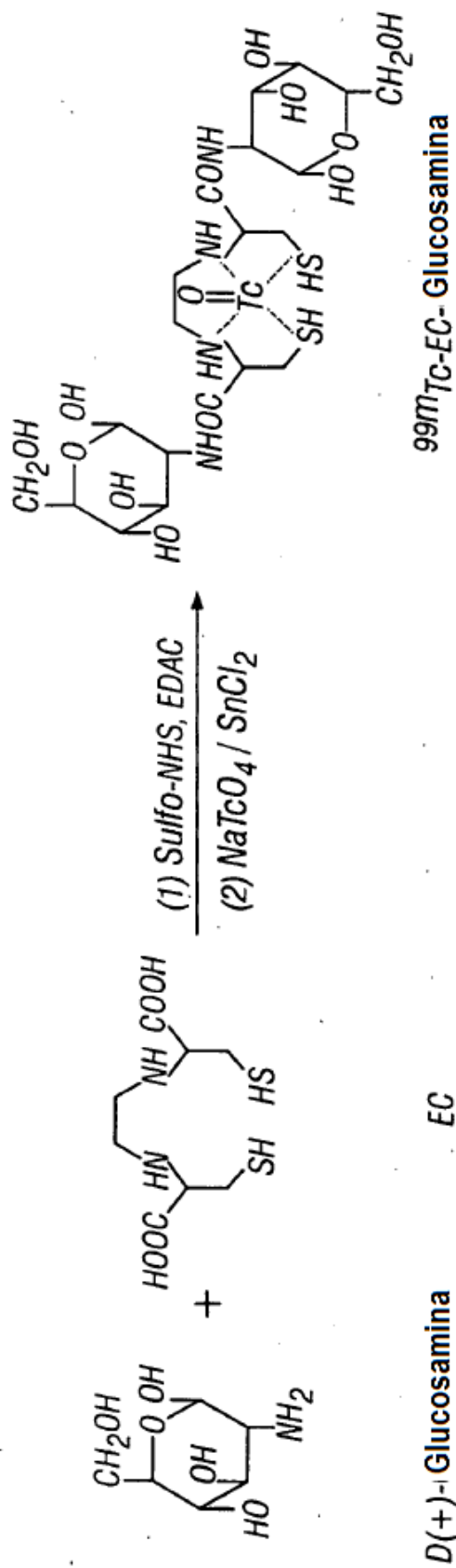


Figura 49

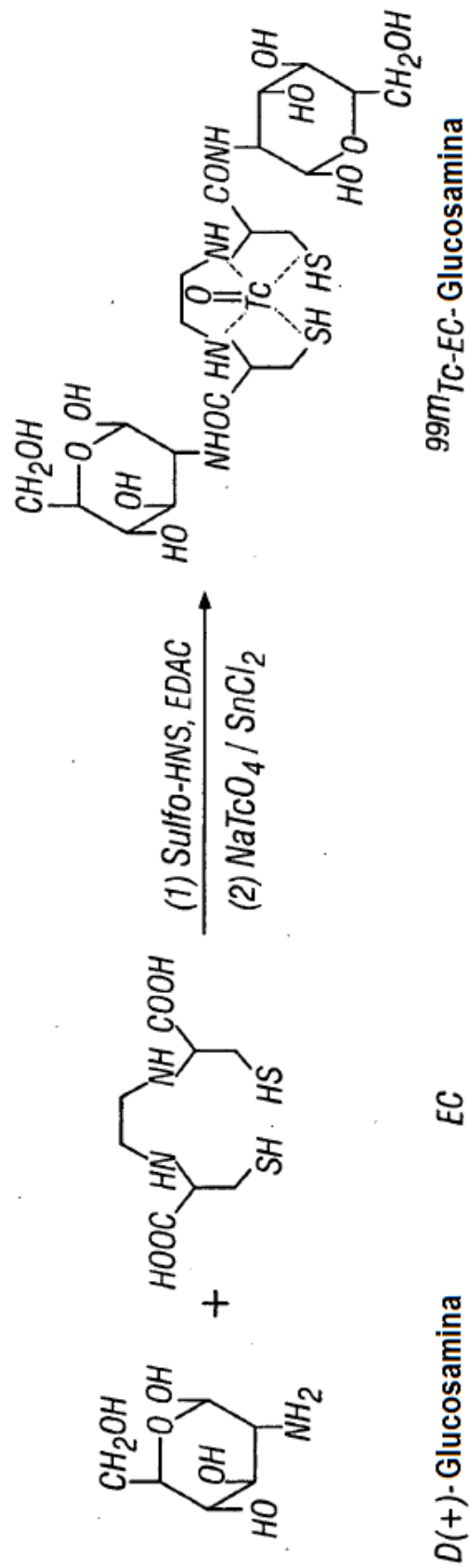


Figura 59

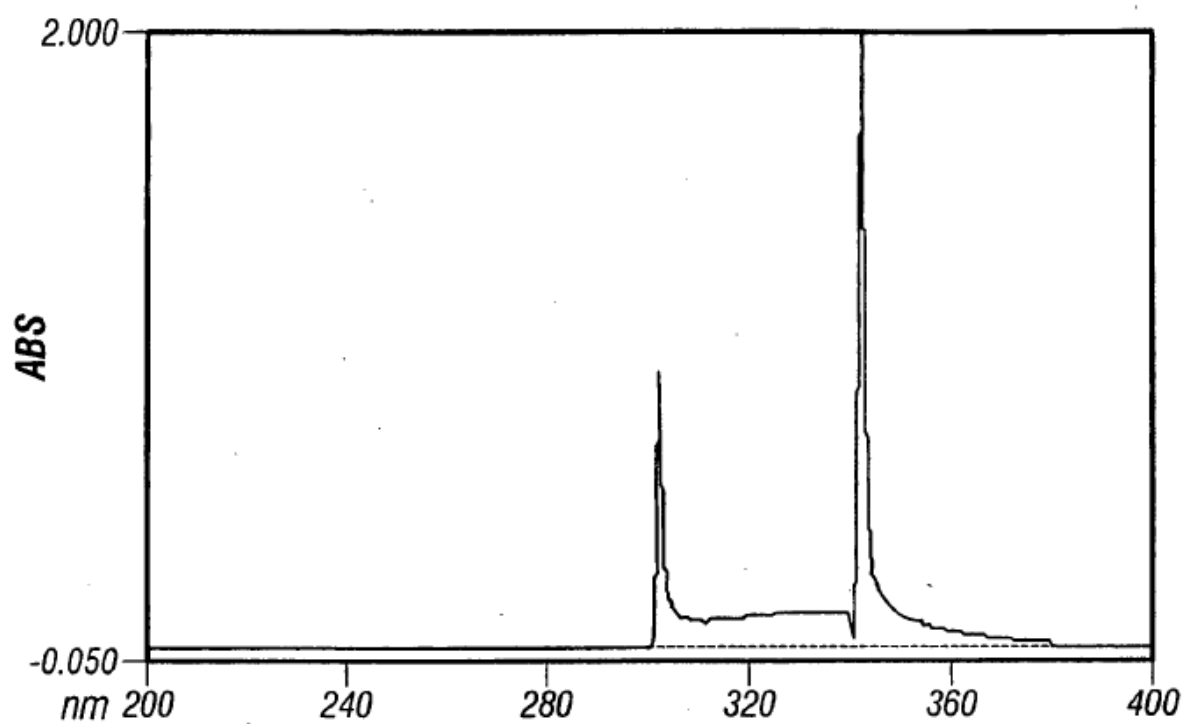


Figura 50

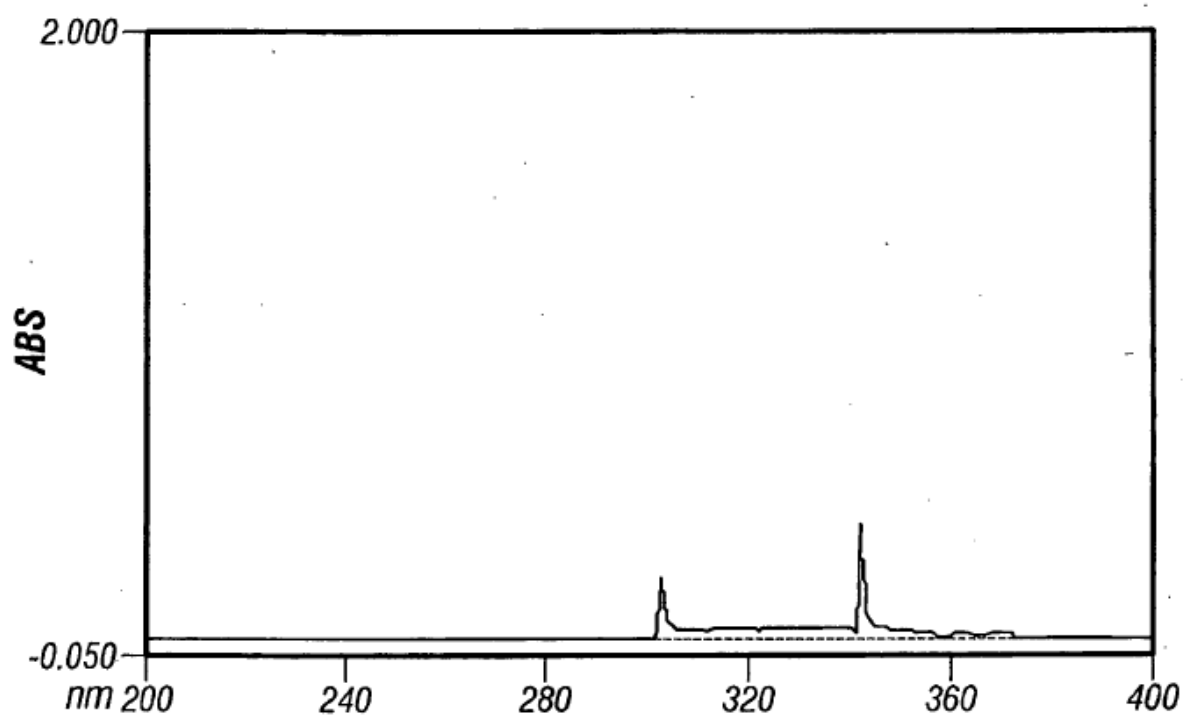


Figura 51

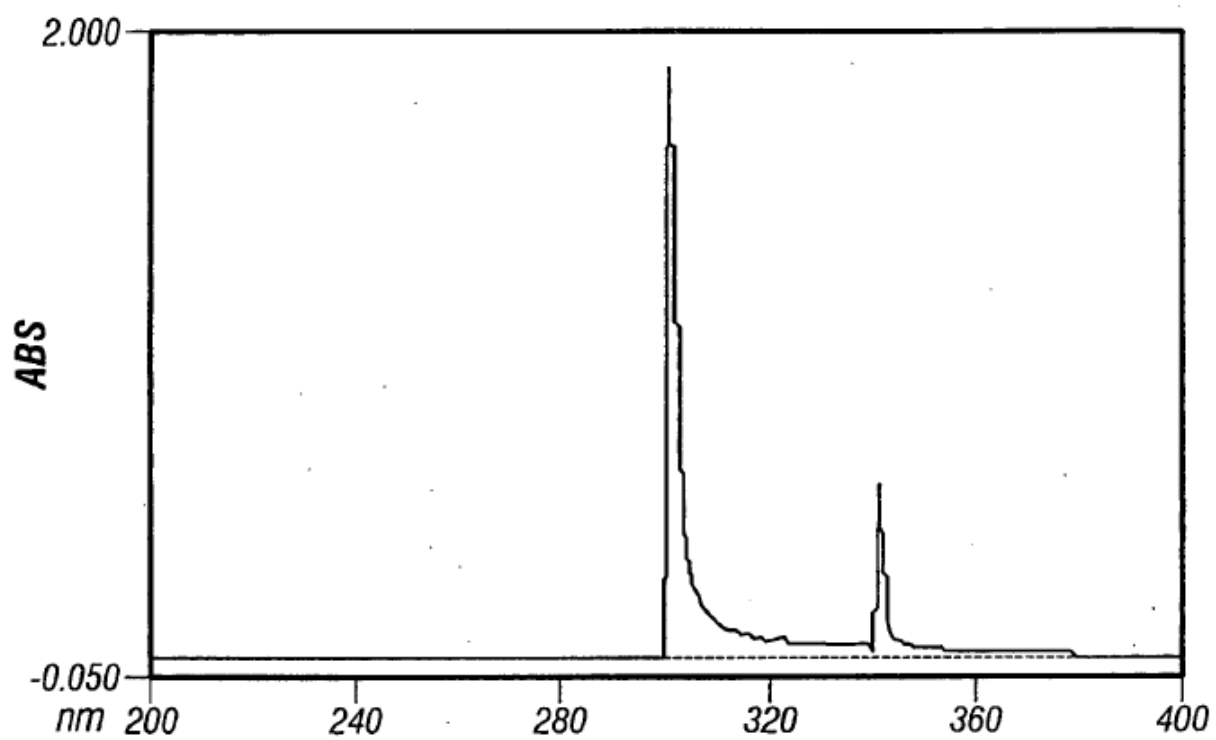


Figura 52

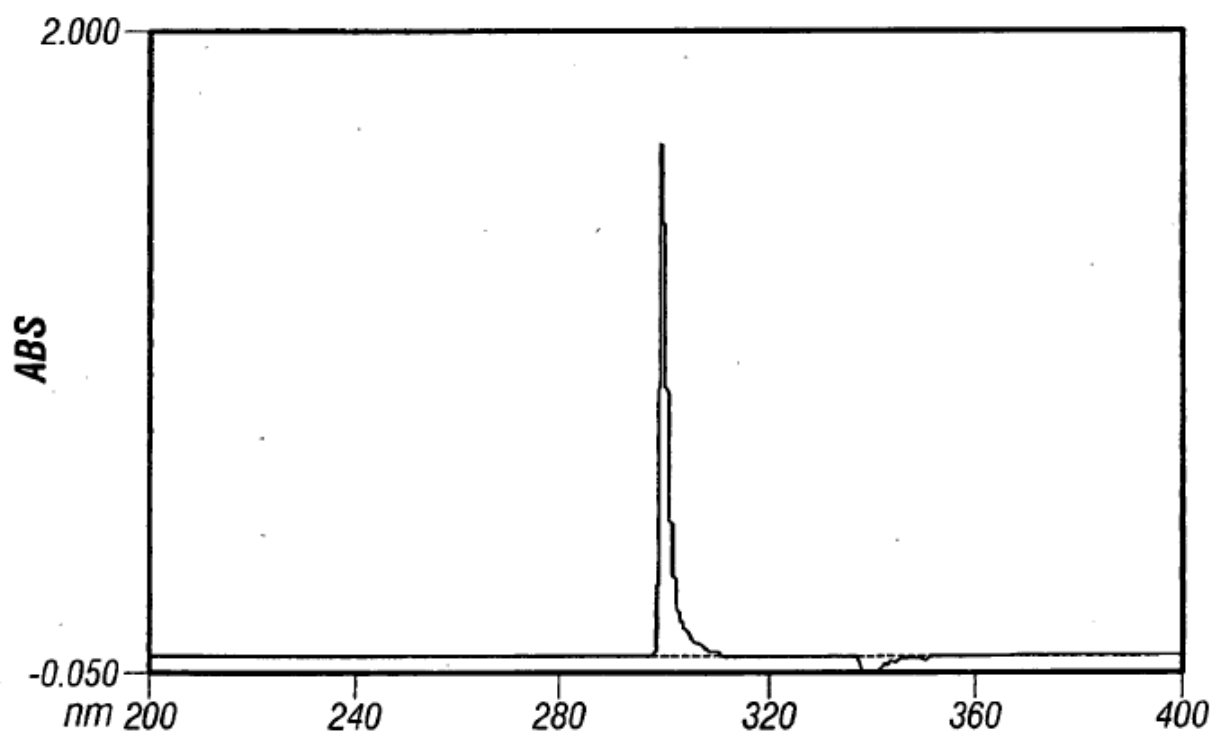
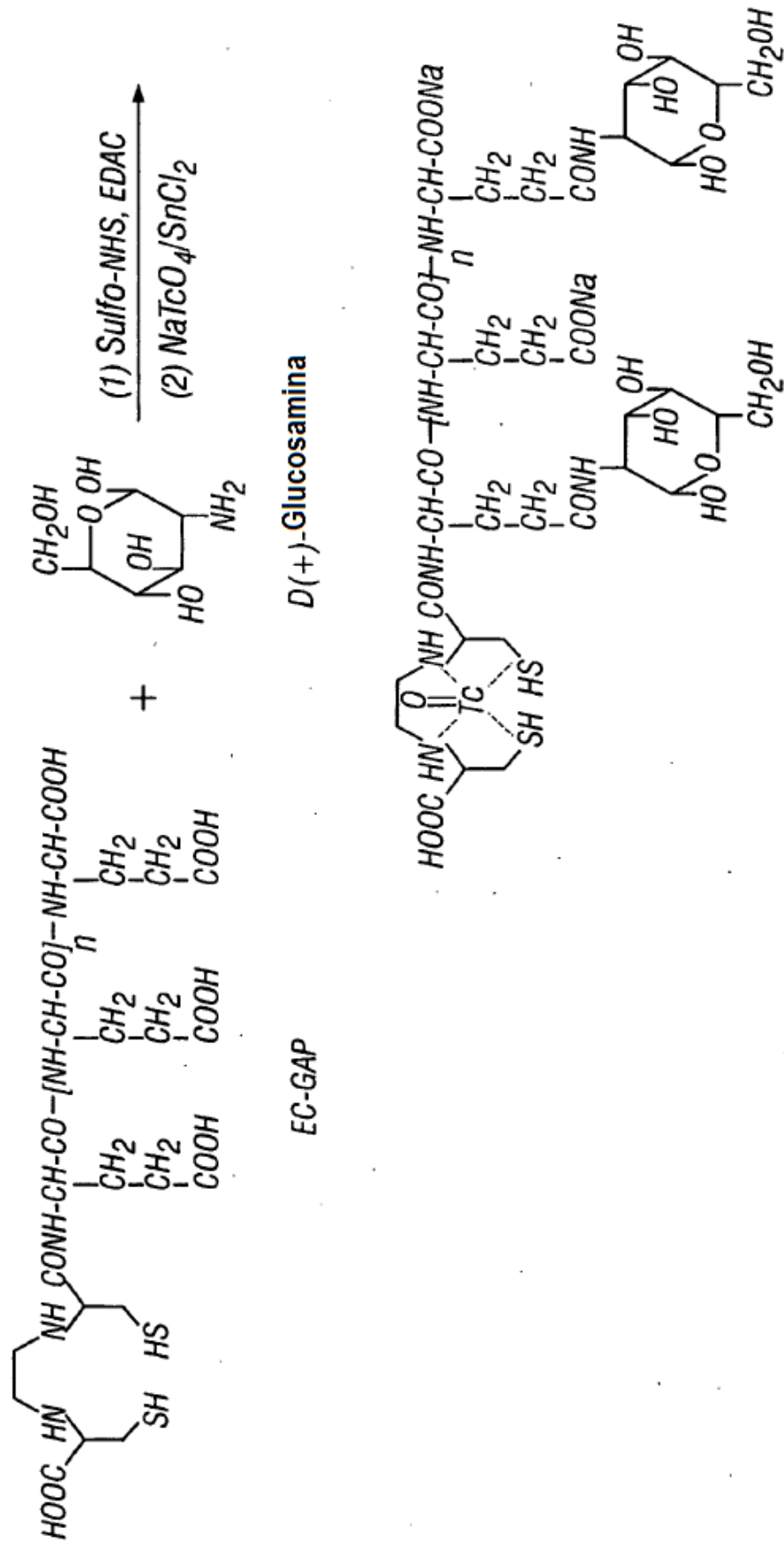


Figura 53



**$^{99m}\text{Tc-EC-GAP-Glucosamina}$**

### Figura 54

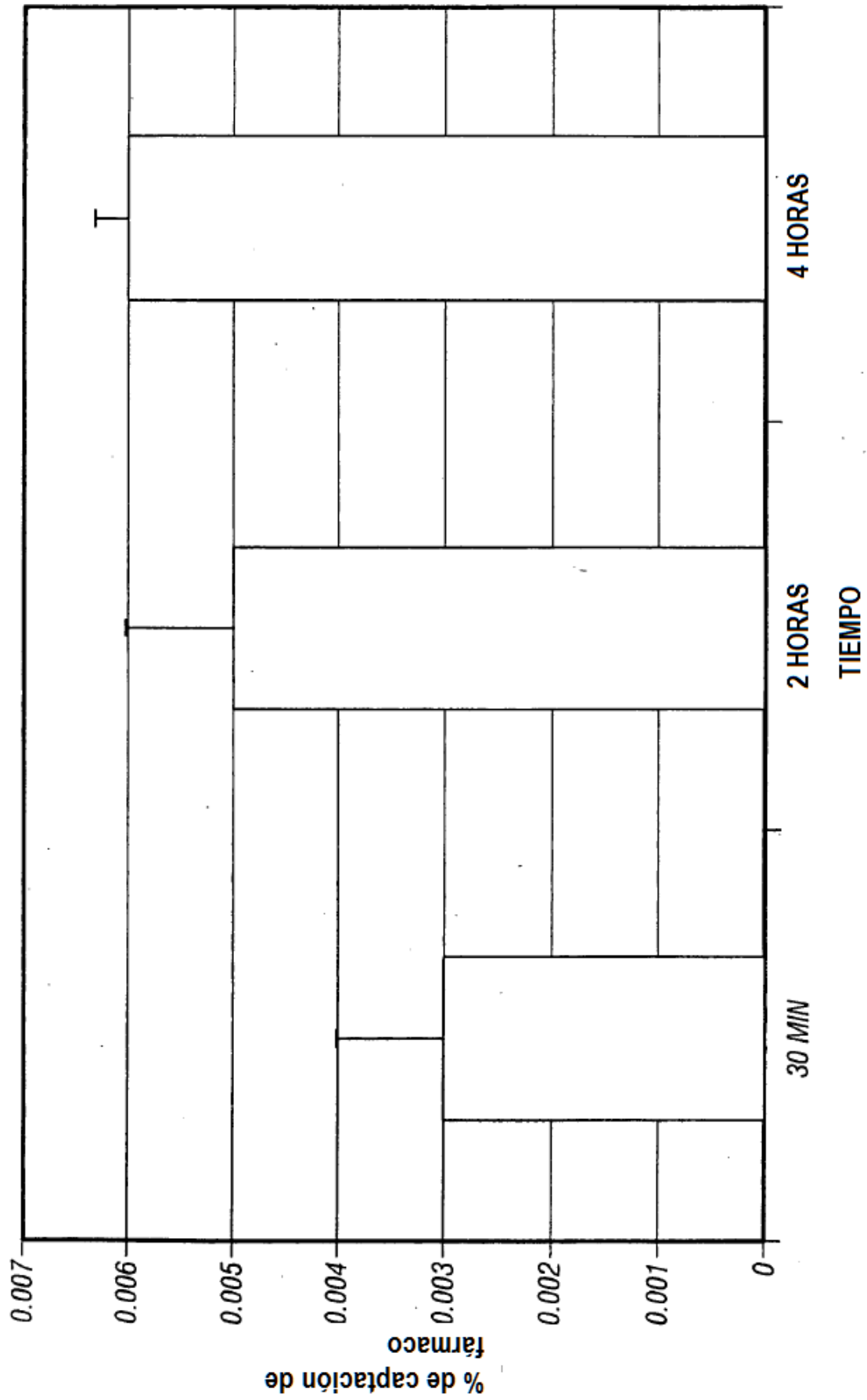


Figura 55A

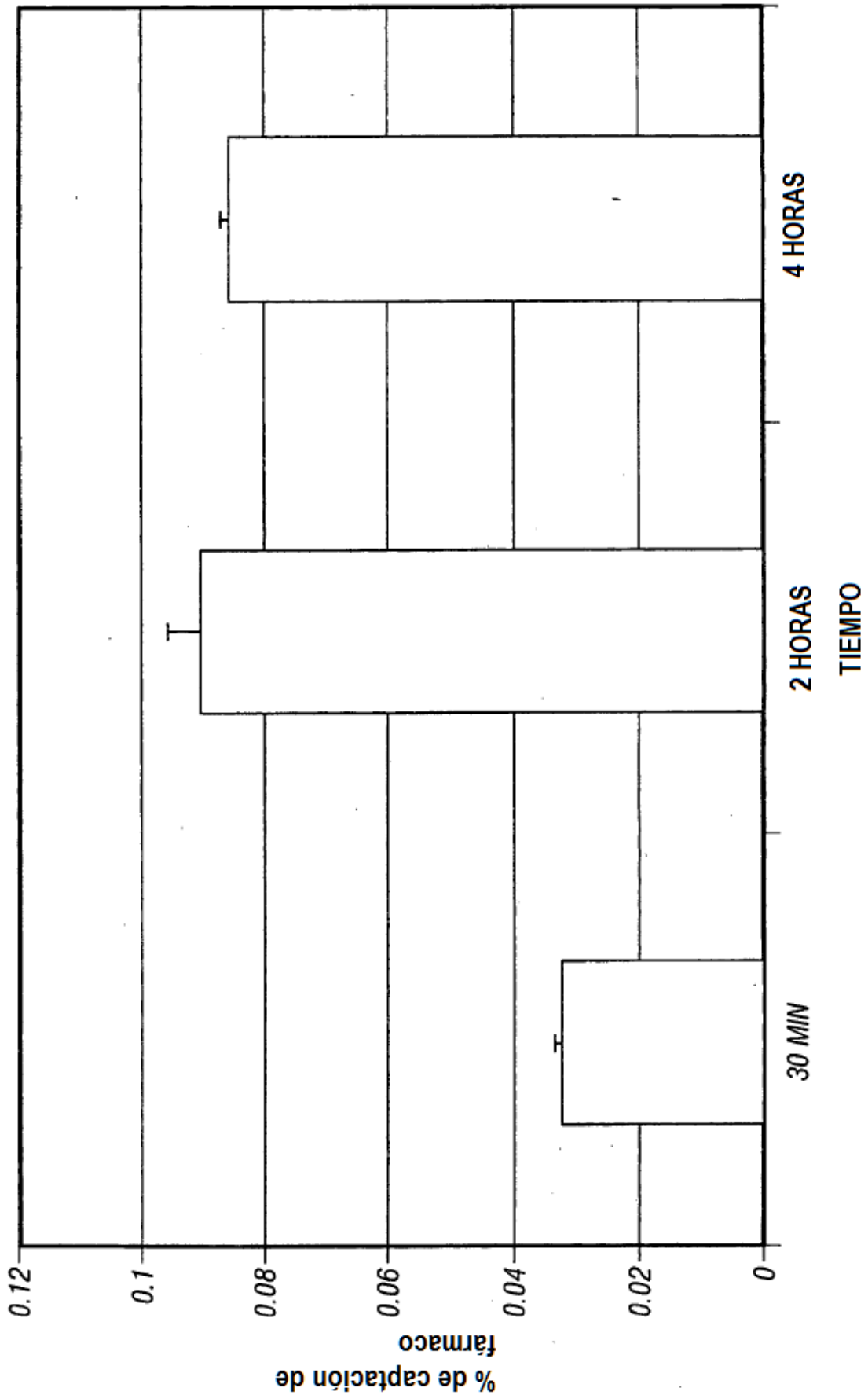
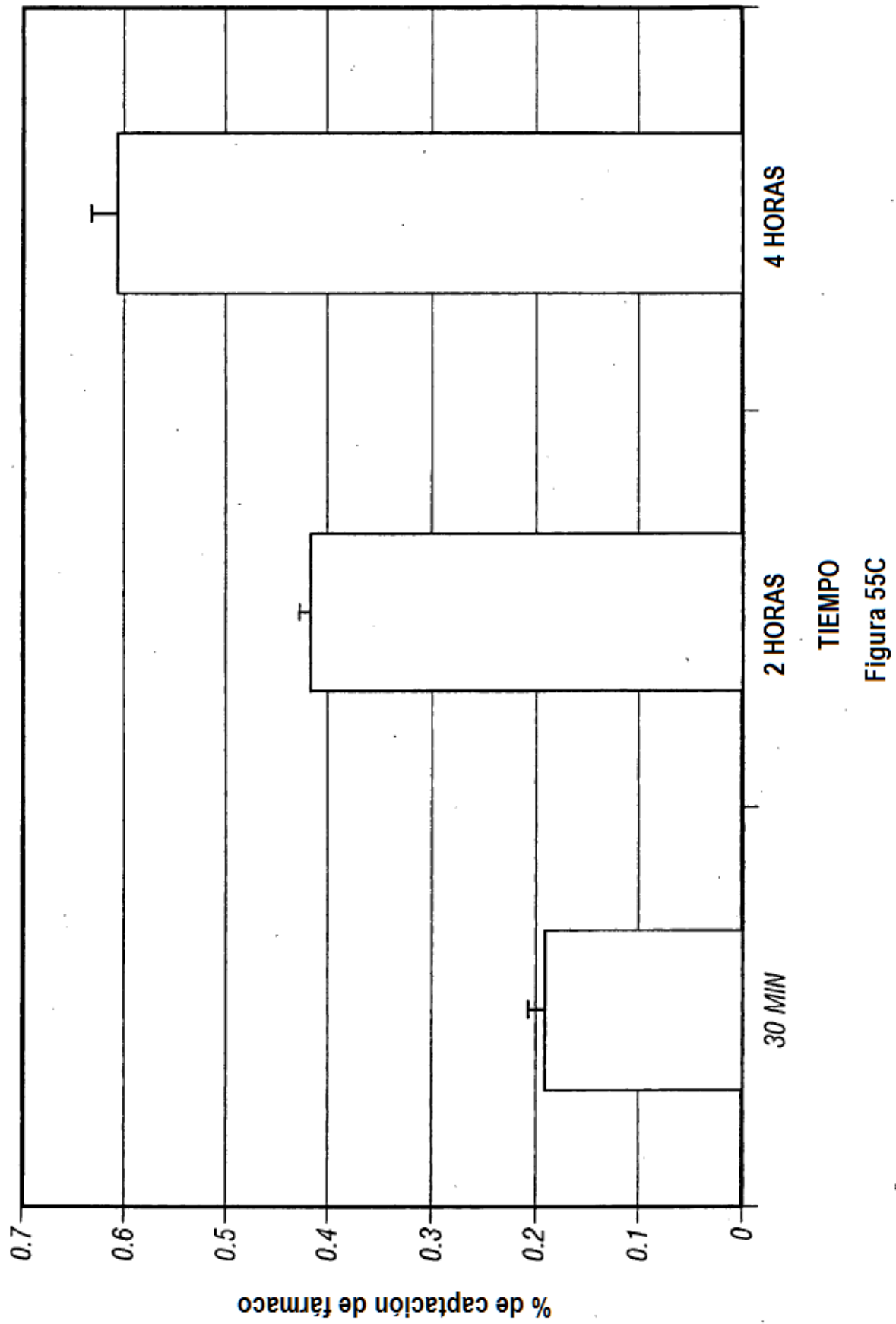
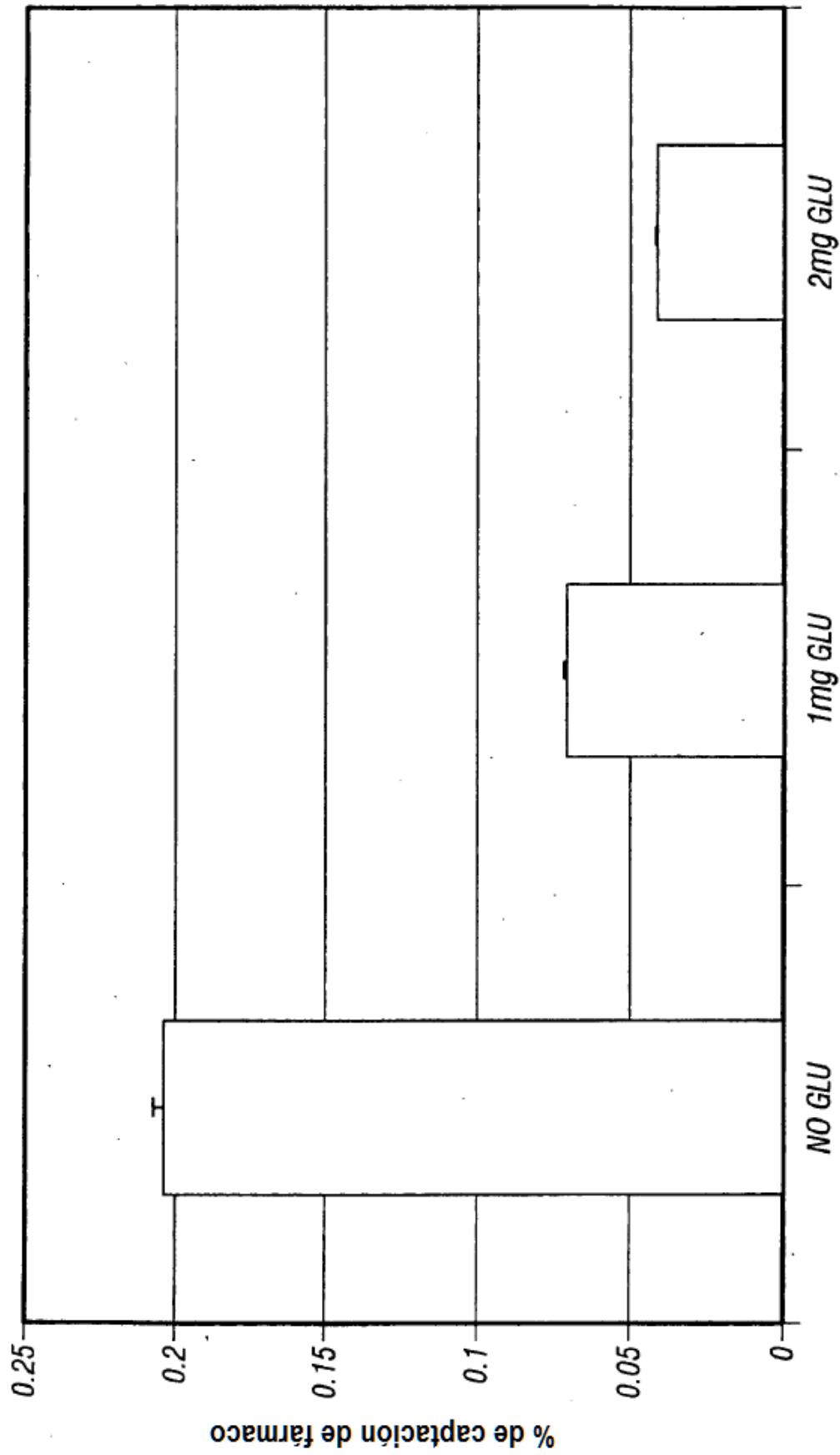


Figura 55B







DOSIS DE GLUCOSA

Figura 57

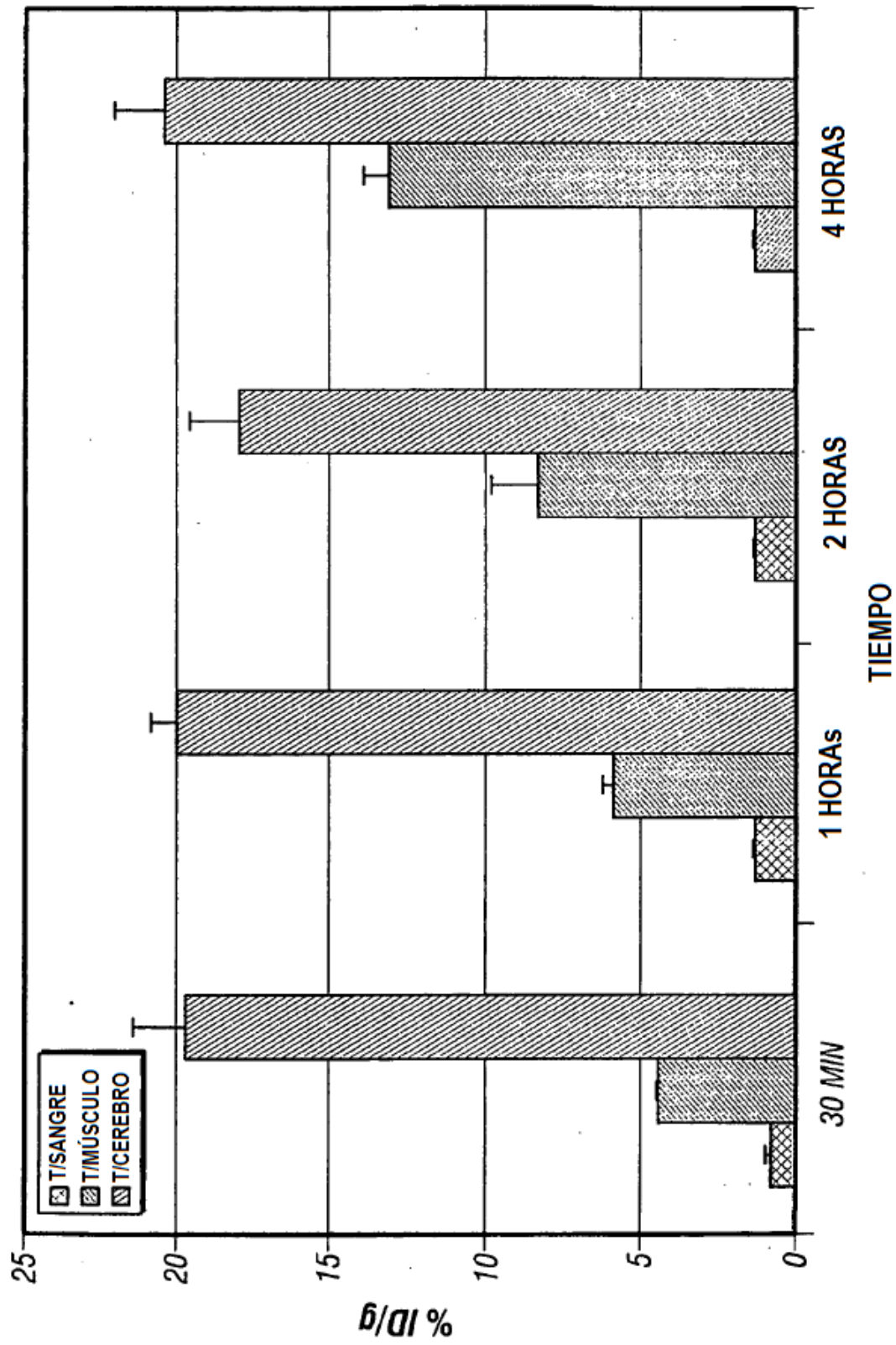


Figura 58

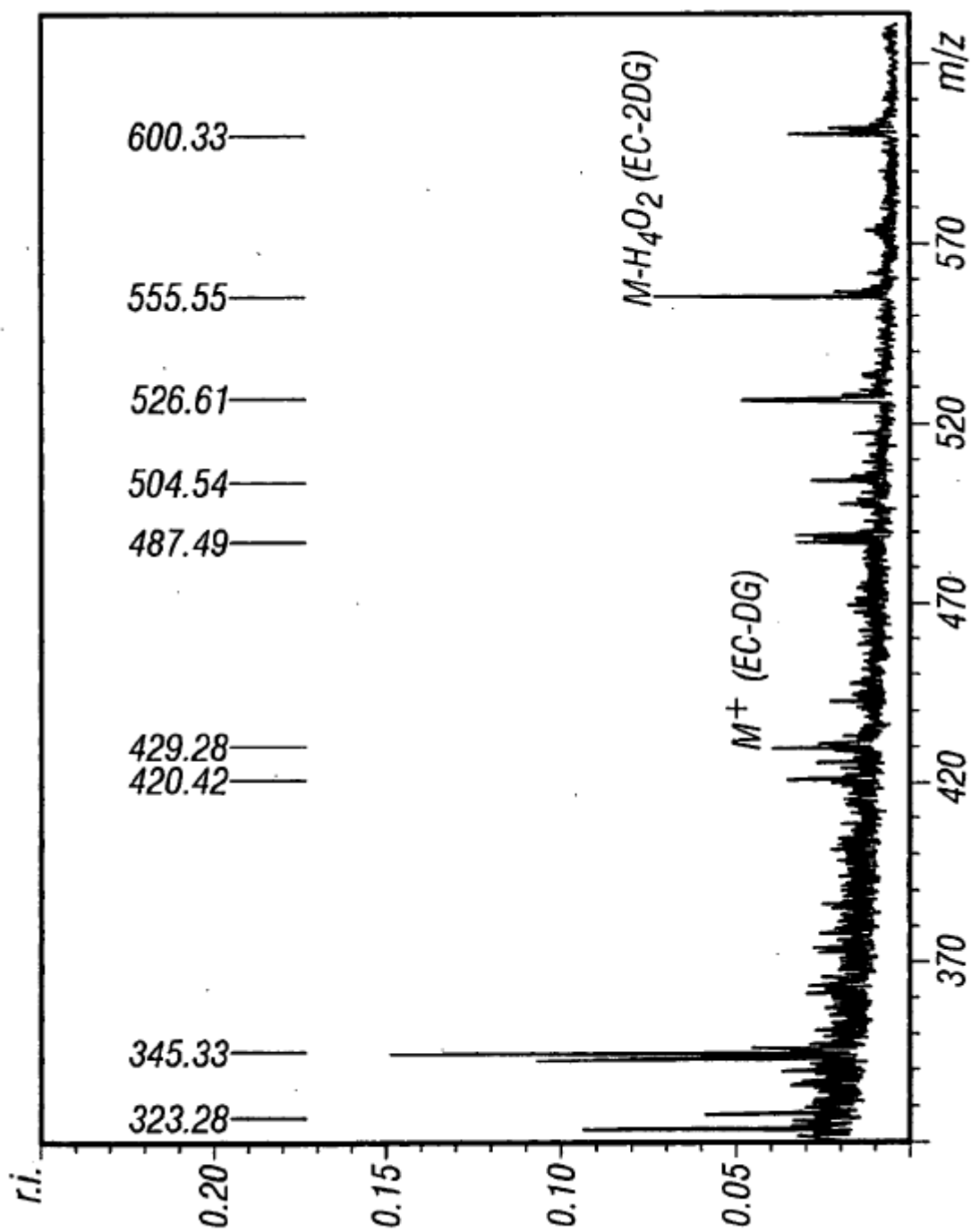


Figura 60

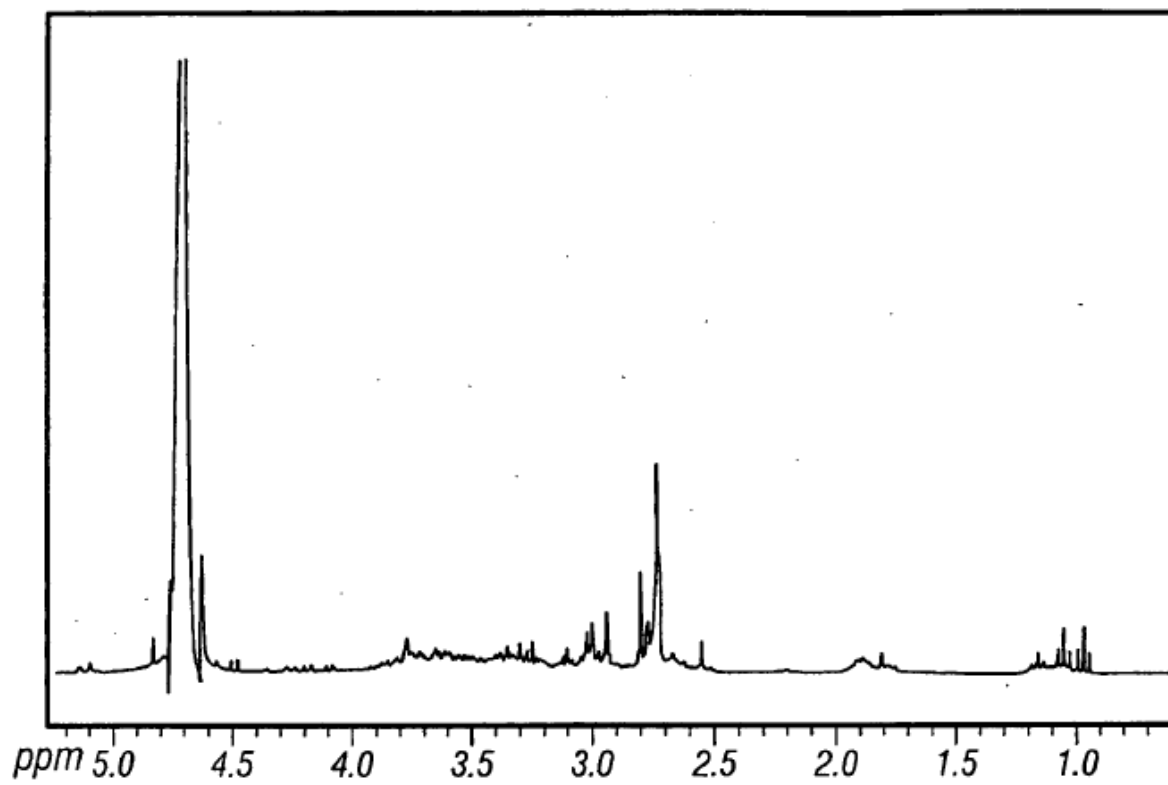


Figura 61

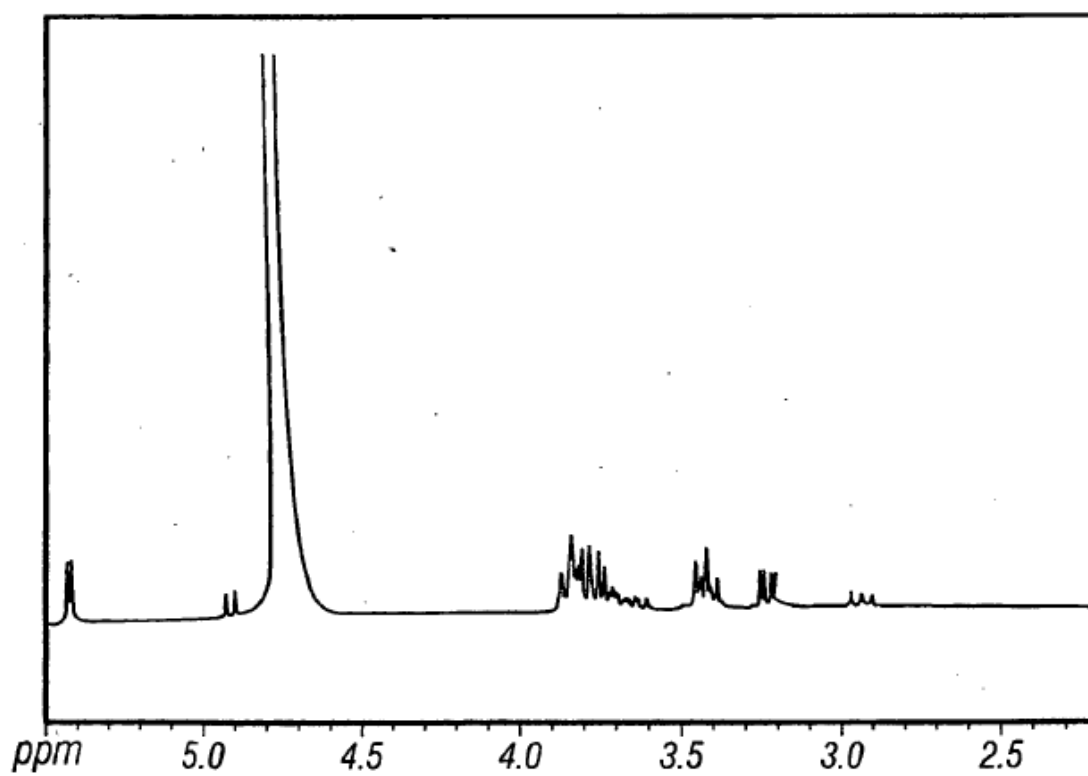


Figura 62

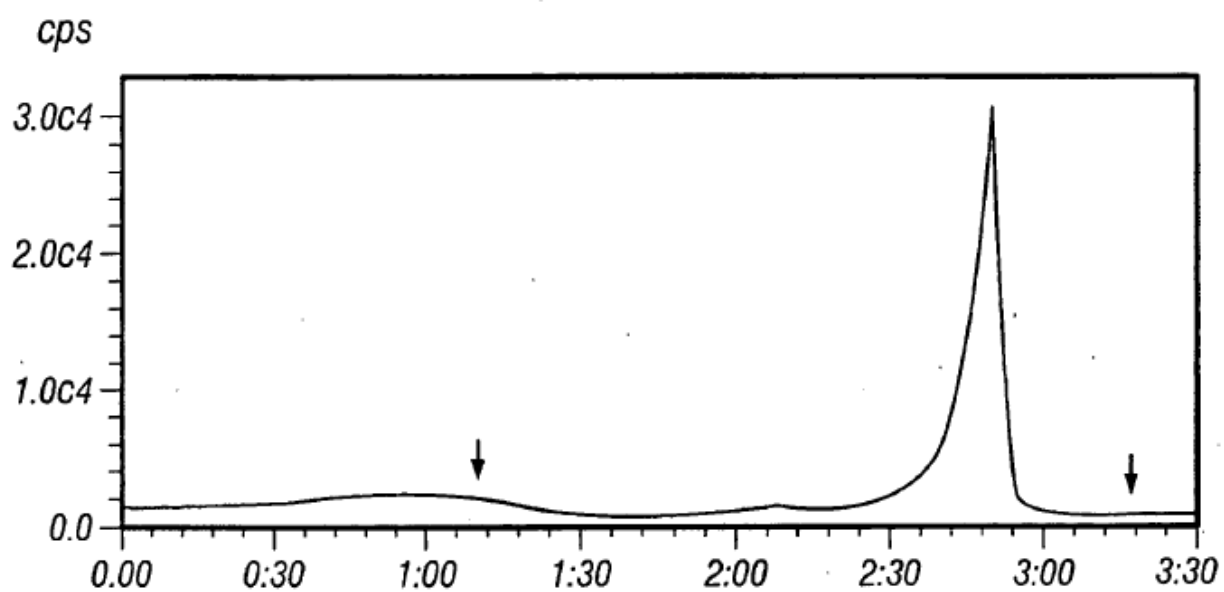


Figura 63

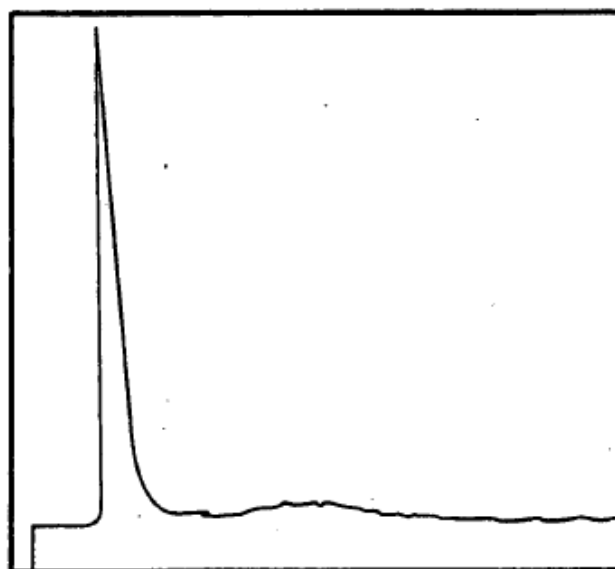
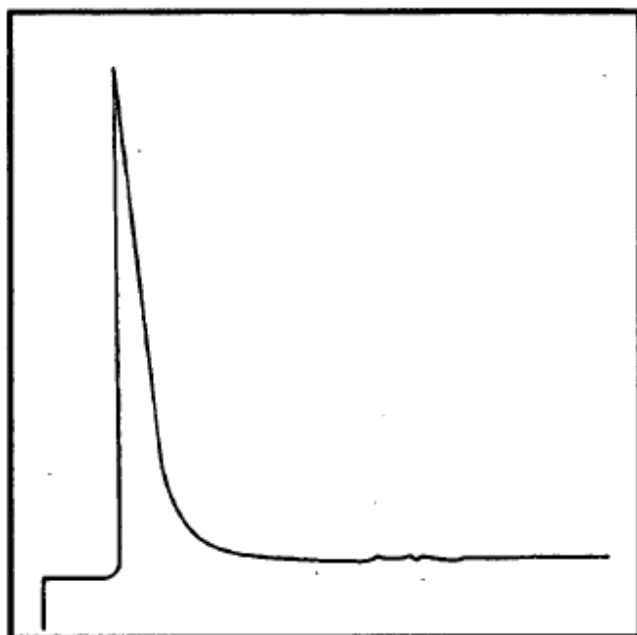
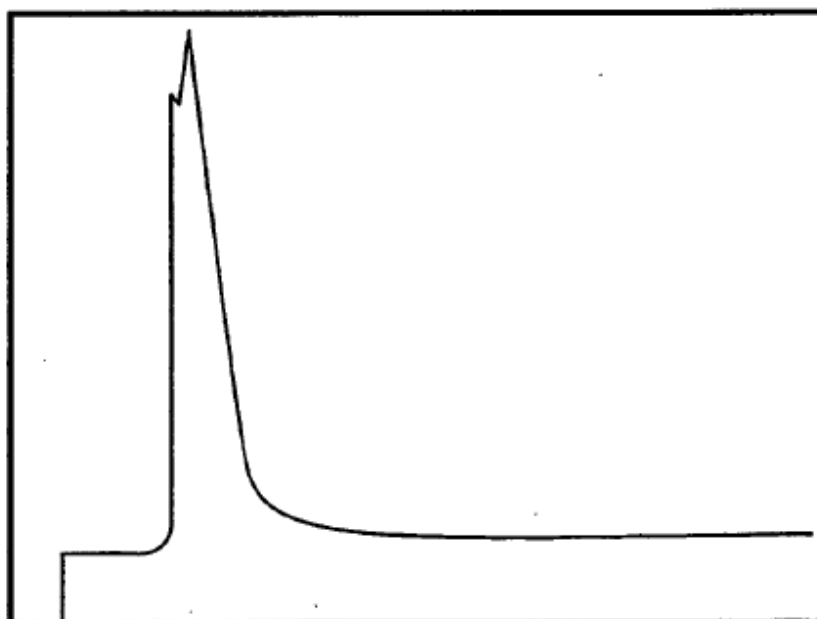


Figura 64A



**Figura 64B**



**Figura 65**

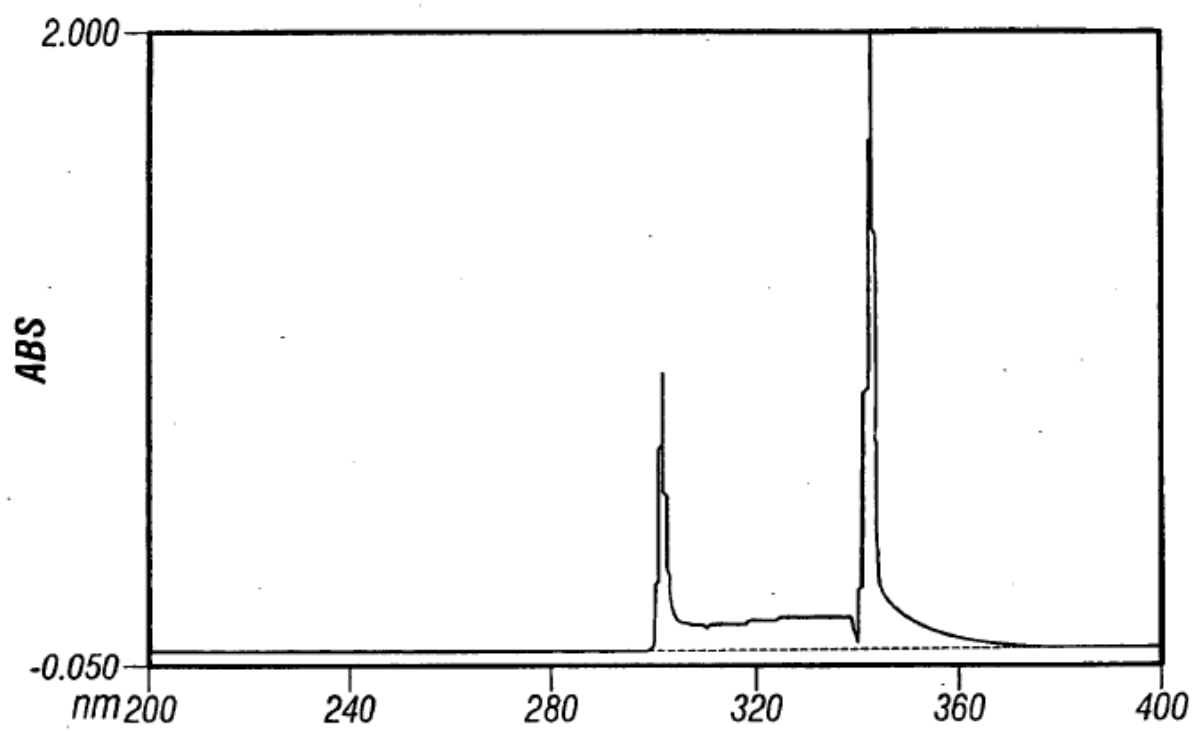


Figura 66



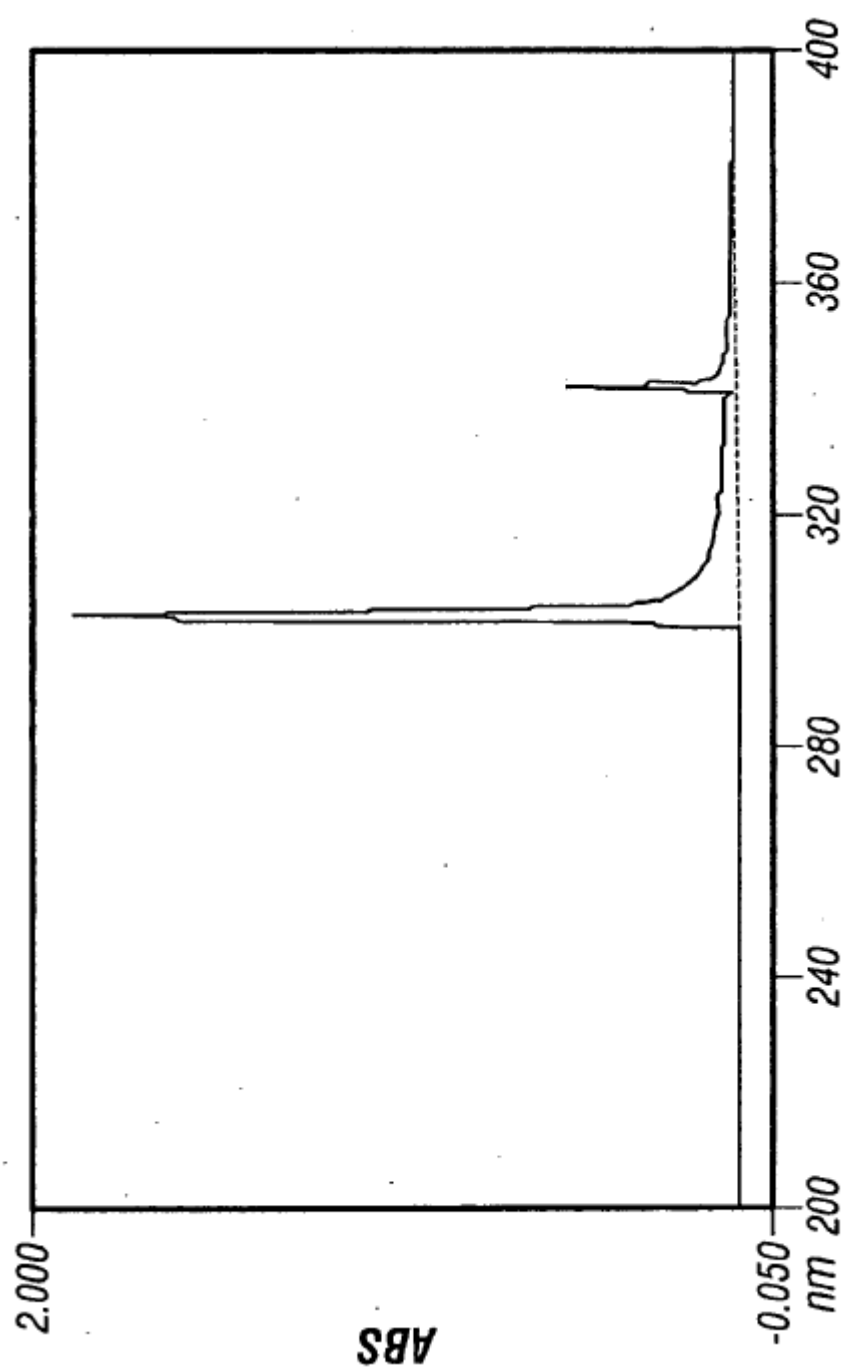
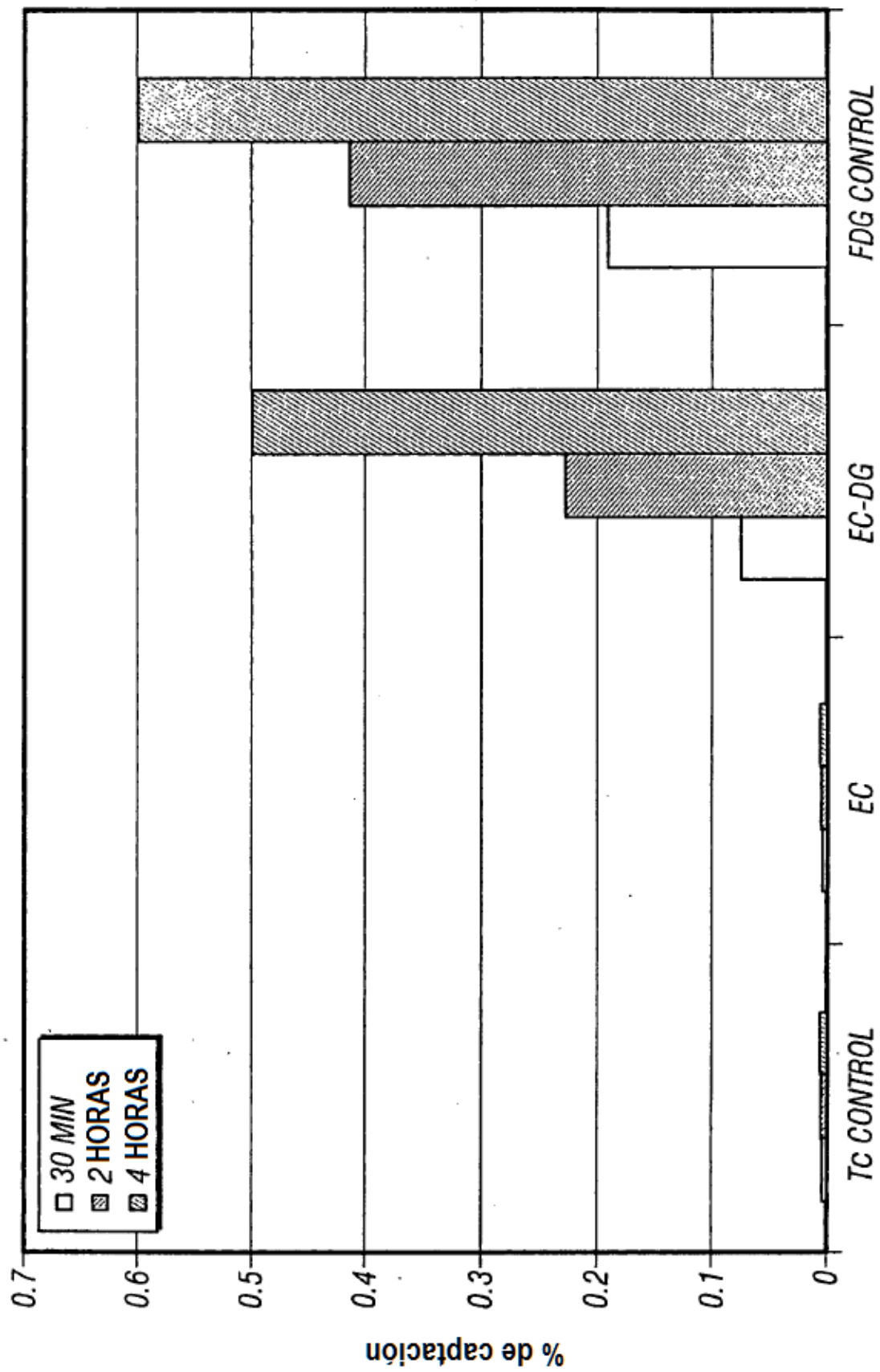


Figura 68



AGENTES

Figura 69

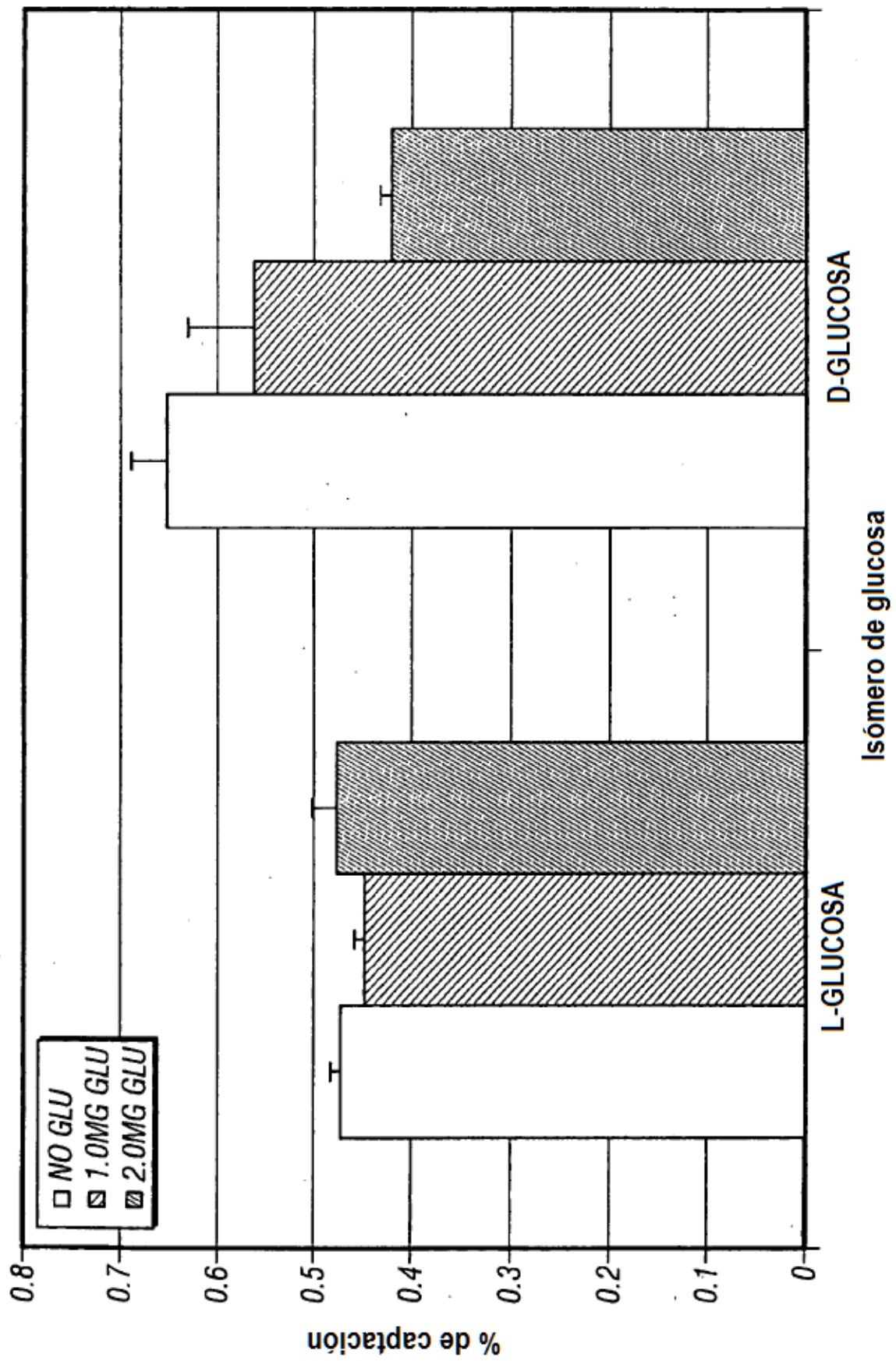


Figura 70

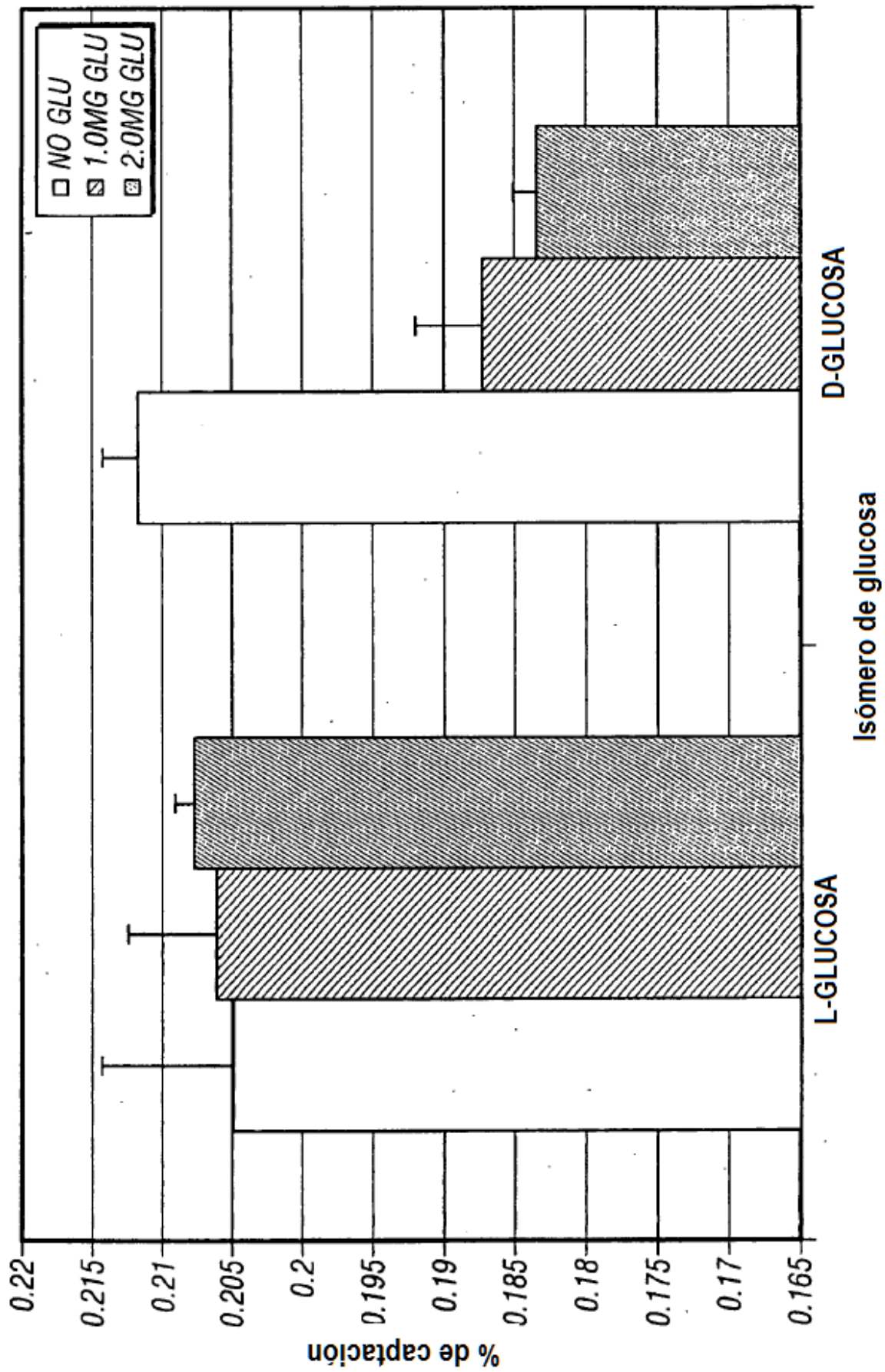


Figura 73

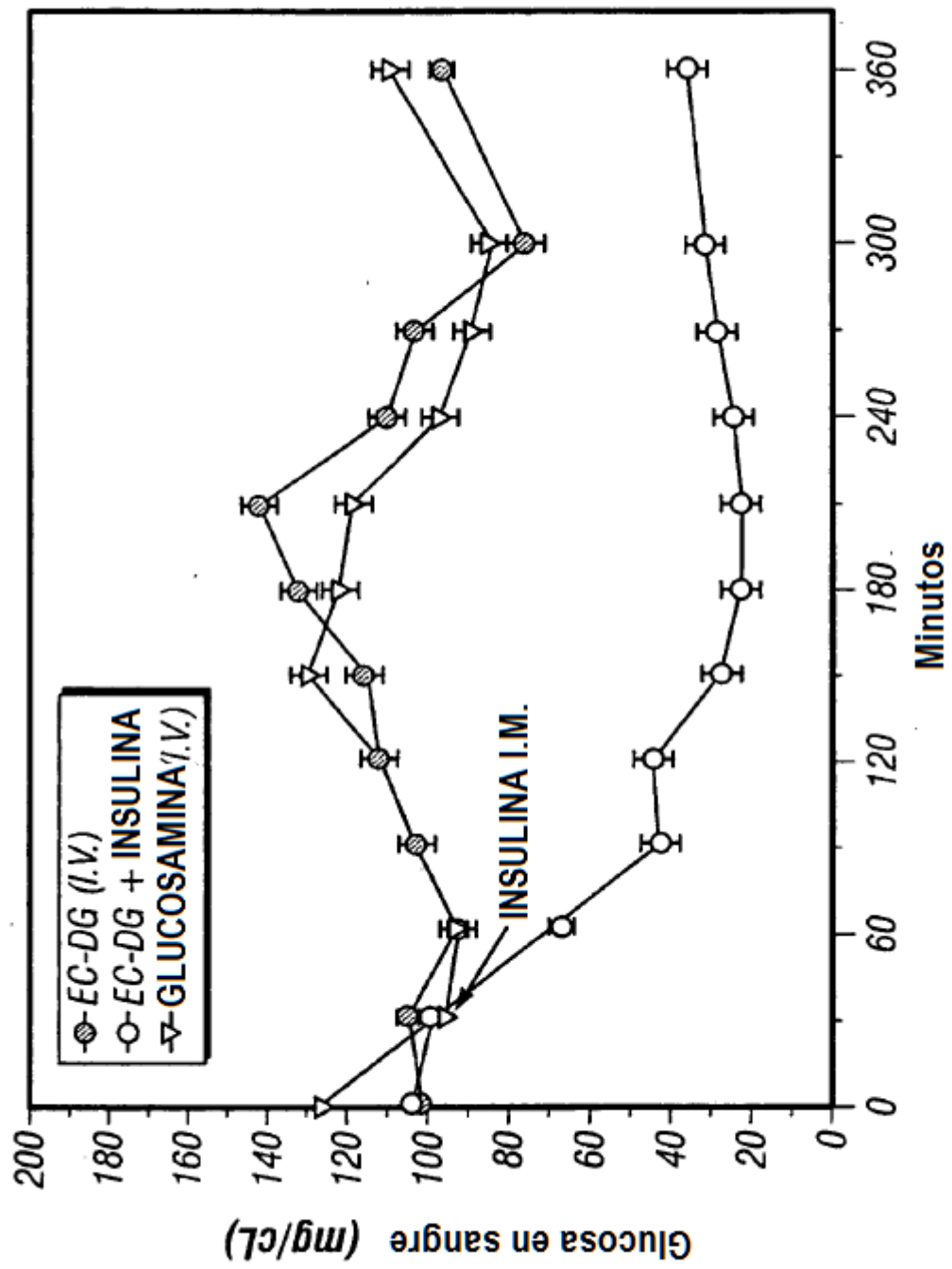
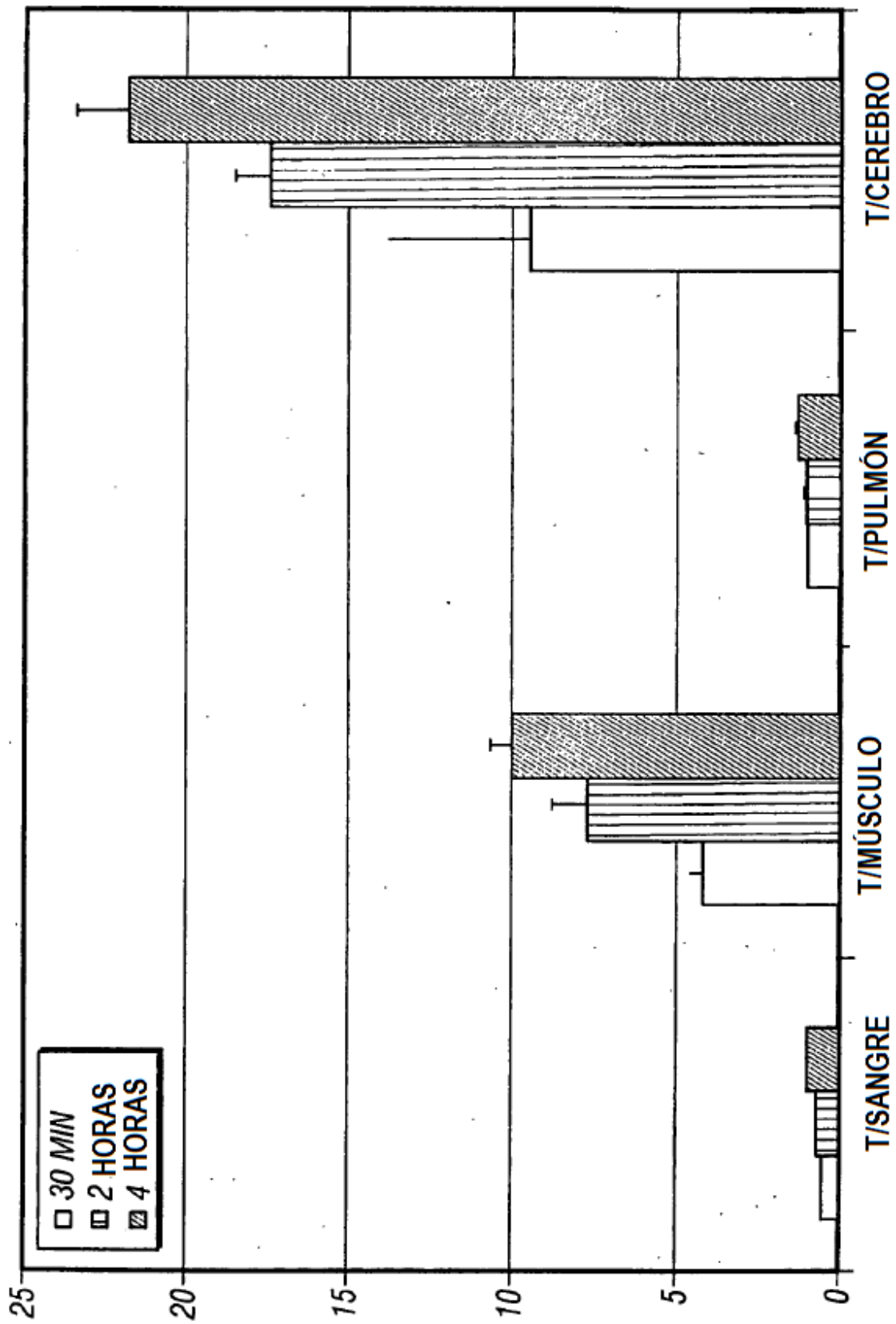


Figura 74



*T = Tumor*

Figura 76



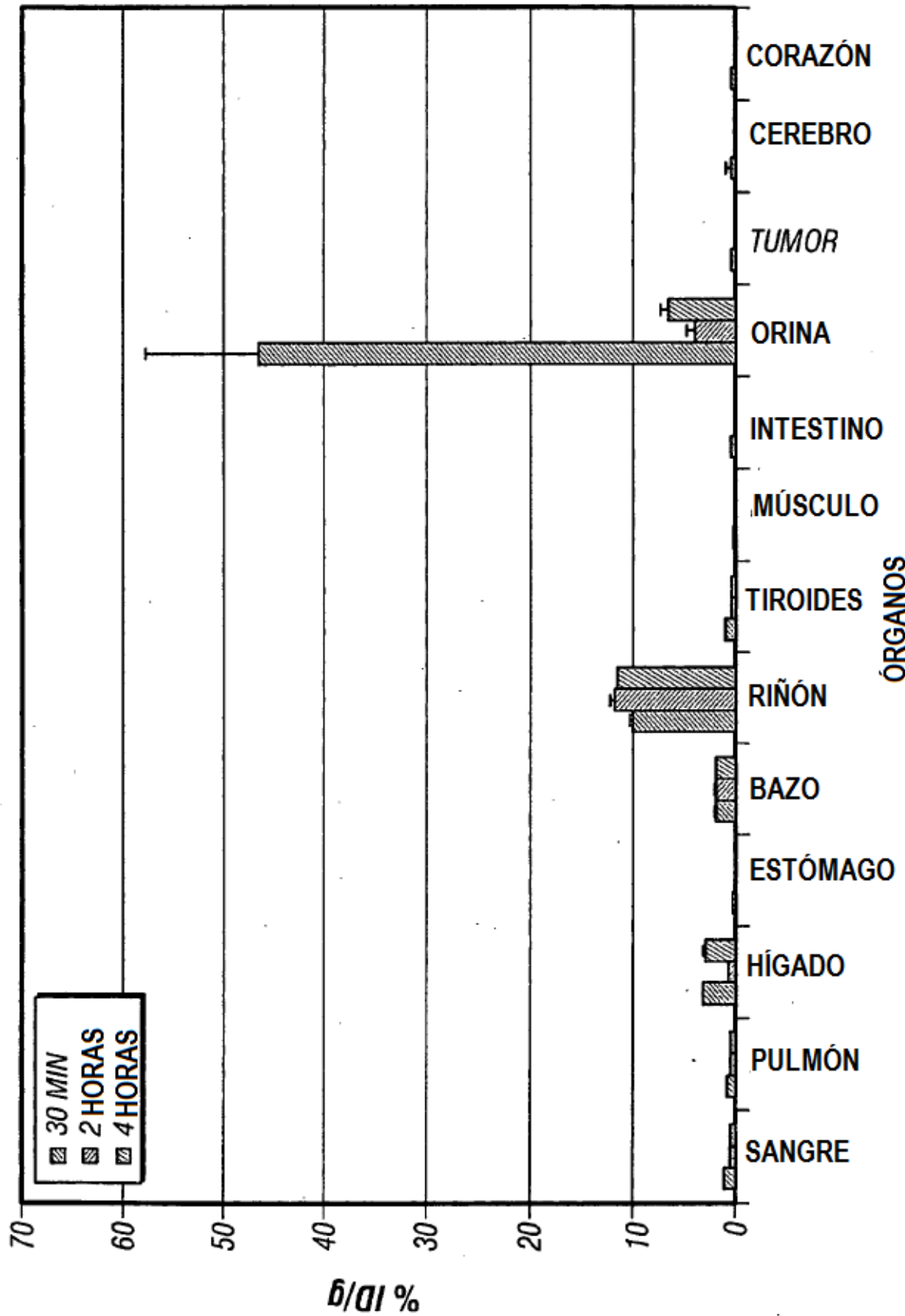


Figura 77

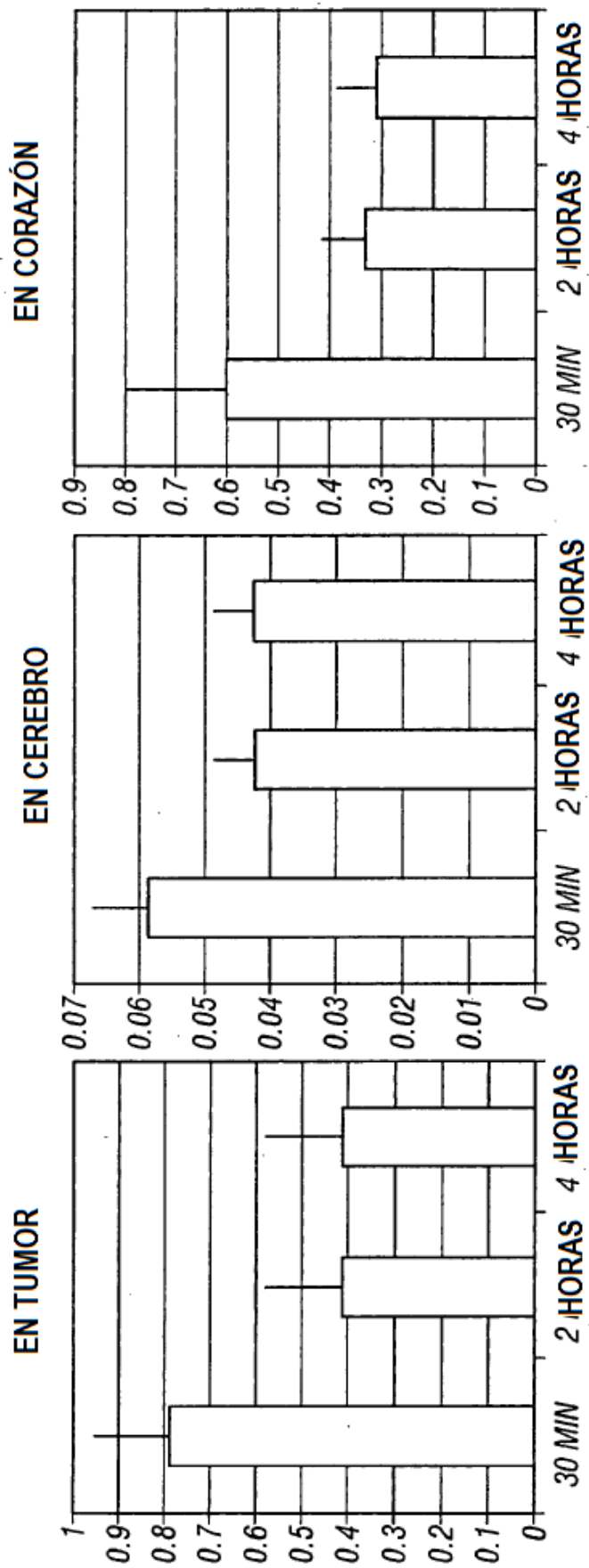


Figura 78



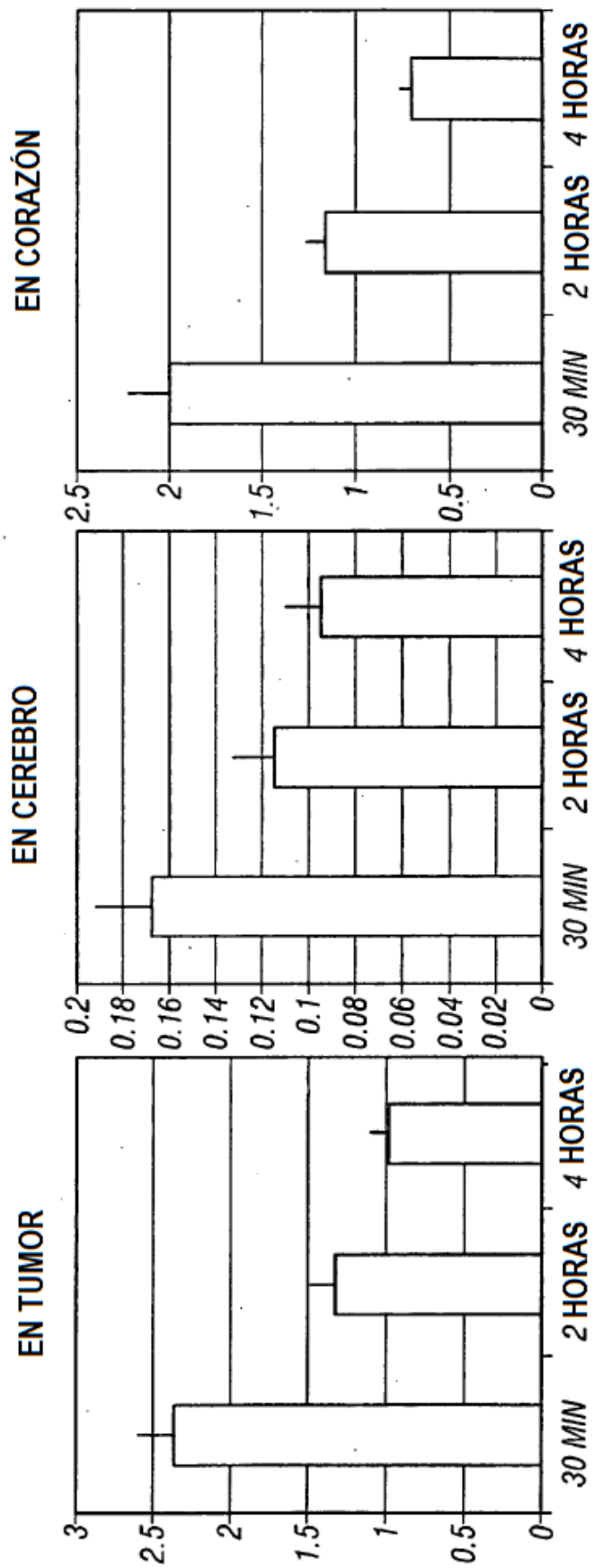


Figura 79

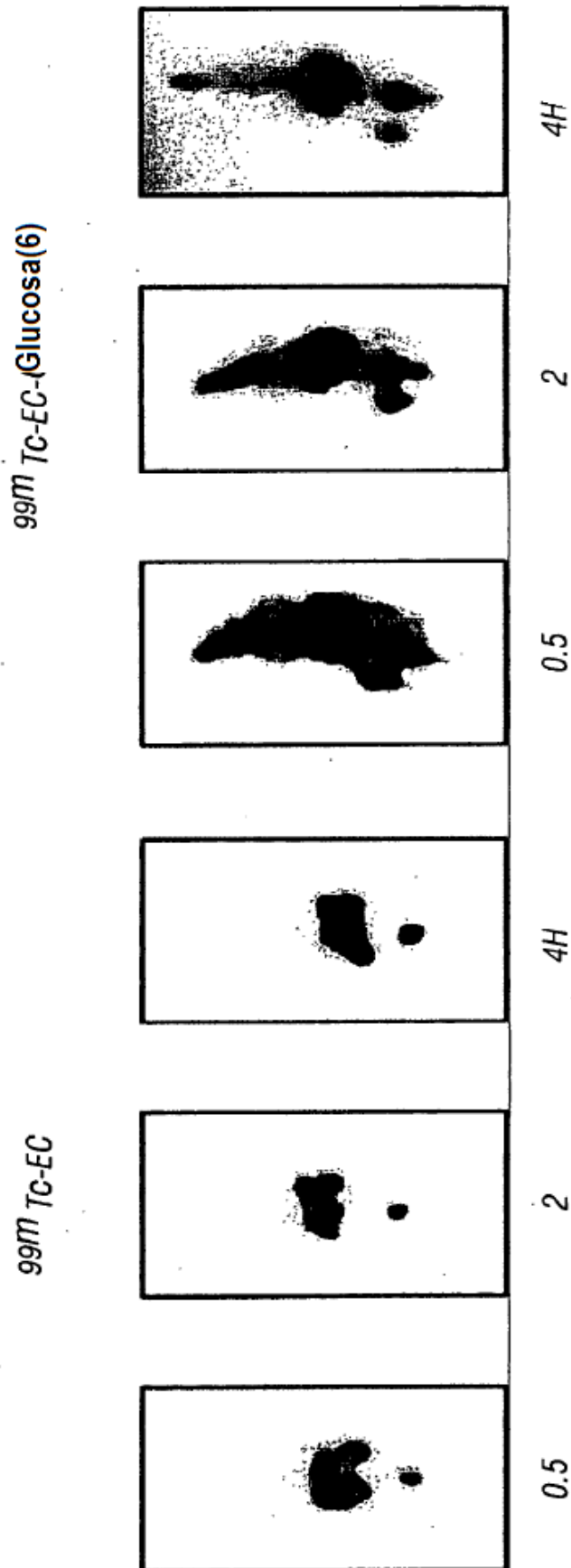
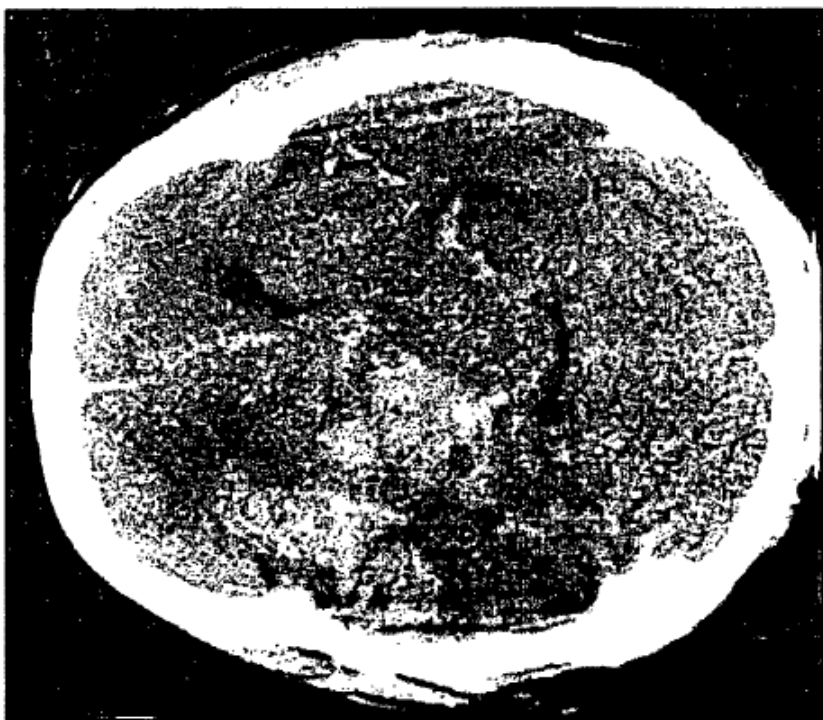


Figura 81



POST OP

Figura 82A



PRE OP

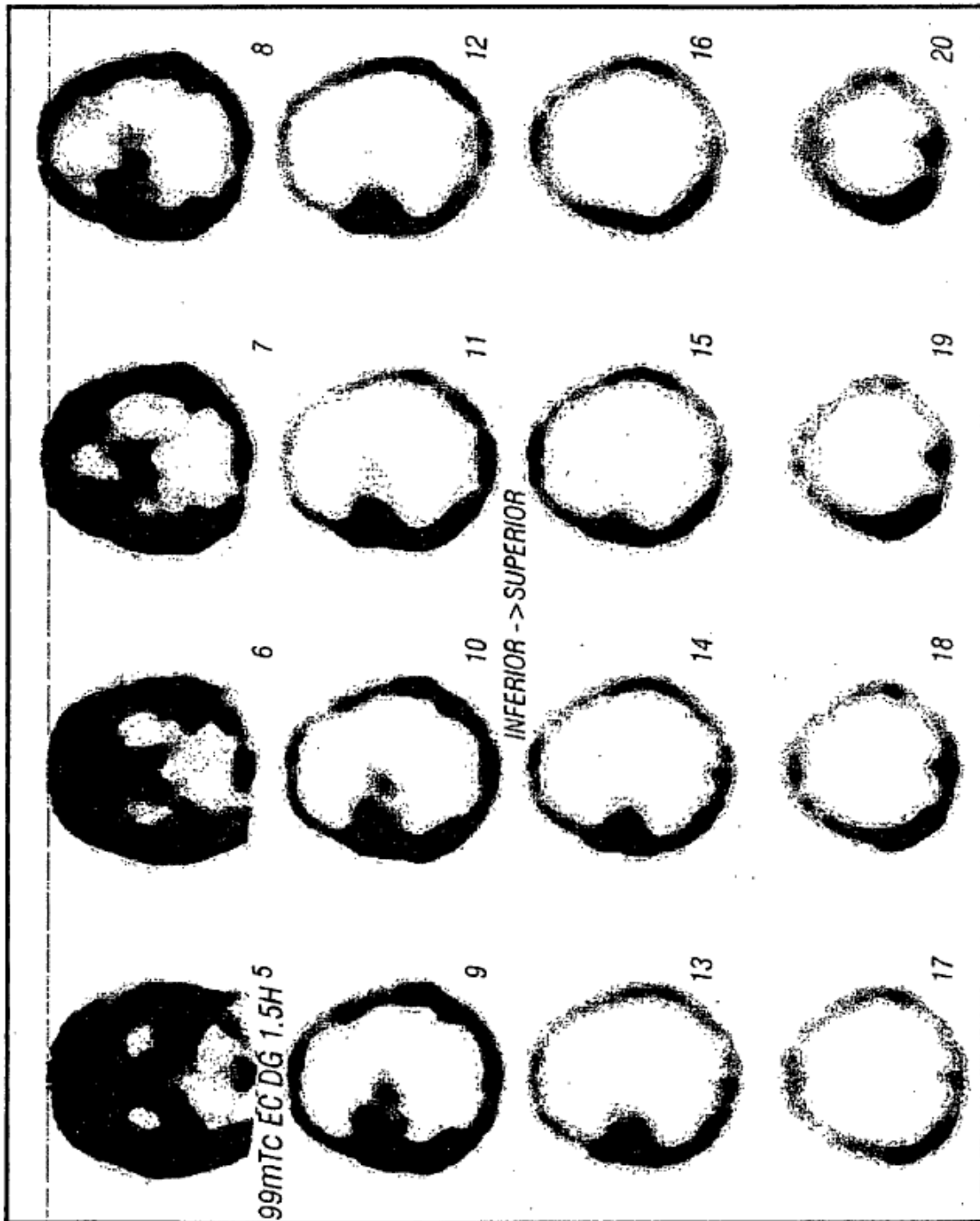


Figura 82B



POST-OP

Figura 83A

PRE-OP

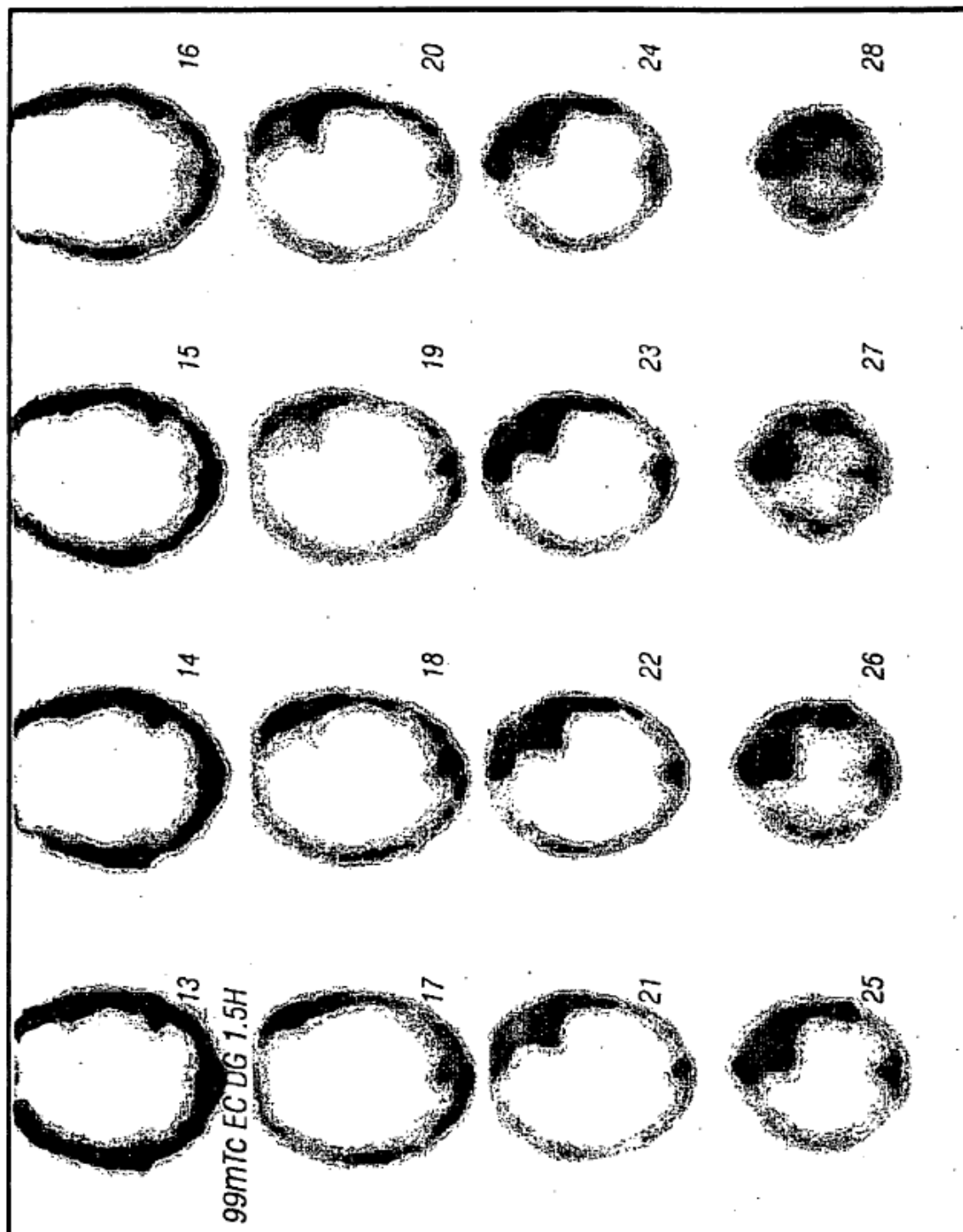


Figura 83B



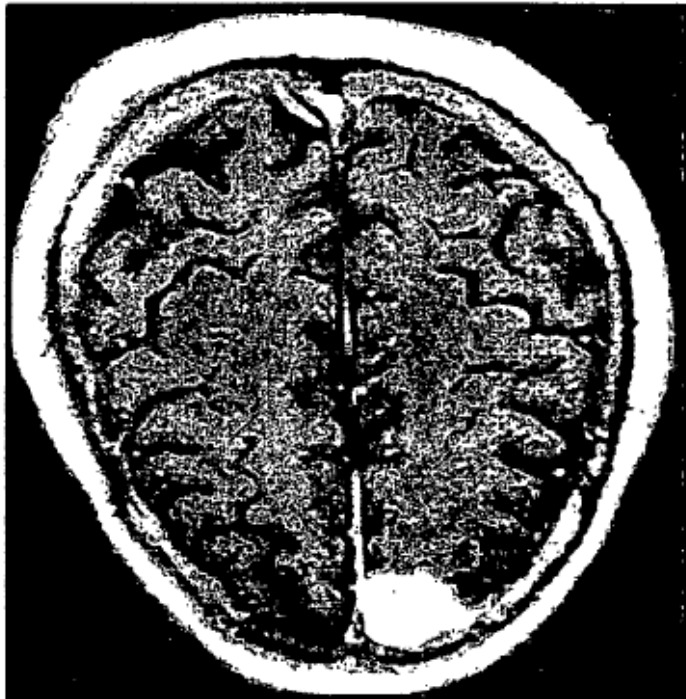


Figura 84A



Figura 85A

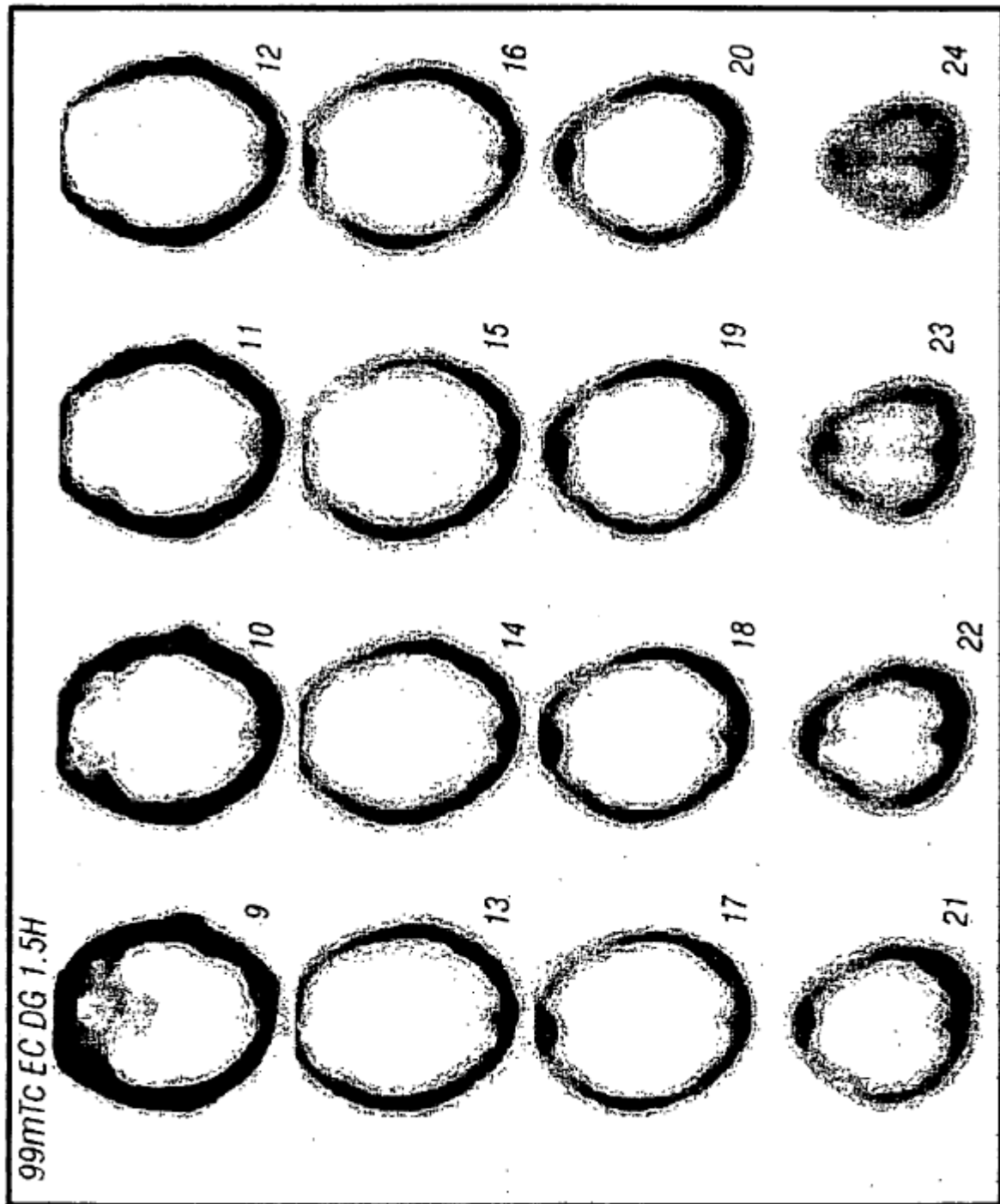


Figura 84B



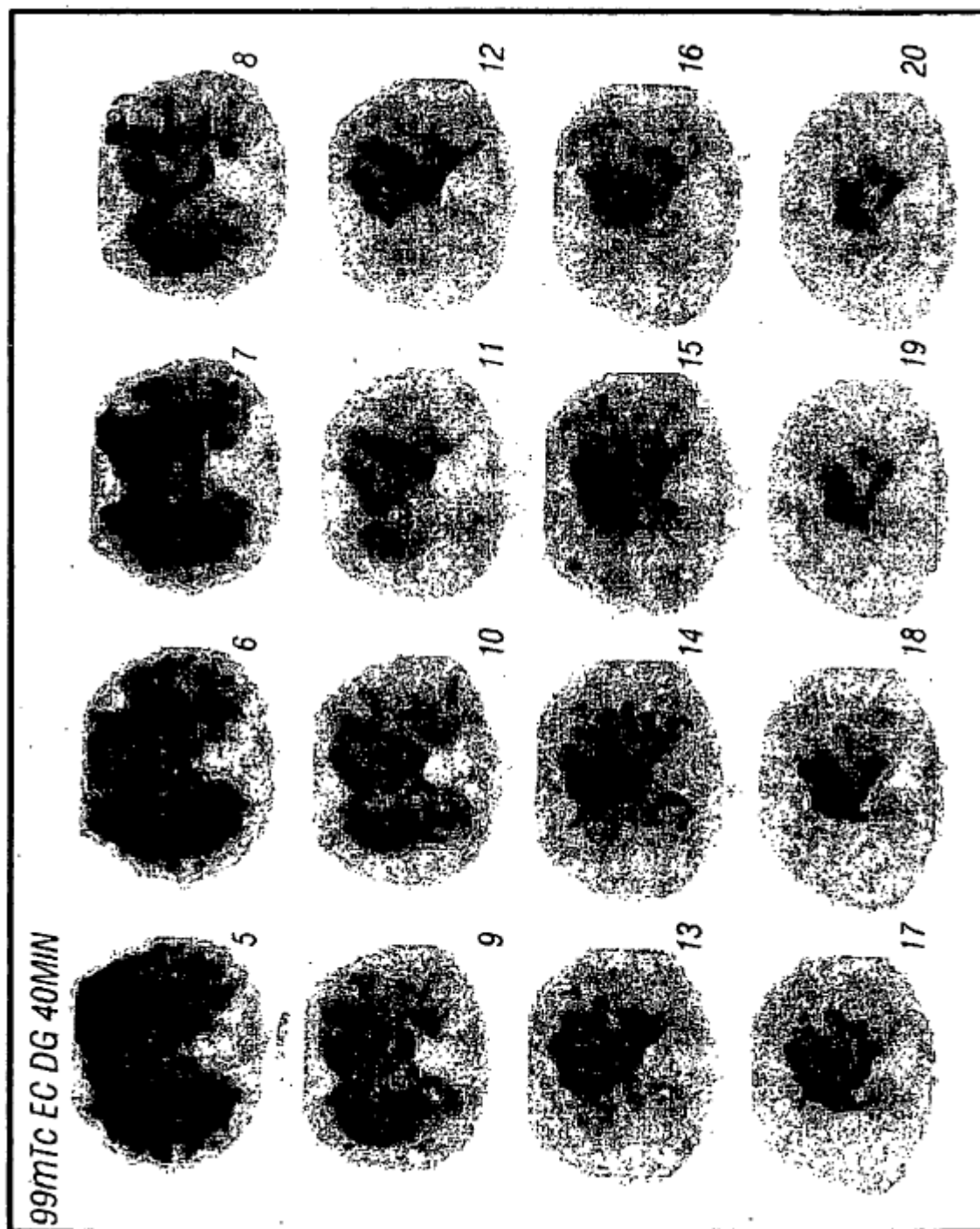
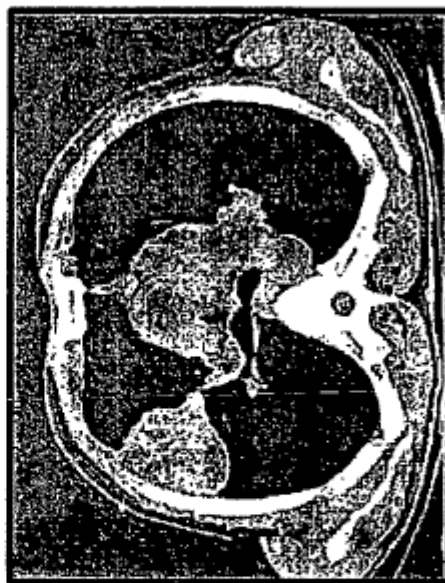


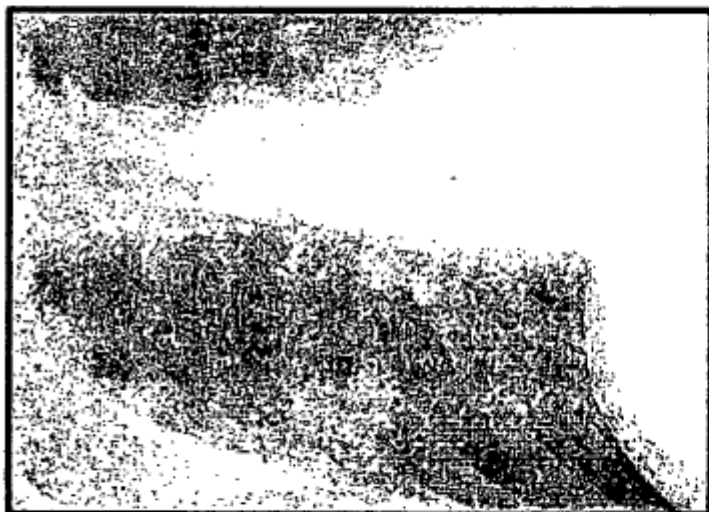
Figura 85B



PRE RTX



POST RTX



POST RTX



PRE RTX

Figura 86A

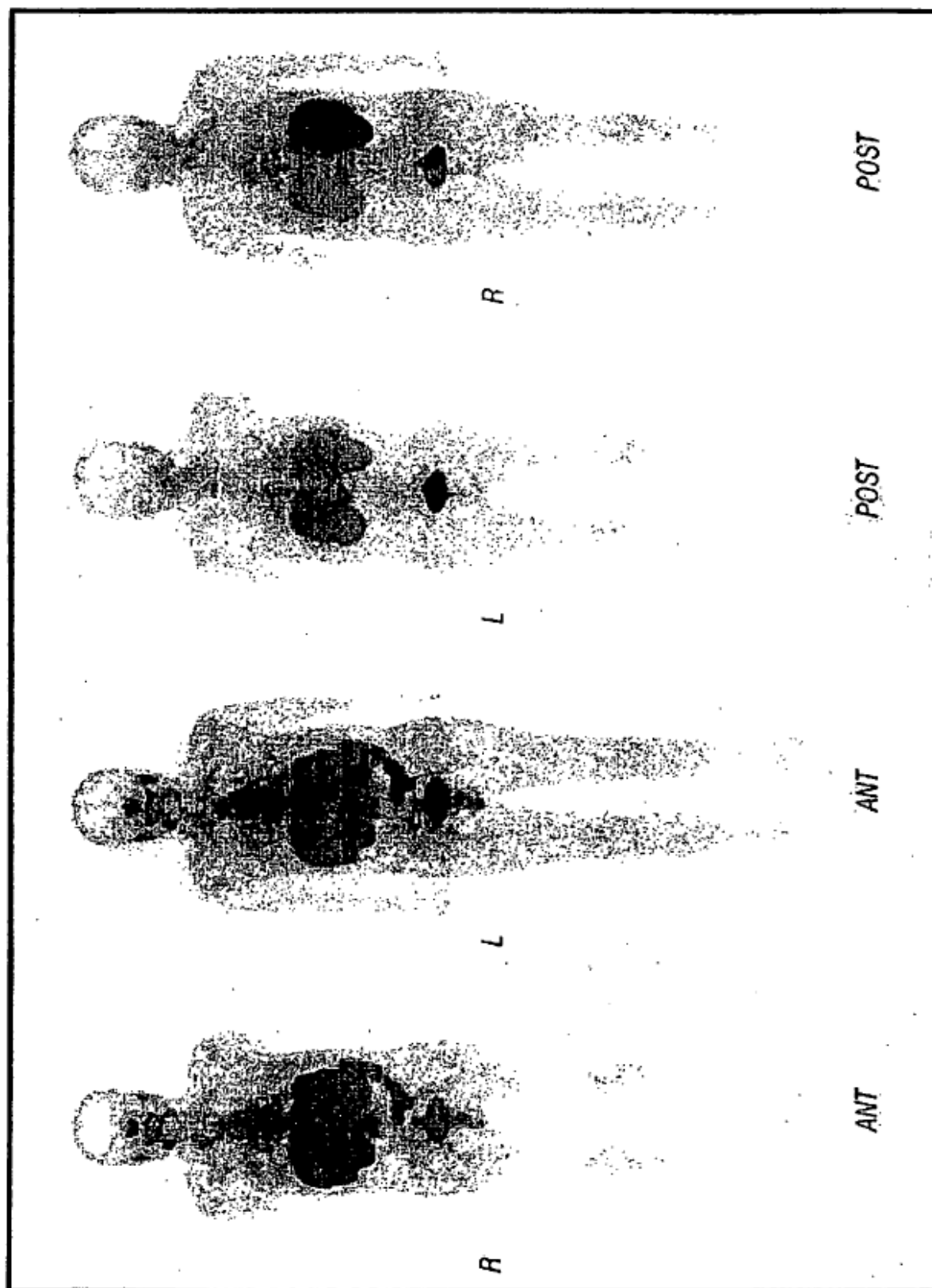


Figura 86B



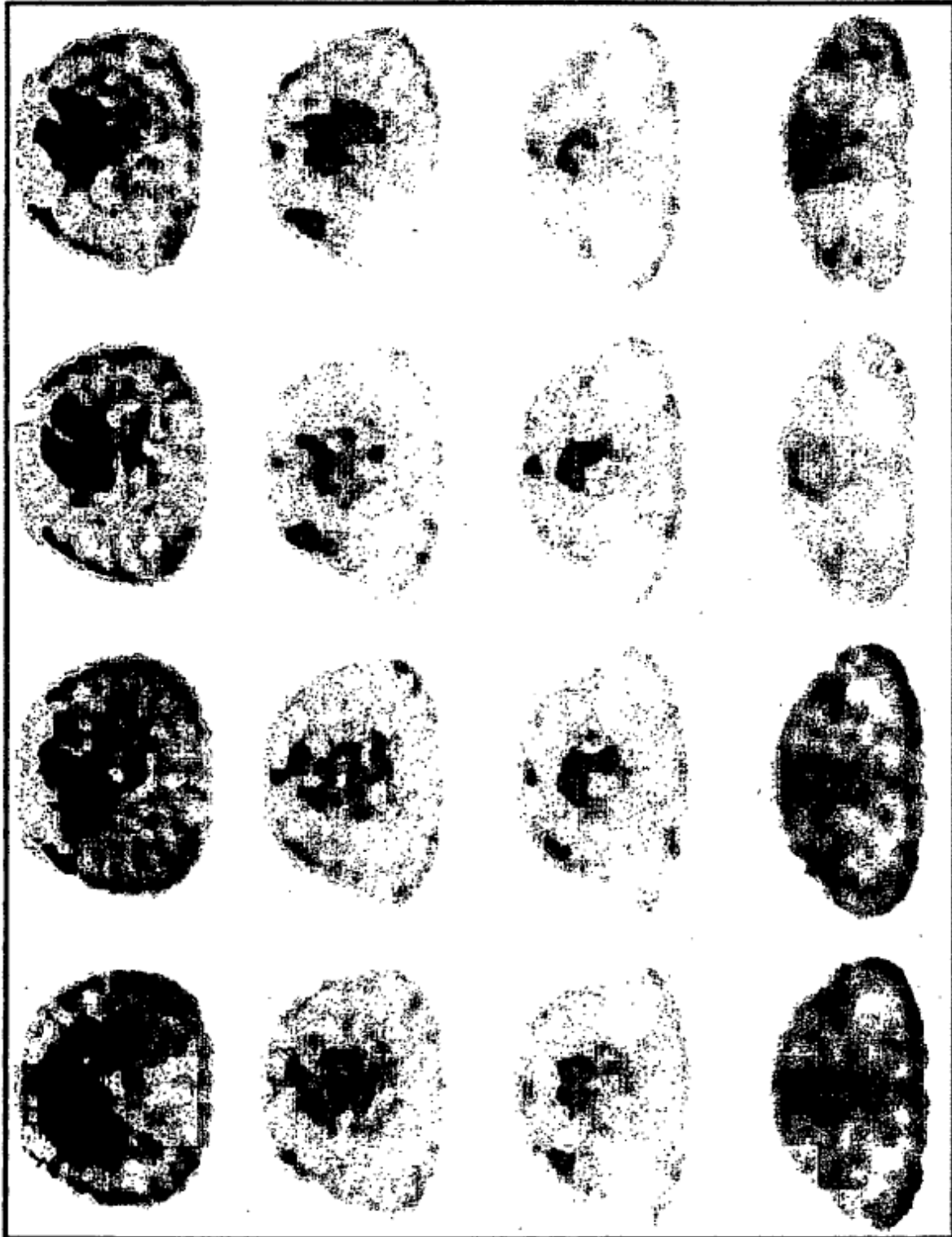


Figura 86C