

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 244**

51 Int. Cl.:

**C07F 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2006 E 06769952 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2013221**

54 Título: **Composiciones y métodos para la formación de imágenes celulares y terapia**

30 Prioridad:

**19.04.2006 US 745148 P**

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

**28.08.2015**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY  
OF TEXAS SYSTEM (100.0%)  
201 WEST 7TH STREET  
AUSTIN, TX 78702-2981, US**

72 Inventor/es:

**YANG, DAVID J.;  
OH, CHANG SOK;  
YU, DONG-FANG;  
AZHDARINIA, ALI y  
KOHANIM, SAADY**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 544 244 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

Composiciones y métodos para la formación de imágenes celulares y terapia

5 **1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a los campos de química y formación de imágenes de radionúclidos. Más particularmente, se refiere a composiciones y métodos que implican compuestos N4 y derivados.

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

Las modalidades de formación de imágenes de radionúclidos (Tomografía de Emisión de Positrones, PET; Tomografía Computarizada de Emisión de Fotones Individuales, SPECT) representan la ubicación y concentración de compuestos marcados con radionúclidos. Con el fin de mejorar la diagnosis, prognosis, planificación y monitorización de un tratamiento de enfermedad específica de tejidos, se determina ampliamente la caracterización del tejido de enfermedad por medio del desarrollo de más sustancias farmacéuticas específicas para la enfermedad. Se ha usado PET  $^{18}\text{F}$ -fluorodesoxiglucosa (FDG) para diagnosticar y evaluar tumores, infartos de miocardio y enfermedades neurológicas. Aunque la formación de imágenes metabólicas de tumores usando  $^{18}\text{F}$ -FDG se ha estudiado durante las últimas dos décadas, su práctica clínica todavía se encuentra limitada por factores tales como fácil accesibilidad, disponibilidad y coste de los isótopos. Además, la química de  $^{18}\text{F}$  es compleja y requiere tiempos de síntesis más prolongados (por ejemplo,  $^{18}\text{F}$ -FDG, 40 min-75 min), y resulta difícil producir agentes múltiples de forma simultánea. De este modo, sería deseable desarrollar una técnica de formación de quelatos simple para marcar agentes usando isótopos metálicos para radioterapia y formación de radio-imágenes destinada a tejidos específicos.

La mejora de la formación de imágenes escintigráficas de tumores aprovecha el desarrollo de sustancias radiofarmacéuticas específicas para tumores. Debido a la 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 una amplia evaluación y desarrollo preclínico (Mathias et al., 1996, 1997a, 1997b). Las modalidades de formación de imágenes de radionúclidos (por ejemplo, PET, SPECT) son técnicas de formación de imágenes diagnósticas de corte transversal que representan la ubicación y concentración de los radio-trazadores marcados con radionúclidos. Aunque CT y MRI proporcionan una información anatómica considerable con respecto a la ubicación y alcance de los tumores, normalmente estas modalidades de formación de imágenes no pueden diferenciar de forma apropiada las lesiones invasivas procedentes de edema, necrosis por radiación, clasificación o gliosis. PET y SPECT se pueden usar para localizar y caracterizar tumores por medio de medición de la actividad metabólica. De este modo, resultan deseables métodos que permitan una formación de imágenes más específica de los tumores.

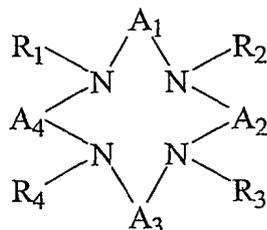
Un enfoque para producir nuevos compuestos para la formación de imágenes ha implicado el uso de derivados de etilendicisteína (EC), que son distintos de las composiciones de la presente invención. Se han marcado diversos compuestos con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  usando quelatos de nitrógeno y azufre (Blodeau et al., 1967; Davison et al., 1980). Se sabe que los ligandos tetradentados de bis-aminoetanotiol, también denominados compuestos de diaminoditiol, forman complejos de Tc(V)O muy estables sobre la base de la unión eficiente del grupo oxotecnecio a dos átomos de tioazufre y dos átomos de nitrógeno de amina. Se han desarrollado compuestos radiometálicos de 2-pirroltionas marcadas con complejos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -2-pirroltionas para su uso como sustancias radiofarmacéuticas para la formación de imágenes y terapia (documento WO 0180906A2). La  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -L,L-etilendicisteína ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC) es un ejemplo reciente y satisfactorio de quelatos N2S2. EC se puede marcar con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  de manera sencilla y eficaz con elevada pureza radioquímica y estabilidad, y se produce la excreción por parte del riñón por medio de transporte tubular (Surma et al., 1994; Van Nerom et al., 1990, 1993; Verbruggen et al., 1990, 1992). Además, se ha desarrollado  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  quelado con etilendicisteína (EC) y conjugado con varios ligandos para su uso como agente de formación de imágenes para enfermedades específicas de tejidos, como herramienta pronóstica, y como herramienta para administrar sustancias terapéuticas a sitios específicos dentro de un cuerpo de mamífero (documento WO 0191807A2, AU 0175210A5). Se han desarrollado  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC-quelatos para la formación de imágenes renales y el examen de la función renal (patente de Estados Unidos 5.986.074 y patente de Estados Unidos 5.955.053). También se ha desarrollado un método de preparación de complejos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC y un kit para llevar a cabo dichos métodos (patente de Estados Unidos 5.268.163 y documento WO 9116076A1). La patente de Estados Unidos 6.691.724 divulga conjugados de fármaco de etilendicisteína.

El compuesto de ciclama-tirosina, así como sus complejos metálicos y su uso en formación de imágenes, fueron presentados por David J Yang et al.: "Targeting EGFR-TK with radiolabeled cyclam-tyrosine" (American Association for Cancer Research. Proceedings of the Annual Meeting; 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR); Washington, DC, EE.UU; 01-05 Abril, 2006; Bioscience, vol. 47, 1 de abril de 2006 (2006-04-01), página 2394).

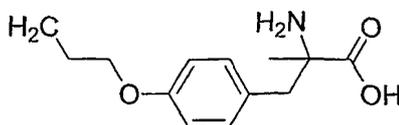
**Sumario de la invención**

La presente invención presenta compuestos y métodos que se refieren a un técnica de formación de quelatos simple para marcar agentes usando isótopos metálicos que se pueden usar para radioterapia y formación de radio-  
5 imágenes destinadas a tejidos específicos.

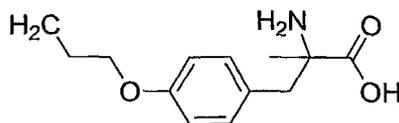
Un aspecto de la presente invención va destinado a un compuesto que tiene la fórmula:



10 en la que A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub> son cada uno independientemente -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-, en la que X = 2-4; y R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se escogen cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno o



15 en la que R<sub>4</sub> es



20 El compuesto puede formar un quelato con un átomo metálico. Dicho átomo puede no ser radioactivo. Dicho átomo metálico puede ser cobre, cobalto, platino, hierro, arsénico, renio o germanio. Dicho compuesto se puede someter a formación de quelatos con un radionúclido. Dicho radionúclido puede ser <sup>99m</sup>Tc, <sup>188</sup>Re, <sup>183</sup>Sm, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>89</sup>Sr, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>183</sup>Gd, <sup>59</sup>Fe, <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Bi, <sup>211</sup>At, <sup>45</sup>Ti, <sup>60</sup>Cu, <sup>61</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu o <sup>62</sup>Cu. En una realización determinada, dicho radionúclido se escoge entre el grupo que consiste en <sup>68</sup>Ga, <sup>90</sup>Y, <sup>99m</sup>Tc, <sup>68</sup>Ga o <sup>188</sup>Re. Dicho radionúclido puede ser <sup>99m</sup>Tc. El compuesto puede estar integrado en una composición farmacéutica.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a dicho compuesto para su uso en un método para el tratamiento de cáncer. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano. El compuesto puede estar sometido a formación de quelato con <sup>99m</sup>Tc, <sup>188</sup>Re, <sup>186</sup>Re, <sup>183</sup>Sm, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>89</sup>Sr, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>183</sup>Gd, <sup>59</sup>Fe, <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Bi, <sup>211</sup>At, <sup>45</sup>Ti, <sup>60</sup>Cu, <sup>61</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu o <sup>62</sup>Cu. El compuesto se puede administrar en combinación con un segundo compuesto anticanceroso, una terapia de radiación, o cirugía.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a dicho compuesto para su uso en un método para la formación de imágenes. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano. El compuesto puede estar sometido a formación de quelato con <sup>99m</sup>Tc, <sup>188</sup>Re, <sup>186</sup>Re, <sup>183</sup>Sm, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>89</sup>Sr, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>183</sup>Gd, <sup>59</sup>Fe, <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Bi, <sup>211</sup>At, <sup>45</sup>Ti, <sup>60</sup>Cu, <sup>61</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu o <sup>62</sup>Cu. Dicha formación de imágenes puede comprender formación de imágenes por PET o formación de imágenes por SPET.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende un compuesto de la presente invención y un agente de reducción. El kit comprende un radionúclido. El radionúclido puede ser <sup>99m</sup>Tc, <sup>188</sup>Re, <sup>186</sup>Re, <sup>183</sup>Sm, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>89</sup>Sr, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>183</sup>Gd, <sup>59</sup>Fe, <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Bi, <sup>211</sup>At, <sup>45</sup>Ti, <sup>60</sup>Cu, <sup>61</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu o <sup>62</sup>Cu. El kit puede comprender un antioxidante (por ejemplo, vitamina C, tocoferol, piridoxina, tiamina o rutina). El kit puede comprender un agente quelantes de transición (por ejemplo, glucoheptonato, gluconato, glucrato, citrato o tartrato). El agente reductor puede ser cloruro de estaño (II) o trifenilfosfina.

45

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "comprender" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también resulta coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". Según se usa en la presente memoria, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

5 Se contempla que se puede implementar cualquier realización comentada en la presente memoria descriptiva con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Además, se pueden usar las composiciones de la invención para lograr los métodos de la invención.

10 A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error del dispositivo, empleándose el método para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

15 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para hacer referencia a "y/o", a menos que se indique explícitamente lo contrario, para hacer referencia a alternativas únicamente o las alternativas son mutuamente exclusivas.

20 Según se usa en la presente memoria descriptiva y reivindicación(es), las palabras "comprender" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprenden" y "comprende"), "tener" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" y "tiene"), "incluir" (y cualquier forma de incluir, tal como "incluyen" e "incluye") o "contener" (y cualquier forma de contener, tal como "contienen" y "contiene") son inclusivas o de extremo abierto y no excluyen etapas del método o elementos adicionales y no citados.

### Breve descripción de los dibujos

25 **Figura 1.** Síntesis de N4-DG

**Figura 2.** Captación celular *in vitro* de  $^{99m}\text{Tc}$ -N4-DG (Ciclama) en células de cáncer de mama 231. Se colocaron en placas 50.000 células/pocillo y se permitió que alcanzaran una confluencia de un 70-80 %. Se administraron trazadores a 4  $\mu\text{Ci}$ /pocillo y se incubó a 37 °C durante 1-3 horas. Posteriormente, se recogieron las células y se contó y cuantificó la radioactividad.

**Figura 3.** Captación celular de  $^{68}\text{Ga}$ -N4-DG2 (ciclama) en células de cáncer de pulmón humanas. La captación celular *in vitro* usando células A459 mostró una captación mayor de  $^{68}\text{Ga}$ -N4-DG mientras que  $^{68}\text{Ga}$ -ND mostró una captación pobre.

**Figura 4A-C** **Figura 4A.** Captación celular de  $^{68}\text{Ga}$ -N4-DG2 (ciclama) en celulares de tumor mamario en ratas. La captación celular *in vitro* usando células 13762 mostró una captación mayor de  $^{68}\text{Ga}$ -N4-DG mientras que  $^{68}\text{Ga}$ -N4 mostró una captación pobre. **Figura 4B.** Estudio de captación celular de  $^{99m}\text{Tc}$ -N4-DG (ciclal). Se colocaron en placas 50.000 células/pocillo y se permitió que alcanzaran una confluencia de un 70-80 %. Se administraron trazadores a 4  $\mu\text{Ci}$ /pocillo y se incubó a 37 °C durante 0,5-2 horas. Posteriormente, se recogieron las células y se contó y cuantificó la radioactividad. **Figura 4C,** estudio *in vitro* de N4 marcado con  $^{99m}\text{Tc}$ , Biotina, AMT y compuestos DOTA en estirpe celular de cáncer de mama 13762. Se colocaron en placas 50.000 células/pocillo y se permitió que alcanzaran una confluencia de un 70-80 %. Se administraron trazadores a 4  $\mu\text{Ci}$ /pocillo y se incubó a 37 °C durante 0,5-1,5 horas.

**Figuras 5A-B.** **Figura 5A,**  $^{68}\text{Ga}$ -N4-DG frente a  $^{18}\text{F}$ -FDG ( $\mu\text{PET}$ ). Se observó un patrón de distribución similar entre  $^{68}\text{Ga}$ -N4-DG (ciclama) y  $^{18}\text{F}$ -FDG. **Figura 5B,** imágenes de  $\mu\text{PET}$  de  $^{68}\text{Ga}$ -N4. Ratas que portan tumores mamaros inyectadas con 400  $\mu\text{Ci}$  de  $^{68}\text{Ga}$ -N4. Las imágenes seleccionadas se muestran 2 horas después de la inyección.

**Figura 6.** Formación de imágenes de 10, 60 y 120 minutos de  $^{99m}\text{Tc}$ -N4-DG (ciclama) en ratas con y sin tumor. Escintigrafía Plana de 10, 60 y 120 minutos de  $^{99m}\text{Tc}$ -N4-DG en ratas con y sin tumor (estirpe celular de tumor de mama) tras inyección intravenosa de 300 mCi/rata, 500.000 cuentas adquiridas para demostrar la visualización del tumor. Se muestran las proporciones de tumor con respecto a ausencia de tumor. T= tumor y M = músculo.

**Figura 7.** Comparación de 10, 60 y 120 minutos de imagen de  $^{99m}\text{Tc}$ -N4-DG (ciclama) frente a  $^{99m}\text{Tc}$ -ED-DG de ratas que portan una estirpe celular de tumor de mama. Escintigrafía plana de comparación de  $^{99m}\text{Tc}$ -N4-DG frente a  $^{99m}\text{Tc}$ -ED-DG en ratas que portan una estirpe celular de tumor de mama. (inyección intravenosa de 300 mCi/rata, 500.000 cuentas adquiridas). Se muestran las proporciones de tumor frente a ausencia de tumor. T = tumor y M = músculo.

**Figura 8.** Proporciones de densidad de cuentas de tumor con respecto a músculo de formación de imágenes de  $^{99m}\text{Tc}$ -N4-DG (ciclama) en ratas con y sin estirpe celular de cáncer de mama. Se observaron mayores proporciones de tumor con respecto a músculo con  $^{99m}\text{Tc}$ -N4-DG.

**Figura 9.** Comparación de formación de imágenes de  $^{99m}\text{Tc-N4}$  frente a  $^{99m}\text{Tc-N4-AMT}$  (ciclama) en intermedio de conejo, 1 hora y 3 horas después de la inyección. Escintigrafía plana de  $^{99m}\text{Tc-N4}$  frente a  $^{99m}\text{Tc-N4-AMT}$  en conejos que portan tumores VX2 (1 mCi/conejo, inyección intravenosa) para comparar la visualización de tumor. Se apreciaron proporciones mayores de tumor/músculo en los grupos de  $^{99m}\text{Tc-N4-AMT}$ .

**Figura 10.** Formación de imágenes de micro-PET de  $^{68}\text{Ga}$ . Se inyectaron 400  $\mu\text{Ci}$  de  $^{68}\text{Ga-N4-AMT}$  a ratas que portaban tumores de mama. Las imágenes de todo el cuerpo mostraron que el tumor (pata derecha) se podría someter a formación de imágenes 2 horas después de la inyección.

## Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

En el campo de la medicina nuclear, se localizan diversas afecciones patológicas, o se evalúa su alcance, por medio de la detección de la distribución de cantidades pequeñas de compuesto trazador marcado radioactivamente y administrado por vía interna (denominados radiotrazadores o sustancias radiofarmacéuticas). Generalmente, se conocen los métodos para detectar estas sustancias radio-farmacéuticas en forma de método de formación de imágenes o formación de radio-imágenes.

### I. DEFINICIONES

La palabra "conjugado" se define en la presente memoria como unión química dentro de la misma molécula. Por ejemplo, se pueden conjugar dos o más moléculas y/o átomos juntos por medio de un enlace covalente, formando una molécula individual. Se pueden conjugar las dos moléculas una a la otra por medio de una conexión directa (por ejemplo, en la que los compuestos se unen directamente por medio de un enlace covalente) o los compuestos se pueden conjugar por medio de una conexión indirecta (por ejemplo, en la que los dos compuestos se unen covalentemente a uno o más agentes de enlace, formando una molécula individual). En otros casos, se puede conjugar un átomo metálico a una molécula por medio de interacción de formación de quelatos.

La expresión "derivado de N4" se define en la presente memoria como un compuesto N4 que se ha conjugado a al menos otra molécula o átomo. En determinadas realizaciones, el derivado comprende un compuesto N4 que tiene un átomo sometido a formación de quelato con el mismo. El derivado N4 puede comprender un compuesto N4 que se conjuga a un ligando diana (por ejemplo, por medio de un enlace covalente) y/o un agente de enlace (por ejemplo, por medio de un enlace covalente) y/o un quelato metálico (por ejemplo, por medio de interacción de formación de quelato).

Según se usa en la presente memoria, "radionúclido" se define como un núclido radioactivo (una especie de átomo capaz de existir durante un tiempo medible y que se distingue por su carga, masa, número y estado cuántico del núcleo) que, en realizaciones específicas, se desintegra con la emisión de radiación corpuscular o electromagnética. Se puede usar el término de forma intercambiable con el término "radioisótopo".

La expresión "agente terapéutico", según se usa en la presente memoria, se define como un agente que proporciona tratamiento para una enfermedad o afección médica. El agente, en una realización específica, mejora al menos un síntoma o parámetro de la enfermedad o afección médica. Por ejemplo, en la terapia de tumores, el agente terapéutico reduce el tamaño del tumor, inhibe o evita la proliferación o las metástasis del tumor, o elimina el tumor. Los ejemplos incluyen un fármaco, tal como un fármaco anti-cáncer, una composición de terapia génica, un radionúclido, una hormona, una sustancia nutricional o una de sus combinaciones.

El término "tumor", según se define en la presente memoria, se define como una proliferación progresiva y no controlada de células en un tejido. El experto artesano es consciente de que existen otros síntomas, tales como neoplasia o cáncer. En una realización específica, el tumor es un tumor sólido. En otras realizaciones específicas, el tumor procede, ya sea de forma principal o en forma metastásica, de cánceres tales como cáncer de hígado, próstata, páncreas, cabeza y cuello, mama, cerebro, colon, adenoide, boca, piel, pulmón, testículo, ovario, cervical, endometrio, vejiga, estómago y epitelio.

El término "fármaco", según se usa en la presente memoria, se define como un compuesto que contribuye en el tratamiento de una enfermedad o afección médica o que controla o mejora cualquier afección fisiológica o patológica asociada a la enfermedad o afección médica.

La expresión "fármaco anti-cáncer", según se usa en la presente memoria, se define como un fármaco para el tratamiento de cáncer, tal como un tumor sólido. Preferentemente, el fármaco anti-cáncer reduce el tamaño del tumor, inhibe o evita la proliferación o las metástasis del tumor y/o elimina el tumor. Las expresiones "fármaco anticáncer", "fármaco anti-cáncer" y "compuesto anti-canceroso" se usan de manera intercambiable en la presente memoria.

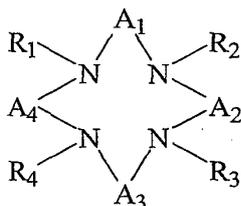
Según se usa en la presente memoria descriptiva, "un" o "una" puede significar uno o más. Según se usa en la presente memoria en la(s) reivindicación(es), cuando se usa junto con la palabra "comprender", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno. Según se usa en la presente memoria "otro" u "otra" puede significar al

menos un segundo o más.

## II. COMPUESTOS N4 Y DERIVADOS

5 La presente invención proporciona un método por medio del cual los compuestos N4, que normalmente son agentes de formación de quelato hidrófobos, se pueden conjugar a moléculas hidrófobas para producir nuevos compuestos que se pueden usar con fines que incluyen la formación de imágenes y radioterapia. Se pueden obtener diversos compuestos N4 a partir de una fuente comercial tal como Sigma Chemical Company (San Louis, MO) y Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). La patente de Estados Unidos 5.880.281 describe un método para producir  
10 diversos compuestos N4.

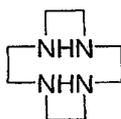
Los compuestos N4 se definen en la presente memoria como que tienen la estructura:



15 en la que A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub> son alquilo; y  
en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno. Diversos compuestos N4 se muestran a continuación.

### Estructuras de compuestos-N4

20

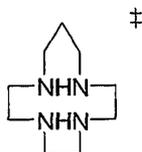


1) **Número de registro:** 294-90-6

**Nombre de Índice CA:** 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (6Cl, 8Cl, 9Cl)

**Otros nombres:** cicleno; NSC 629374; Tetraaza-12-corona-4.

25

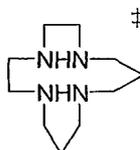


2) **Número de registro:** 295-14-7

**Nombre de Índice CA:** 1,4,7,10-tetraazaciclotridecano (6Cl, 8Cl, 9Cl)

**Otros nombres:** Ciclama 13

30

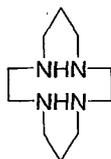


3) **Número de registro:** 52877-36-8

**Nombre de Índice CA:** 1,4,7,11-tetraazaciclotetradecano (9Cl)

**Otros nombres:** Isociclama

35

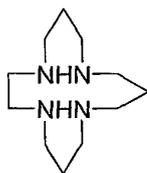


4) **Número de registro:** 295-37-4

**Nombre de Índice CA:** 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (6Cl, 7Cl, 8Cl, 9Cl)

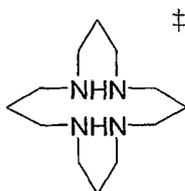
**Otros nombres:** Ciclama; JM 1498; NSC 180811.

40

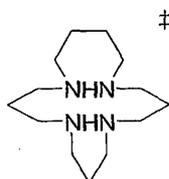


- 5) **Número de registro:** 15439-16-4  
**Nombre de Índice CA:** 1,4,8,12-tetraazaciclopentadecano (8CI, 9CI)  
**Otros nombres:** Ciclal.

5

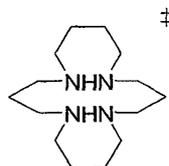


- 6) **Número de registro:** 24772-41-6  
**Nombre de Índice CA:** 1,5,9,13-tetraazaciclohexadecano (8CI, 9CI)



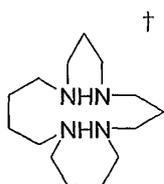
10

- 7) **Número de registro:** 43031-32-9  
**Nombre de Índice CA:** 1,5,9,13-tetraazacicloheptadecano (9CI)



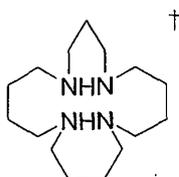
15

- 8) **Número de registro:** 68966-28-9  
**Nombre de Índice CA:** 1,5,10,14-tetraazaciclooctadecano (9CI)



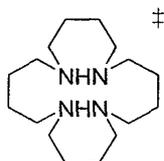
20

- 9) **Compuesto no existente**  
**Nombre:** 1,5,9,14-tetraazaciclooctadecano



25

30

**10) Compuesto no existente****Nombre:** 1,5,10,15-tetraazaciclonoñadecano

5

**11) Número de registro:** 3713-77-7**Nombre de Índice CA:** 1,6,11,16-tetraazacicloicosano (8Cl, 9Cl)

†: compuesto no existente

‡: no disponible desde el punto de vista comercial.

10

Los compuestos N4 se pueden usar como agentes de formación de quelato. Por ejemplo, se sometieron a ensayo ciclama y otros compuestos-N4 para evaluar su capacidad para aliviar el envenenamiento por cadmio agudo (Srivastava et al., 1996). La patente de Estados Unidos 4.141.654 describe diversos compuestos con similitud estructural a compuestos N4 que se pueden usar para formar quelatos con iones de actiride. La patente de Estados Unidos 5.648.063 divulga compuestos con similitud estructural a compuestos N4 que pueden formar quelatos con iones metálicos y también se pueden usar en diversos procedimientos diagnósticos de RMN. La patente de Estados Unidos 6.071.490 utiliza un cicleno modificado para la formación de imágenes de PET. La patente de Estados Unidos 6.613.305 divulga vitamina B<sub>12</sub> ligada a diversos compuestos N4.

15

20

**A. Ligados diana**

En la presente memoria descriptiva, generalmente resulta preferible conjugar un resto diana (por ejemplo, un fármaco anticáncer hidrófobo) al compuesto N4; no obstante, en diversas realizaciones, se puede usar un compuesto N4 que no está conjugado a un resto diana para la formación de imágenes y terapia. Se puede conjugar un resto diana al compuesto N4 por medio de diversos métodos. Un método consiste en sintetizar un resto diana de haluro (por ejemplo, yodado). Por ejemplo, el grupo hidroxilo de un resto diana (por ejemplo, una molécula hidrófoba) se puede convertir en un grupo tosilo-, mesilo-, triflato o haluro (por ejemplo yodo). Normalmente, la condición de reacción se realiza en un disolvente orgánico (dimetilformamida, DMF). En determinadas realizaciones, el producto final es soluble en agua tras la formación de la sal de hidrocioruro. Alternativamente, otros métodos para conjugar un compuesto N4 a un resto diana consisten en sintetizar un resto diana de sulfonato (por ejemplo, tosilo, mesilo o triflato). Se pueden preparar sustituyentes di-, tri- o completos sobre el compuesto N4 haciendo reaccionar estos agentes diana yodados o de sulfonato. Para los mono-sustituidos, se requiere una protección selectiva de los grupos nitrógeno. Los ligandos diana que se pueden conjugar con un compuesto N4 incluyen amino ácidos (por ejemplo, tirosina, serina), derivados de amino ácido (por ejemplo, alfa metiltirosina), tamoxifeno, estrona y tetraacetato manosa.

25

30

35

También se pueden conjugar otros ligandos al compuesto N4. En general, los ligandos poseen bien un grupo haluro o bien un grupo hidroxilo que son capaces de reaccionar con y ligarse de forma covalente al compuesto N4 en cualquiera de sus brazos ácidos o en ambos. Los ligandos contemplados incluyen, pero sin limitarse a, ligandos de angiogénesis/antiangiogénesis, inhibidores de ADN topoisomerasa, marcadores de glicolisis, ligandos antimetabolito, ligandos de apoptosis/hipoxia, intercaladores de ADN, marcadores de receptor, péptidos, nucleótidos, antimicrobianos tales como antibióticos o antifúngicos, ligandos específicos de órganos y azúcares, y agentes que se parecen a glucosa.

45

Se contempla la posibilidad de uso de prácticamente cualquier ligando diana que se conozca, o se pueda descubrir posteriormente, que posea un grupo hidroxilo o un haluro, o que pueda tener alternativamente un grupo hidroxilo o un haluro introducido en su estructura (por ejemplo, por medio de la adición de una cadena lateral, o por medio de unión de un haluro a un grupo fenol en el ligando diana). En determinadas realizaciones, el ligando diana se puede conjugar directamente a un compuesto N4 (por ejemplo, por medio de un enlace covalente entre el ligando diana y el compuesto N4) o se puede conjugar indirectamente un ligando diana a un compuesto N4 por medio de un agente de enlace. Se prevé que los ligandos diana que se han conjugado previamente a otro agente quelante (que no sea un compuesto N4), tal como EC, se pueden conjugar a compuestos N4 y se usan con fines terapéuticos; en determinados casos, puede ser necesario modificar el ligando diana (por ejemplo, adición de una cadena lateral que contiene un hidroxilo o un haluro) con el fin de unir covalentemente el ligando diana al compuesto N4. Por ejemplo, la unión covalente de ligandos con compuestos EC normalmente se realiza en agua y, en determinados casos, puede resultar preferido unir covalentemente un ligando diana con un compuesto N4 por medio de la utilización de una reacción en un disolvente orgánico; en estos casos, se puede modificar un ligando diana que se une covalentemente a EC por medio de una reacción en agua (por ejemplo, se puede introducir un haluro o grupo hidroxilo en la estructura) para permitir que el ligando diana se una covalentemente a un compuesto N4 por medio de una reacción en un disolvente orgánico.

50

55

60

Se pueden usar los derivados N4 para dirigirse a tumores (por ejemplo, cancerígenos, precancerígenos, benignos), angiogénesis tumoral, hipoxia, defectos de apoptosis, receptores de enfermedad (por ejemplo, receptores celulares que son indicativos de cáncer), mecanismos funcionales de enfermedad (por ejemplo, un mecanismo metabólico que se ha alterado por medio de un estado de enfermedad) y ciclos celulares de enfermedad. Adicionalmente, se pueden usar los derivados de N4 para la evaluación de la eficacia del agente farmacéutico en estos procesos bioquímicos.

También se pueden usar derivados de N4 como herramienta de diagnóstico y/o para predecir las respuestas frente a diversos tipos de tratamiento. Por ejemplo, se puede usar un derivado de N4 que comprende tamoxifeno (un ligando diana de receptor de estrógeno) para la formación de imágenes de tumores cancerígenos; en este ejemplo, la formación de imágenes puede proporcionar información importante sobre la enfermedad tal como en qué medida las células cancerígenas expresan el receptor de estrógenos que se puede usar para predecir el modo en el que la enfermedad responde a tratamientos que marcan las células que expresan el receptor de estrógenos (por ejemplo, cuando se identifica que los tumores cancerígenos expresan selectivamente niveles elevados de receptor de estrógenos, esta información indica que las células cancerígenas responden probablemente a dosis terapéuticas de agentes anti-cáncer que marcan las células que expresan el receptor de estrógenos). Este enfoque se denomina "terapia guiada por imágenes".

Una ventaja de conjugar un compuesto N4 con ligandos diana de tejido es que las propiedades de unión específica del ligando diana de tejido pueden concentrar la señal radioactiva sobre el área de interés. Se prevé que los derivados N4 usados para la formación de imágenes y/o la terapia pueden comprender un compuesto N4 conjugado a ligandos diana diseñados para dirigirse a tumores cancerígenos, tumores pre-cancerígenos, receptores de enfermedad, tejidos hipóxicos (hipoxia), mecanismos de apoptosis, ciclos celulares de enfermedad y/o mecanismos funcionales de enfermedad. También se pueden usar los derivados N4 para evaluar la eficacia del agente farmacéutico sobre diversos mecanismos metabólicos y/o bioquímicos o reacciones individuales. La Tabla 1 muestra ejemplos de determinados ligandos diana que se pueden usar en la presente invención. En determinadas realizaciones, se puede usar un fármaco anti-cáncer como ligando diana. Los fármacos anti-cáncer se conocen bien en la técnica (por ejemplo, Connors, 1996). La Tabla 2 de la patente de Estados Unidos 6.691.724 muestra varios ejemplos de fármacos anti-cáncer que se pueden usar como ligandos diana.

**Tabla 1**

<b>Dianas para Derivados N4</b>	<b>Ejemplos de Ligandos diana</b>
Angiogénesis de tumor	Celecoxib, C225, angiostatina
Receptor de enfermedad	Tamoxifeno, $\alpha$ - $\beta$ tirosina, tirosina, alfa metiltirosina, hormona luteinizante, transferrina, somatostatina, andrógeno, estrógeno, estrona, progesterona, tetracetato manosa
Ciclo celular de enfermedad	Adenosina, penciclovir
Agente farmacéutico	Carnitina, puromicina
Evaluación de diana de apoptosis	Anticuerpo monoclonal TRAIL, sustrato caspasa-3, miembro de familia Bcl

**1. Diana de angiogénesis tumoral**

A lo largo de la presente memoria descriptiva, "diana de angiogénesis tumoral" se refiere al uso de un agente para unirse a la neovascularización tumoral y a las células tumorales. Los agentes que se usan para este fin se conocen por parte de los expertos en la técnica para el uso en la realización de diversas mediciones de tumores, incluyendo la medición del tamaño de un lecho vascular de tumor y la medición del volumen del tumor. Algunos de estos agentes se unen a la pared vascular. El experto en la técnica está familiarizado con estos agentes que se encuentran disponibles para su uso con esta finalidad. Un ligando diana de angiogénesis de tumor es un ligando que se usa con la finalidad de dirigirse a la angiogénesis tumoral como se ha definido con anterioridad. Los ejemplos de ligandos diana de angiogénesis de tumor incluyen celecoxib, C225, herceptina, angiostatina y talidomida, que se han desarrollado para la evaluación de un proceso bioquímico en angiogénesis.

En determinadas realizaciones, un ligando diana de tumor puede asociarse con tejidos tumorales para dirigirse a la hipoxia asociada a células tumorales. Los ejemplos de ligandos diana de tumor que se dirigen a tejidos hipóxicos incluyen nitroimidazol y metronidazol, y también se pueden usar estos ligandos para dirigirse a otros tejidos hipóxicos que son hipóxicos debido a un motivo diferente al de cáncer (por ejemplo, accidente cerebrovascular).

**2. Diana de apoptosis tumoral**

"Diana de apoptosis tumoral" se refiere al uso de un agente para unirse a una célula que está experimentando apoptosis o que se encuentra en riesgo de experimentar apoptosis. Generalmente, estos agentes se usan para proporcionar un indicador del alcance del riesgo de apoptosis, o muerte celular programada, en una población de células, tal como un tumor. El experto en la técnica está familiarizado con agentes que se usan con esta finalidad. La Tabla 1 muestra determinados ejemplos de agentes diana de apoptosis. Un "ligando diana de apoptosis tumoral" es

un ligando que es capaz de "dirigirse a la apoptosis tumoral" como se define en el presente párrafo. Los ejemplos de ligando de apoptosis tumoral incluyen un anticuerpo monoclonal TRAIL (ligando que induce apoptosis relacionada con TNF). TRAIL es un miembro de la familia de ligandos de factor de necrosis tumoral que induce apoptosis de forma rápida en varias estirpes celulares transformadas. Otros ejemplos de ligandos diana de apoptosis tumoral incluyen un sustrato de caspasa-3, tal como un péptido o polipéptido que incluye la secuencia de 4 amino ácidos ácido aspártico-ácido glutámico-valina-ácido aspártico.

Se ha dirigido investigación importante hacia la creación y evaluación de nuevos compuestos que afectan a la apoptosis, tales como la restitución de la sensibilidad frente a apoptosis para células cancerígenas (Reed, 2003). Se prevé que la presente invención se puede usar para activar la evaluación y/o eficacia de los compuestos diana de apoptosis tumoral conocidos y/o descubiertos con posterioridad.

### 3. Diana de receptor de enfermedad

En la "diana de receptor de enfermedad", se aprovechan determinados agentes en cuanto a su capacidad para unirse a determinados receptores celulares que se sobre-expresan en estados de enfermedad, tales como cáncer. Los ejemplos de dichos receptores diana incluyen receptores de estrógeno, transportadores de amino ácidos, receptores de andrógenos, receptores de pituitaria, receptores de transferrina, receptores de progesterona y transportadores de glucosa. Los ejemplos de agentes que se pueden aplicar en el direccionamiento de receptor-enfermedad se muestran en la Tabla 1. Los ligandos diana de receptor de enfermedad (por ejemplo, pentetrotido, octetrotido, transferrina y péptido de pituitaria) se unen a receptores de células, algunos de los cuales se sobre-expresan en determinadas células.

Estrógeno, estrona y tamoxifeno se dirigen al receptor de estrógenos. Los receptores de estrógeno se sobre-expresan en determinados tipos de cáncer, y se pueden usar derivados N4 que comprenden un ligando diana de receptor de estrógeno en determinadas realización para formar imágenes de tumores. La expresión de los receptores de estrógeno también se ve alterada en las enfermedades de osteoporosis y endometriosis. Se anticipa que se puede usar un derivado N4 que comprende un ligando diana de receptor de estrógenos para formar imágenes de otras enfermedades tales como osteoporosis y endometriosis.

Los transportadores de glucosa se sobre-expresan en diversas células enfermas tal como determinadas células cancerígenas. Tetraacetato manosa, desoxiglucosa, determinados polisacáridos (por ejemplo, neomicina, canamicina, tobramicina) y monosacáridos (por ejemplo, glucosamina) también se unen al transportador de glucosa y se pueden usar como ligandos diana de receptor de enfermedad. Debido a que estos ligandos no son inmunogénicos y se purifican de forma rápida a partir del plasma, parece que la formación de imágenes de receptor sería más prometedora en comparación con la formación de imágenes de anticuerpos.

De forma similar, los transportadores de amino ácidos también se sobre-expresan en diversas células enfermas tales como determinadas células cancerígenas. Se pueden usar amino ácidos y/o derivados de amino ácidos (por ejemplo, serina, tirosina, alfa metiltirosina) como ligandos diana de receptor de enfermedad.

Los ligandos diana de receptor adicionales se encuentran disponibles y se pueden conjugar con compuestos N4. Otros ejemplos de ligandos diana de receptor de enfermedad incluyen hormona luteinizante y transferrina. Ácido fólico, folato, tomudex y metotrexato son ejemplos de ligandos diana de receptor de enfermedad que se unen a receptores de folato.

La "diana tumoral" se refiere a la capacidad de un compuesto para asociarse preferentemente con tumores (por ejemplo, cancerígeno, pre-cancerígeno y/o benigno). Un "ligando diana tumoral" se refiere a un compuesto que preferentemente se une o se asocia con tejidos tumorales, en comparación con los tejidos no tumorales. Los ligandos (por ejemplo, moléculas pequeñas o anticuerpos) que preferentemente se dirigen a tumores se conocen bien en la técnica.

### 4. Diana de ciclo celular de enfermedad

La diana de ciclo celular de enfermedad se refiere al direccionamiento de agentes que están sobre-regulados en células de proliferación. Se pueden usar los compuestos usados para esta finalidad con el fin de medir diversos parámetros de las células, tales como el contenido de ADN de la célula tumoral.

Determinados ligandos diana de ciclo celular de enfermedad son análogos de nucleósido. Por ejemplo, se han desarrollado nucleósido de pirimidina (por ejemplo, 2'-fluoro-2'-deoxi-5-yodo-1-β-D-arabinofuranosiluracilo [FIAU], 2'-fluoro-2'-desoxi-5-yodo-1-β-D-ribofuranosiluracilo [FIRU], 2'-fluoro-2'-5-metil-1-β-D-arabinofuranosiluracilo [FMAU], 2'-fluoro-2'-desoxi-5-yodovinil-1-β-D-ribofuranosiluracilo [IVFRU] y acicloguanosina: 9-[(2-hidroxi-1-(hidroximetil)etoxi)metil]guanina (GCV) y 9-[4-hidroxi-3-(hidroxi-metil)butil]guanina (PCV) (Tjuvajev et al., 2002; Gambhir et al., 1998; Gambhir et al., 1999) y otros análogos de acicloguanosina marcados con <sup>18</sup>F, tales como 8-fluoro-9-[(2-hidroxi-1-(hidroximetil)etoxi)metil]guanina (FGCV) (Gambhir et al., 1999; Namavari et al., 2000), 8-fluoro-9-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)butil]guanina (FPCV) (Gambhir et al., 2000; Iyer et al., 2001), 9-[3-fluoro-1-hidroxi-2-

propoxi metil]guanina (FHPG) (Alauddin et al., 1996; Alauddin et al., 1999) y 9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina (FHBG) (Alauddin y Conti, 1998; Yaghoubi et al., 2001), como sustratos de indicador para la formación de imágenes de expresión de tipo natural y mutante (Gambhir et al., 2000) HSV1-tk. El experto en la técnica está familiarizado con estos y otros agentes que se usan para dirigirse al ciclo celular de enfermedad.

5 Los ejemplos de ligandos diana de enfermedad incluyen, por ejemplo, adenosina y penciclovir. El análogo de nucleósido antivírico FHBG (un análogo de penciclovir), otro ligando diana de enfermedad, existe para la medición *in vivo* de la proliferación celular usando PET (Alauddin et al., 2001).

### 5. Enfermedad para diana de hipoxia

10 La diana de hipoxia de células de enfermedad se refiere al direccionamiento de agentes que están sobre-regulados en células hipóxicas. Se pueden usar los compuestos empleados para tal fin para medir los diversos parámetros en las células, tales como hipoxia de células tumorales, resistencia o contenido residual.

15 Determinados ligandos diana de hipoxia de células de enfermedad incluyen análogos de 2- o 5-nitroimidazol. Por ejemplo, análogos de misonidazol (2-nitroimidazol) y metronidazol (5-nitroimidazol).

### 6. Enfermedad para diana de glicolisis

20 La diana de glicólisis de células de enfermedad se refiere al direccionamiento de agentes que están sobre-regulados por la utilización de glucosa en las células. Se pueden usar los compuestos empleados para tal fin con el fin de medir diversos parámetros en las células, tales como la proliferación de células tumorales, grados de inflamación. Los ligandos diana de glicólisis de células de enfermedad incluyen análogos de glucosa, galactosa, manosa y ribosa.

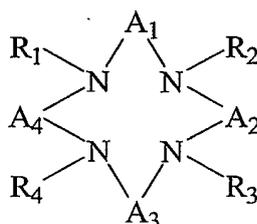
### B. Agentes de enlace

Si no están disponibles grupos amino o hidroxilo (por ejemplo, grupo funcional ácido), todavía se puede conjugar un ligando deseado al compuesto N4 (que puede o no estar radiomarcado), usando los métodos divulgados en la presente memoria por medio de adición de un agente de enlace, tal como etilendiamina, amino propanol, dietilentriammina, ácido aspártico, ácido poliaspártico, ácido glutámico, ácido poliglutámico o lisina. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.737.247 divulga diversos agentes de unión que se pueden usar. La patente de Estados Unidos 5.605.672 divulga diversos "esqueletos preferidos" que se pueden usar como agentes de unión. En determinadas realizaciones, se puede conjugar un compuesto N4 a un agente de unión, y se conjuga el agente de unión al ligando diana. En otras realizaciones, se puede usar más de un agente de unión; por ejemplo, se puede conjugar un compuesto N4 a un agente de unión, y se conjuga el agente de unión a un segundo agente de unión, en el que el segundo agente de unión se conjuga al ligando diana. En determinadas realizaciones, se pueden usar dos, tres, cuatro o más agentes de unión que se conjugan juntos, para conjugar un compuesto N4 y un ligando diana. No obstante, generalmente se prefiere únicamente usar un agente de unión individual para conjugar un compuesto N4 y un ligando diana.

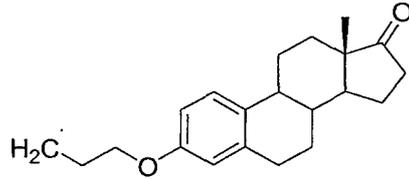
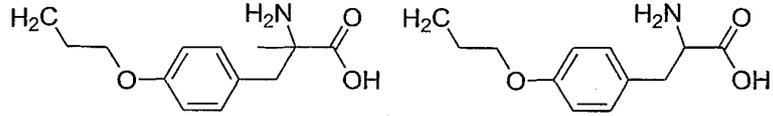
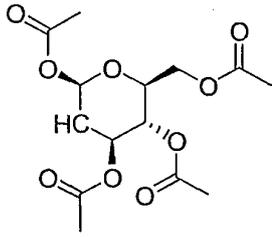
### C. Derivados N4

La expresión "derivado N4" se define en la presente memoria como un compuesto N4 que se ha conjugado a al menos otra molécula o átomo. En determinadas realizaciones el derivado comprende un compuesto N4 que tiene un átomo sometido a formación de quelato con el mismo. El derivado N4 puede comprender un compuesto N4 que se conjuga con un ligando diana (por ejemplo, por medio de un enlace covalente) y/o un agente de enlace (por ejemplo, por medio de un enlace covalente) y/o un quelato metálico (por ejemplo, por medio de interacción de formación de quelato).

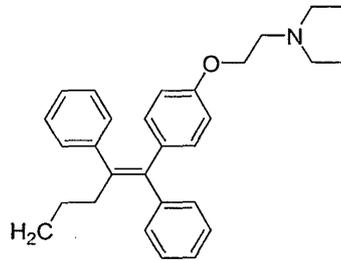
50 Determinadas realizaciones divulgadas en la presente memoria descriptiva se refieren a derivados N4, métodos para producir derivados N4, y usos de los derivados N4. En determinadas realizaciones, un derivado N4 es un compuesto que tiene la fórmula:



55 en la que A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub> son alquilo; y en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se escogen cada uno independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno,

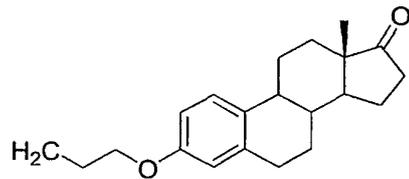
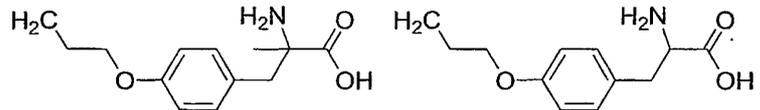
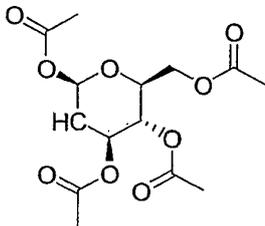


5 y

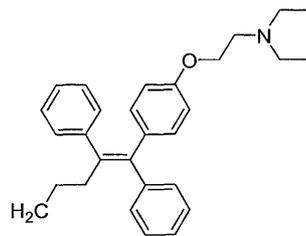


en la que R<sub>4</sub> se escoge entre el grupo que consiste en

10



15 y



El derivado N4 puede tener un átomo metálico sometido a formación de quelato con el mismo (es decir, el derivado N4 puede estar marcado con un radioisótopo). El átomo metálico puede ser radioactivo o no radioactivo.

20

#### D. Marcaje con radioisótopos

Para facilitar determinadas realizaciones que implican, por ejemplo, la formación de imágenes o el uso de un derivado N4 como una sustancia quimioterapéutica, se puede someter un radioisótopo a formación de quelato con el derivado N4. Por ejemplo, se puede conjugar un derivado N4 (preferentemente se somete a formación de quelato) con  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{183}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{183}\text{Gd}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{45}\text{Ti}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  o  $^{62}\text{Cu}$ .

Generalmente, se piensa que se puede usar prácticamente cualquier emisor- $\alpha$ , $\beta$ , emisor- $\gamma$  o emisor- $\beta$ , $\gamma$  junto con la invención. Los emisores  $\alpha$  preferidos incluyen bismuto-213, astato-211 y radio-223. 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  $^{212}\text{Bi}$ . También se prevé que las sustancias paramagnéticas, tales como Gd, Mn, Cu o Fe se puede someter a formación de quelato con derivados N4 para su uso junto con la presente invención.

En la formación de radio-imágenes, el radiomarcador normalmente es un radionúclido de emisión de radiación gamma y el radiotrazador normalmente se localiza usando una cámara de detección de radiación gamma (con frecuencia, este proceso se denomina escintigrafía gamma). El sitio sometido a formación de imagen se detecta debido a que el radiotrazado escogido se localiza bien en un sitio patológico (denominado contraste positivo) o bien, de manera alternativa, el radiotrazador se escoge de manera específica para que no se localice en dichos sitios patológicos (denominado contraste negativo).

Se conoce varios radionúclidos que son útiles para la formación de radio-imágenes y radio-inmunoterapia, incluyendo  $^{67}\text{Ga}$ / $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{169}\text{Yb}$  o  $^{186}\text{Re}/^{188}\text{Re}$ . Debido a mejores características de formación de imágenes y menor precio, se han llevado a cabo intentos para sustituir o proporcionar una alternativa frente a los compuestos marcados  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{111}\text{In}$  con los correspondientes compuestos marcados de  $^{99m}\text{Tc}$  cuando resulte posible. Debido a las características favorables así como al precio extremadamente bajo (0,21\$/mCi), se prefiere  $^{99m}\text{Tc}$  para marcar las sustancias radio-farmacéuticas. Aunque se ha presentado que el conjugado DTPA-fármaco se puede marcar con  $^{99m}\text{Tc}$  de manera eficaz (Mathias et al., 1997), el resto DTPA no experimenta formación de quelato con  $^{99m}\text{Tc}$  de forma tan estable como con  $^{111}\text{In}$  (Goldsmith, 1997).

Se puede considerar un número de factores para la formación óptima de radio-imágenes en humanos. Para maximizar la eficacia de detección, normalmente se prefiere un radionúclido que emita energía gamma en el intervalo de 100 a 200 eV. Para minimizar la dosis de radiación absorbida por el paciente, la semi-vida física del radionúclido debería ser tan corta como permita el procedimiento de formación de imágenes. Para permitir la ejecución de los exámenes en cualquier día y a cualquier hora del día, resulta ventajoso disponer de una fuente de radionúclido siempre disponible en el sitio clínico. Con frecuencia,  $^{99m}\text{Tc}$  es un radionúclido preferido ya que emite radiación gamma a 140 keV, tiene una semi-vida física de 6 horas, y se encuentra fácilmente disponible en el sitio usando un generador de molibdeno-99/tecnecio-99m.

En determinadas realizaciones, el derivado N4 se puede marcar (por ejemplo, se puede someter a formación de quelato) con  $^{68}\text{Ga}$  para la formación de imágenes de PET o  $^{188}\text{Re}$  (un emisor beta y gamma) para la terapia de radionúclidos interna. Como se ha comentado anteriormente,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  y  $^{188}\text{Re}$  se pueden obtener a partir de generadores que sean accesibles y razonables. Cuando se produce la formación de quelato con metales no radioactivos (por ejemplo, cobre, cobalto, platino, hierro, arsénico, renio, germanio), se puede usar el derivado N4 frío (no radioactivo) en forma de agente quimioterapéutico metálico. Un aspecto del carácter único de esta tecnología consiste en el uso de los mismos precursores de sulfonato de PET o agentes yodados de SPECT para reacción con un compuesto N4 que es un agente quelantes. Posteriormente, se puede someter el producto final a formación de quelato con metales que sean más sencillos, más accesibles y razonables.

Tecnecio tiene un número de estados de oxidación: +1, +2, +4, +5, +6 y +7. Cuando se encuentra en estado de oxidación +1, se denomina Tc MIBI. Normalmente Tc MIBI se produce con una reacción térmica (Seabold et al, 1999). Para determinadas realizaciones que implican la formación de quelato de Tc con un compuesto N4 o un derivado de N4, normalmente es preferible que Tc se encuentre en un estado de oxidación +4. Este estado de oxidación es ideal para la formación del quelato con un compuesto N4 o un derivado N4. De este modo, en la formación de un complejo de tecnecio radioactivo con conjugados de fármaco, normalmente se hace reaccionar el complejo de tecnecio, preferentemente una sal de pertecnetato  $^{99m}\text{Tc}$ , con los conjugados de fármaco en presencia de un agente reductor.

El agente reductor preferido para su uso en la presente invención es un ion estannoso en forma de cloruro estannoso ( $\text{SnCl}_2$ ) para reducir Tc hasta su estado de oxidación +4. No obstante, se contempla que otros agentes reductores, tales como el ion ditionato o el ion ferroso pueden resultar útiles junto 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 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 cada aproximadamente 100 a aproximadamente 300 mCi de pertecnetato Tc. La cantidad más preferida es de aproximadamente 0,1 mg de  $\text{SnCl}_2$  por cada

aproximadamente 200 mCi de pertecnetato Tc y aproximadamente 2 ml de solución salina.

Además de la formación de imágenes de tumores con derivados N4 marcados con radionúclidos, se prevé que también se pueden usar estos compuestos para la formación de imágenes de tejidos relacionados con otras enfermedades, así como diagnósticos relacionados con cáncer y otras enfermedades. Por ejemplo, se contempla que los derivados N4 marcados con radionúclidos pueden resultar útiles para formar imágenes no solo de tumores, sino también de otras afecciones específicas de tejido, tales como infección, tejido hipóxico (accidente cerebrovascular), infarto de miocardio, células apoptóticas, enfermedad de Alzheimer y endometriosis. Una ventaja de la formación de imágenes que usa un derivado N4 que comprende un compuesto N4 radiomarcado que está conjugado a un ligando diana de tejido es que las propiedades de unión específicas del ligando diana de tejido concentran la señal radioactiva sobre el área de interés.

#### **E. Kit para la preparación de derivados N4 radiomarcados**

Se pueden proporcionar los complejos y los medios para la preparación de dichos complejos en una forma de kit que normalmente incluye un vial sellado que contiene una cantidad predeterminada de un derivado N4 y una cantidad suficiente de agente reductor para marcar el conjugado con un radionúclido. En algunas realizaciones, el kit incluye un radionúclido. En determinadas realizaciones adicionales, el radionúclido es <sup>99m</sup>Tc. El kit también puede contener materiales adjuntos farmacéuticos convencionales tales como, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la presión osmótica, tampones, conservantes, antioxidantes y similares.

En determinadas realizaciones, se incluyen un antioxidante y un agente quelante de transición en la composición con el fin de evitar la oxidación del derivado N4. En determinadas realizaciones, el antioxidante es vitamina C (ácido ascórbico). No obstante, se contempla que también se puede usar cualquier otro antioxidante conocido por los expertos en la técnica, tal como tocoferol, piridoxina, tiamina, o rutina. Los ejemplos de agentes de formación de quelato de transición para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, glucoheptonato, gluconato, glucarato, citrato y tartrato. Los componentes del kit pueden estar en forma líquida, congelada o seca. En determinadas realizaciones, los componentes del kit se pueden proporcionar en forma liofilizada.

#### **III. USO PARA DERIVADOS N4**

Los derivados N4 también se pueden usar con fines pronósticos. Se prevé que los derivados N4 se pueden administrar a un paciente que tiene un tumor. Se prevé que el uso de un compuesto N4 radiomarcado como estrategia de marcaje puede resultar eficaz con ligandos diana de receptores de enfermedad, marcadores de hipoxia, defectos de apoptosis, ciclos celulares de enfermedad, mecanismos funcionales de enfermedad y evaluación de eficacia de agentes farmacéuticos de estos procesos bioquímicos. La formación de imágenes se puede llevar a cabo para determinar la eficacia del derivado N4 frente a un problema específico del paciente relacionado con los receptores de enfermedad, marcadores de hipoxia, defectos de apoptosis, ciclos celulares de enfermedad, mecanismos funcionales de enfermedad y evaluación de la eficacia del agente farmacéutico sobre los procesos bioquímicos. Usando esta metodología los médicos pueden determinar de forma rápida qué derivado N4 es más eficaz para el paciente y diseñar la terapia correspondiente o modo de tratamiento. Este metodología posee ventajas significativas con respecto a los métodos que implicar escoger en primer lugar un fármaco y administrar una ronda de quimioterapia, lo cual puede implicar meses de tiempo del paciente, con un coste financiero y físico sustancial, antes de que se pueda determinar la eficacia del agente quimioterapéutico de cáncer.

La presente invención también se puede usar para monitorizar el avance de los primeros pacientes que han experimentado la quimioterapia o el tratamiento de radiación de forma satisfactoria, para determinar si el cáncer ha remitido o se encuentra en fase de metástasis. Las personas con antecedentes familiares de cáncer o a las que se haya diagnosticado gen(es) asociado(s) a cáncer pueden experimentar la monitorización por medio de profesionales sanitarios usando la tecnología de la presente invención. También se pueden usar los métodos y los agentes farmacéuticos de la presente invención por parte de un profesional sanitario para monitorizar si el cáncer ha comenzado a desarrollarse en una persona con factores de riesgo de cáncer, tales como la exposición ambiental a agentes cancerígenos.

#### **IV. EVALUACIÓN DE FÁRMACO**

Se pueden aplicar determinados ligandos basados en fármacos de la presente invención en la medición de la respuesta farmacológica de un sujeto a un fármaco. Se puede medir un amplio intervalo de parámetros para determinar la respuesta de un sujeto a la administración de un fármaco. El experto común en la técnica está familiarizado con los tipos de respuestas que se pueden medir. Estas respuestas dependen en parte de diversos factores, incluyendo el fármaco particular que es objeto de evaluación, la enfermedad particular o afección para la cual el paciente es objeto de tratamiento, y las características del sujeto. Se pueden aplicar los agentes radiomarcados para medir la evaluación del fármaco.

## V. PREPARACIONES FARMACÉUTICAS

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de un derivado N4 de la presente invención disuelto o dispersado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "sustancia farmacéutica" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen ninguna reacción adversa, alérgica o impropia cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según resulte apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un derivado N4, tal como un derivado N4 radiomarcado, o un ingrediente activo adicional se conoce por parte del experto en la técnica a la luz de la presente divulgación, como queda ejemplificado por medio de Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Printing Company, 1990. Además, para administración a animales (por ejemplo, humanos), se entiende que las preparaciones deberían satisfacer los patrones de esterilidad, carácter pirogénico, seguridad general y pureza requeridos por FDA Office of Biological Standards.

Según se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualesquiera disolventes, medios de dispersión, revestimientos, tensoactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, materiales similares y su combinación, como se conoce por parte del experto común en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Exceptuando que en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Los derivados N4 de la presente invención pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se administran en forma sólida, líquida o aerosol, y si es necesario que sea estéril para dichas rutas de administración tal como inyección. La presente invención se puede administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntiva, intravascular, mucosal, intrapericardiaca, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que baña directamente dianocitos, por medio de un catéter, por medio de lavado, en composiciones de lípidos (por ejemplo, liposomas), o por medio de otro método o cualquier combinación de los anteriores como se sabe por parte del experto común en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Printing Company, 1990).

Se puede determinar la cantidad de dosificación real de una composición de la presente invención administrada a un paciente por medio de factores físicos y fisiológicos, tales como peso corporal, gravedad de la afección, tipo de enfermedad objeto de tratamiento, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y ruta de administración. El médico responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración del(de los) ingrediente(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis apropiada(s) para el sujeto individual.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente un 0,1 % de derivado N4. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 75 % en peso de la unidad, o entre aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 60 %, por ejemplo, en cualquier intervalo que se derive del mismo. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/kg/peso corporal, 0,5 mg/kg/peso corporal, 1 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 20 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 30 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 40 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 75 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 750 mg/kg/peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable del mismo. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números listados en la presente memoria, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, etc., basado en los números descritos anteriormente.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos puede aportarse por medio de conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero sin limitarse a parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o sus combinaciones.

El derivado N4 se puede formular en una composición en forma de base libre, neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales formadas con grupos carboxilo libres procedentes de bases inorgánicas tales como por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxido férrico; o tales como bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones en las cuales la composición se encuentra en forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, pero sin limitarse a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietileno glicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y sus combinaciones. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por medio del uso de un revestimiento, tal como lecitina; por medio del mantenimiento del tamaño de partícula requerido por medio de dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, lípidos o polioles líquidos; por medio del uso de tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de dichos métodos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o sus combinaciones.

Se preparan soluciones inyectables estériles por medio de la incorporación del derivado N4 en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversas cantidades de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, se preparan las dispersiones por medio de la incorporación de diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de los polvos estériles para la preparación de suspensiones, emulsiones o soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío o técnicas de secado por congelación que proporcionan una potencia del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de su medio líquido estéril previamente filtrado. De manera apropiada el medio líquido se debe tamponar si fuese necesario y, en primer lugar, se debe convertir el diluyente líquido en isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para inyección directa, en las cuales se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, proporcionando elevadas concentraciones de los agentes activos en un área pequeña.

La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se aprecia que la contaminación por endotoxinas debería minimizarse en un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína.

En realizaciones particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable se puede proporcionar por medio del uso de agentes retardadores de absorción en las composiciones, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o sus combinaciones.

## VI. TERAPIA DE COMBINACIÓN

Es un aspecto de la presente invención que los derivados N4, tales como un derivado N4 radiomarcado, de la presente invención se pueden usar en combinación con otro agente o método de terapia, preferentemente otro tratamiento de cáncer. El derivado N4 puede preceder o seguir a otro tratamiento con agente por medio de intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones en las cuales el otro agente y la estructura de expresión se aplican por separado a la célula, generalmente se debe garantizar que no transcurra un período de tiempo significativo entre el tiempo de cada administración, de manera que el agente y la estructura de expresión todavía sean capaces de ejercer ventajosamente un efecto combinado sobre la célula. Por ejemplo, en tal caso, se contempla que es posible poner en contacto la célula, tejido u organismo con dos, tres, cuatro o más modalidades de forma sustancialmente simultánea (es decir, en menos de aproximadamente un minuto) con el derivado N4. En otros aspectos, se puede administrar uno o más agentes en aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 37 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 39 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 41 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 43 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 45 horas, aproximadamente 46 horas, aproximadamente 47 horas, a aproximadamente 48 horas o más antes y/o después de administrar el derivado N4. En determinadas realizaciones, se puede administrar un agente de aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días, a aproximadamente 21 días antes y/o después de la administración del derivado N4. En algunas situaciones, puede resultar deseable ampliar el período de tiempo para el tratamiento de forma significativa, no obstante, de forma que transcurran varias semanas (por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7 o

aproximadamente 8 semanas o más) entre las respectivas administraciones.

Se pueden emplear varias combinaciones, el derivado N4 es "A" y el agente secundario, que puede ser cualquier otro agente terapéutico, es "B".

5 A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

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

10 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración de las estructuras de expresión terapéutica de la presente invención a un paciente adopta los protocolos generales de administración de sustancias quimioterapéuticas, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, del vector. Cabe esperar que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla la posibilidad de aplicar varias terapias convencionales, así como intervención quirúrgica, en combinación con el derivado N4. Estas terapias incluyen, pero sin limitarse a, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, terapia génica y cirugía.

#### 20 A. Quimioterapia

Las terapias contra el cáncer incluyen también varias terapias de combinación con tratamientos tanto químicos como de radiación. La quimioterapia de combinación incluye, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalan, clorambucilo, busulfan, nitrosuera, dactinomycin, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etoposido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión a receptor de estrógenos, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de transferasa de proteína-farnesilo, cisplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o variante derivado de los anteriores.

#### 30 B. Radioterapia

Otros factores que provocan daño en ADN y que se han usado ampliamente incluyen los que se conoce comúnmente como rayos-γ, rayos-X y/o la administración directa de radioisótopos a las células tumorales. También se contemplan otras formas de factores que provocan daño en ADN tales como microondas y radiación-UV. De la manera más probable, estos factores ejercen un intervalo amplio de daño sobre ADN, sobre los precursores de ADN, sobre la replicación y reparación de ADN y sobre el montaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para rayos-X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgen durante períodos prolongados de tiempo (de 3 a 4 semanas) a dosis individuales de 2000 a 6000 roentgen. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente dependiendo de la semi-vida del isótopo, la intensidad y el tipo de radiación emitida, y la captación por parte de las células neoplásicas. Los términos "contacto" y "exposición" cuando se aplican a una célula, se usan en la presente memoria para describir el proceso por medio del cual se administran una estructura terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico a un dianocito o se colocan en yuxtaposición directa con el dianocito. Con el fin de lograr la muerte celular o estasis, se administran ambos agentes a una célula en una cantidad combinada eficaz para provocar la muerte de la célula o evitar su división.

#### 45 C. Inmunoterapia

Generalmente, las sustancias inmunoterapéuticas, se basan en el uso de células de efecto inmune y moléculas diana y la destrucción de células cancerígenas. El efecto inmune puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador sobre la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como efector de terapia o puede reclutar a otras células para que lleven a cabo realmente la muerte celular. El anticuerpo también se puede conjugar con un fármaco o toxina (sustancia quimioterapéutica, radionúclido, cadena de ricina A, toxina de cólera, toxina pertusis, etc.) y servir simplemente como agente diana. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que transporta una molécula superficial que interacciona, ya sea directa o indirectamente, con un dianocito tumoral. Diversas células de efector incluyen células T citotóxicas y células NK.

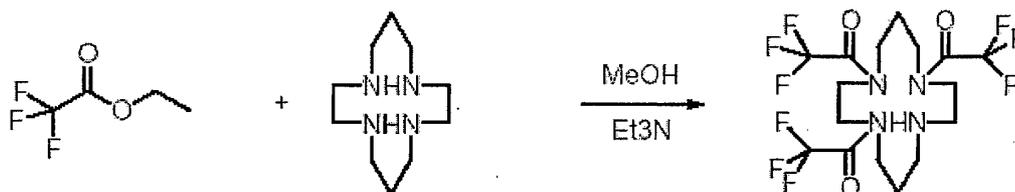
De este modo, se puede usar inmunoterapia como parte de una terapia combinada, posiblemente junto con terapia génica. El enfoque general para la terapia combinada se comenta a continuación. Generalmente, una célula tumoral debe portar cierto marcador que sea susceptible experimentar direccionamiento, es decir, que no esté presente sobre la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de ellos puede resultar apropiado para el experimenta direccionamiento en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, Antígeno de Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155.

**D. Terapia génica**

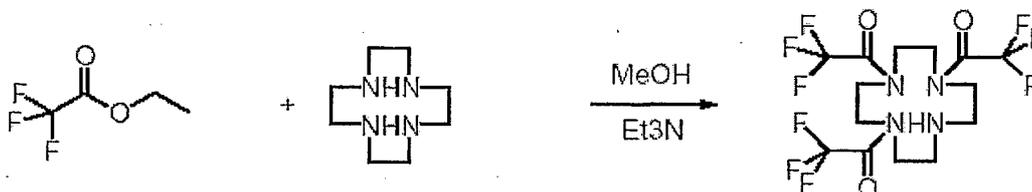
En otra realización, el tratamiento secundario es una terapia génica secundaria en la cual se administra un polinucleótido terapéutico antes, después o al mismo tiempo que un primer agente terapéutico. La administración del agente terapéutico junto con un vector que codifica un producto de un gen tiene un efecto combinado anti-proliferador sobre los tejidos diana.

**E. Cirugía**

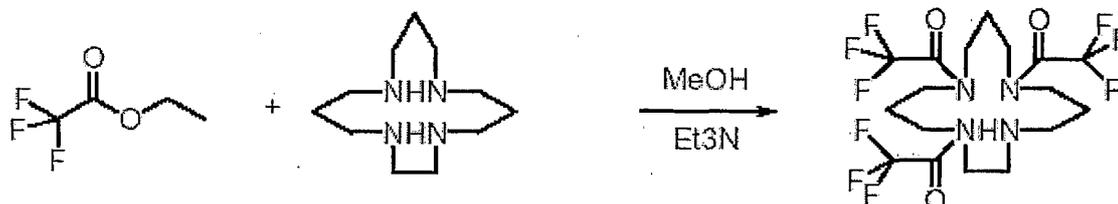
Aproximadamente un 60 % de las personas con cáncer experimenta cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, diagnóstica o de estadificación, curativa o paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento de cáncer que se puede usar junto con otras terapias, tales como el tratamiento: divulgado en la presente memoria de quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas. La cirugía curativa incluye la resección en la cual parte o la totalidad del tejido cancerígeno se retira física o parcialmente, se escinde y/o se destruye. La resección del tumor se refiere a la retirada física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento quirúrgico incluye la cirugía láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía con control microscópico (cirugía de Mohs). Además se contempla que la presente invención se puede usar junto con la retirada de cánceres superficiales, precánceres o cantidades eventuales de tejido normal.

**VII. EJEMPLOS****Ejemplo 1 (Referencia)****Protección de compuestos N4 para sustitutos mono-N4****A. Protección de ciclama con trifluoroacetato de etilo**

Se colocan 4,006 g (20 mmol) de ciclama (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecano) en la solución de 2,79 ml de trietil amina en 15 ml de metanol seco. Se añadieron 6,92 ml de trifluoroacetato de etilo gota a gota a la solución anterior a temperatura ambiente con agitación. La adición continuó durante un período de 5 minutos. Se enfrió la mezcla de reacción homogénea con un baño de hielo-agua para controlar el carácter exotérmico moderado. Se continuó la agitación bajo N<sub>2</sub> durante 5 horas. Se retiraron los volátiles a vacío. Se hizo pasar el residuo a través de un tapón pequeño de sílice (25 g) y se sometió a elución con EtOAc de 100 %. Se concentró el disolvente sometido a elución para proporcionar el producto en forma de espuma blanca (8,972 g, 95 % de rendimiento).

**B. Protección de cicleno con trifluoroacetato de etilo**

Se usaron 3,445 mg (20 mmol) de cicleno (1,4,7,10-tetraazacyclododecano) en lugar de ciclama en la presente reacción siguiendo el método anterior (Ejemplo 1, A) (8,276 g, rendimiento de un 93 %).

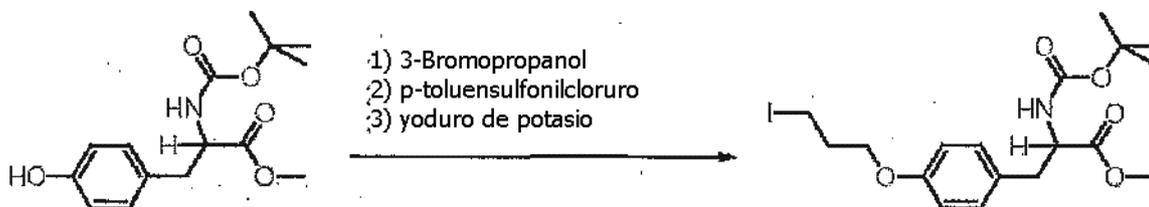
**C. Protección de ciclal con trifluoroacetato de etilo**

Se usaron 4,287 mg (20 mmol) de ciclal (1,4,8,12-tetraazaciclopentadecano) en lugar de ciclama en la presente reacción siguiendo el método anterior (Ejemplo 1, A) (9,227 g, rendimiento de un 95 %).

### Ejemplo 2 (Referencia)

5

#### Preparación de derivados de tirosina sulfonados y yodados



#### 10 A. O-alkilación de tirosina con 3-bromopropanol

Se añadieron 2953,3 mg (10 mmol) de éter metílico de N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosina (a continuación Boc-Tyr) en 30 ml de solución de metanol (anhidro) en 50 ml de solución de metanol que contenía 540,2 mg (10 mmol) de metóxido de sodio. Se añadieron 1363  $\mu$ l (15 mmol) de 3-bromopropanol a la solución de Boc-Tyr anterior. Se agitó la mezcla a 70 °C durante 6 horas y después a temperatura ambiente durante 20 minutos bajo atmósfera de nitrógeno. Se disolvió la mezcla en 20 ml de acetato de etilo y posteriormente se evaporó a presión reducida con el fin de retirar los volátiles. Se lavó la fase orgánica con agua (2 x 20 ml), se secó con sulfato de magnesio anhidro y se retiró el disolvente usando un evaporador rotatorio. Se obtuvo un líquido transparente, que se volvió un sólido blanco, hidroxipropil-Boc-Tyr (a continuación HOPr-Boc-Tyr), 2,9158 g (rendimiento de un 82,5 %) por medio de cromatografía en columna usando un sistema de hexano-acetato de etilo de gradiente (de 10:1 a 1:1).

#### 25 B. Tosilación de 3-hidroxipropil-Boc-Tyr

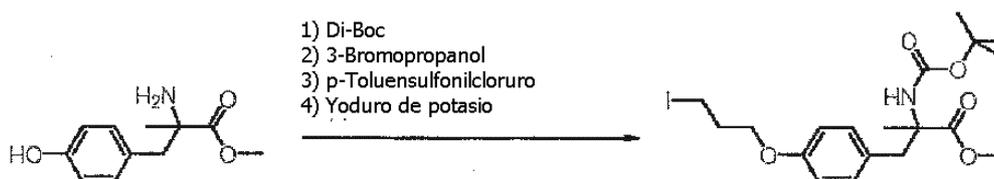
Se vertieron 1413,6 mg (4,0 mmol) de hidroxipropil-Boc-Tyr (a continuación HOPr-Boc-Tyr) en 10 ml de piridina(anhidra) en la solución de 1143,9 mg (6,0 mmol) de cloruro de p-toluensulfonilo en 20 ml de piridina (anhidra) con agitación en baño de hielo-agua bajo atmósfera de nitrógeno. Se colocó la mezcla en un frigorífico durante la noche. Se pudo seguir la mezcla de reacción por medio del desarrollo de color, seguido de la separación por medio de filtro de hidrocloreuro de piridina. Se evaporó el filtrado a presión reducida con el fin de retirar piridina. Se obtuvo un sólido blanco, 1,8123 g (rendimiento de un 87,9 %) por medio de cromatografía en columna usando un sistema de hexano-acetato de etilo de gradiente (de 10:1 a 2:1).

#### 30 C. Síntesis de 3-yodopropil-Boc-Tyr (a continuación I-Pr-Boc-Tyr)

Se vertieron 1992,1 mg (12 mmol) de yoduro de potasio en la solución de 1522,8 mg (3,0 mmol) de TsO-Pr-Boc-Tyr en 15 ml de acetonitrilo (anhidro). No se disolvió la mezcla por completo en el disolvente y se permitió el reflujo durante 2 horas. Se filtró el sólido y se evaporó la solución filtrada para retirar acetonitrilo. Se aisló el residuo por medio de cromatografía en columna usando un sistema de hexano-acetato de etilo de gradiente (de 10:1 a 10:4). Se obtuvieron 1324,5 g de líquido transparente (rendimiento de un 95,3 %).

### 40 Ejemplo 3

#### Preparación de derivados de alfa-metiltirosina sulfonados y yodados



45

#### A. Protección de alfa-metil tirosina

Se añadieron 13,095 g (60 mmol) de dicarbonato de di-terc-butilo a la solución de 8,370 g (40 mmol) de alfa-metiltirosina (a continuación AMT) y 11,2 ml (80 mmol) de trietil amina (anhidra) en 40 ml de DMF (anhidro). Se evaporó la mezcla a presión reducida seguido de filtración para obtener un sólido tras agitación durante la noche a temperatura ambiente. Se obtuvieron 11,217 g (un 90,6 % de rendimiento) de un sólido blanco (a continuación Boc-

50

AMT) por medio de aislamiento en columna del residuo usando un sistema de hexano-acetato de etilo de gradiente (de 10:1 a 10:7).

#### B. O-alkilación de Boc-AMT con 3-bromopropanol

5 Se usaron 3,094 (10 mmol) de Boc-AMT y se siguió usando el método anterior (Ejemplo 2, B). Se obtuvo un líquido transparente, que se convirtió en sólido blanco (a continuación HO-Pr-Boc-AMT), 3,289 g (rendimiento de 89,5 %), por medio de cromatografía en columna usando un sistema de hexano-acetato de etilo de gradiente (de 10:1 a 10:5).

#### C. Tosilación de 3-HO-Pr-Boc-AMT

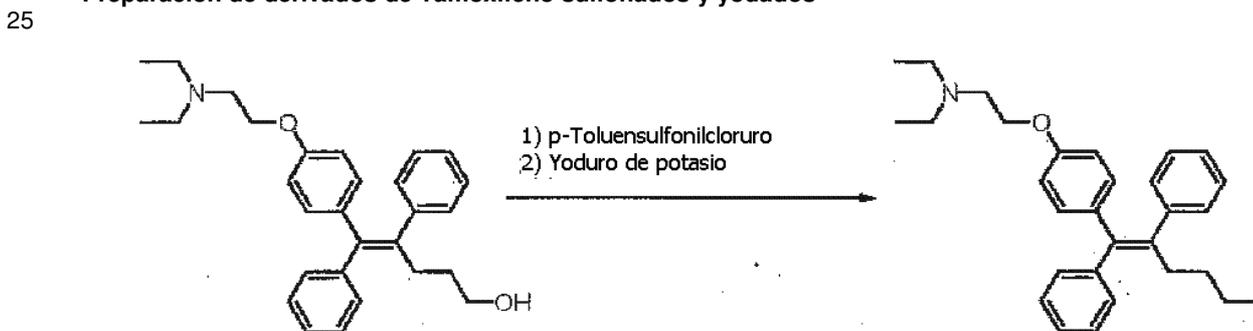
10 Se usaron 2,940 g (8,0 mmol) de HO-Pr-Boc-AMT y se siguió usando el método anterior 2-3). Se obtuvo un sólido blanco (a continuación TsO-Pr-Boc-AMT), 3,483 g (83,7 % de rendimiento) por medio de cromatografía en columna usando un sistema de hexano-acetato de etilo de gradiente (de 10:1 a 10:5).

#### D. Síntesis de 3-yodopropil-Boc-Tyr (a continuación I-Pr-Boc-Tyr)

15 Se usaron 3,130 g (6,0 mmol) de TsO-Pr-Boc-AMT y se siguió usando el método anterior 2-4). Se obtuvo un líquido transparente (a continuación I-Pr-Boc-AMT), 2,801 g (rendimiento de un 97,8 %) por medio de cromatografía en columna usando un sistema de hexano-acetato de etilo de gradiente (de 10:1 a 10:4).

#### Ejemplo 4 (Referencia)

#### Preparación de derivados de Tamoxifeno sulfonados y yodados



#### A. Tosilación de 4-hidroximetil-N,N-dimetil tamoxifeno

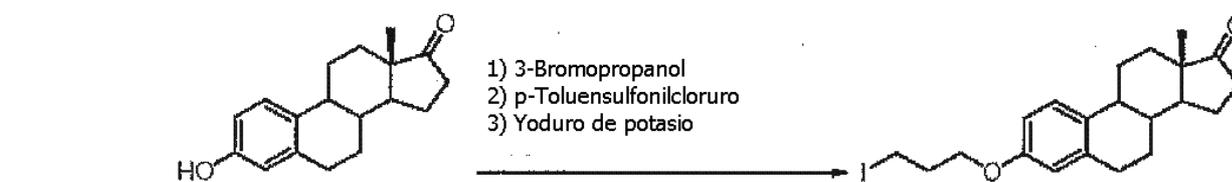
30 Se usaron 1,289 g (8,0 mmol) de 4-hidroximetil-N,N-dietil tamoxifeno (a continuación HO-TMX) y se siguió según el método anterior 2-3). Se obtuvo un líquido amarillo claro (a continuación TsO-TMX), 1,445 g (rendimiento de un 82,5 %), por medio de cromatografía en columna usando un gradiente de hexano : éter etílico : trietil amina = de 100 : 100 : 5 a 100 : 100 : 20).

#### B. Síntesis de 4-yodometil-N,N-dietilo

35 Se usaron 1,168 g (2,0 mmol) de I-TMX y se siguió según el método anterior (Ejemplo 2, D). Se obtuvo un líquido transparente (a continuación I-TMX), 1,058 g (rendimiento de un 98,1 %) tras hacer pasar por cromatografía en columna usando un gradiente de hexano : éter etílico: trietil amina = de 100 : 100 : 1 a 100 : 100 : 10).

#### Ejemplo 5 (Referencia)

#### Preparación de derivados de estrona sulfonados y yodados



**A. O-alkilación de estrona con 3-bromopropanol**

Se usaron 2,703 g (10 mmol) de estrona y se siguió con el método 2-2) anterior. Se obtuvo un líquido transparente, que se convirtió en sólido blanco (a continuación HO-Pr-EST), 2,405 g (rendimiento de un 73,2 %) por medio de cromatografía en columna usando un sistema de hexano-acetato de etilo de gradiente (de 10:1 a 10:5).

**B. Tosilación de HO-Pr-EST**

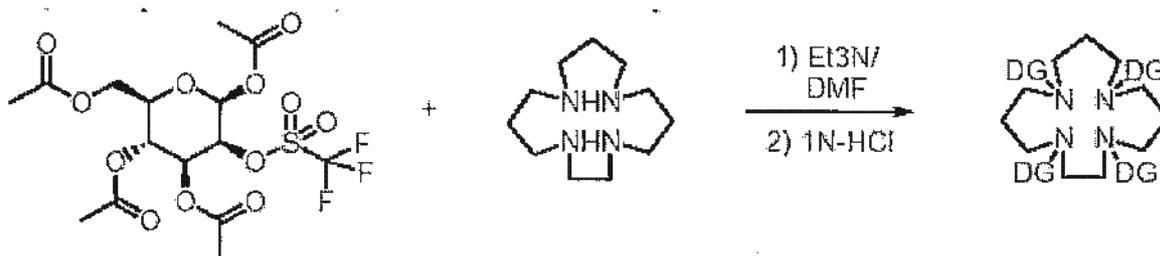
Se usaron 1,971 g (6,0 mmol) de HO-Pr-EST y se siguió según el método anterior 2-3). Se obtuvo un sólido blanco (a continuación TsO-Pr-EST), 2,253 g (rendimiento de 77,8 %) por medio de cromatografía en columna usando un sistema de hexano-acetato de etilo de gradiente (de 10:1 a 10:5).

**C. Síntesis de 3-yodopropil-EST**

Se usaron 1,930 g (4,0 mmol) de TSO-Pr-EST y se siguió según el método anterior 2-4). Se obtuvo un líquido transparente (a continuación I-Pr-EST), 1,720 g (rendimiento de 98,1 %) por medio de cromatografía en columna usando un sistema de hexano-acetato de etilo de gradiente (de 10:1 a 10:4).

**Ejemplo 6 (Referencia)**

**Reacción de ciclal con 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-O-trifluorometanosulfonil-beta-Dmanopiranososa (precursor para síntesis de FDG)**

**A. Ejemplo de DG-ciclal N,N',N'',N'''-tetrasustituido**

Se colocan 200 mg (0,416 mmol) de 1,2,4,6-tetra-o-acetil-2-O-trifluorometanosulfonil-beta-D-manopiranososa en 116 microml (0,832 mmol) de la solución de 22,3 mg (0,104 mmol) de ciclal y 84,2 mg de trietil amina, en 10 ml DMF (anhidro). Se agita la mezcla a 50 °C durante 16 horas bajo atmósfera de nitrógeno y se evapora para retirar los volátiles. Se coloca el residuo en 6 ml de 1,4-dioxano, posteriormente aparece un precipitado blanco. Se descarta el sólido por medio de filtración. Se añade 1 ml de HCl 4 N en solución de 1,4-dioxano, gota a gota, para filtrar la solución, y a continuación se produce la precipitación de un polvo de color marrón claro. Se recogió el sólido con filtración y se secó en un liofilizador.

Se disolvió el sólido en 3 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N y se agitó durante 30 minutos. Se añadió  $\text{NaHCO}_3$  1 N a la solución anterior hasta un pH de aproximadamente 9. Se purificó la solución con membrana (valor límite de peso molecular < 500) y se evaporó en un liofilizador. Se recogió el sólido de color marrón claro, 63,2 mg (rendimiento de un 67,2 %).

**B. Ejemplo de DG-ciclal N,N',N''-trisustituido**

Se colocan 200 mg (0,416 mmol) de 1,3,4,6-tetra-o-acetil-2-O-trifluorometanosulfonil-beta-D-manopiranososa en la 116 ml (0,832 mmol) de solución de 29,6 mg (0,138 mmol) de ciclal y 84,2 mg de trietil amina, en 10 ml de DMF (anhidro). Se agitó la mezcla a 50 grados durante 16 horas bajo atmósfera de nitrógeno y se evaporó para retirar los volátiles. Se colocó el residuo en 6 ml de 1,4-dioxano, al tiempo que apareció un precipitado blanco. Se descartó el sólido por medio de filtración. Se añadió 1 ml de HCl 4 N en solución de 1,4-dioxano, gota a gota, para filtrar la solución, y a continuación apareció un polvo precipitado de color marrón claro.

Se recogió el sólido con filtración y se secó en un liofilizador. Se disolvió el sólido en 3 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N y se agitó durante 30 minutos. Se añadió  $\text{NaHCO}_3$  1 N a la solución anterior a pH de aproximadamente 9. Se purificó la solución con membrana (valor límite de peso molecular < 500) y se evaporó en un liofilizador. Se recogieron 58,8 mg (rendimiento de un 57,4 %) de un sólido de color marrón claro.

**C. Ejemplo de DG-ciclal N,N'-disustituido**

Se colocan 200 mg (0,416 mmol) de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-O-trifluorometanosulfonil-beta-D-manopiranososa en 116 microml (0,832 mmol) de una solución de 44,6 mg (0,208 mmol) de ciclal y 84,2 mg de trietil amina, en 10 ml de DMF (anhidro). Se agitó la mezcla a 50 grados durante 16 horas bajo atmósfera de nitrógeno y se evaporó para retirar los volátiles. Se colocó el residuo en 6 ml de 1,4-dioxano, al tiempo que apareció un precipitado blanco. Se descartó el sólido por medio de filtración. Se añadió 1 ml de HCl 4 N en solución de 1,4-dioxano, gota a gota, para filtrar la solución, y a continuación apareció un polvo precipitado de color marrón claro. Se recogió el sólido con filtración y se secó en un liofilizador.

Se disolvió el sólido en 3 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N y se agitó durante 30 minutos. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> 1 N a la solución anterior a pH de aproximadamente 9. Se purificó la solución con membrana (valor límite de peso molecular < 500) y se evaporó en un liofilizador. Se disolvió el residuo en el mínimo de agua. Se recogieron 23,9 mg (rendimiento de un 19,8 %) de un sólido de color marrón claro por medio de un liofilizador tras el aislamiento de Sephadex G-75.

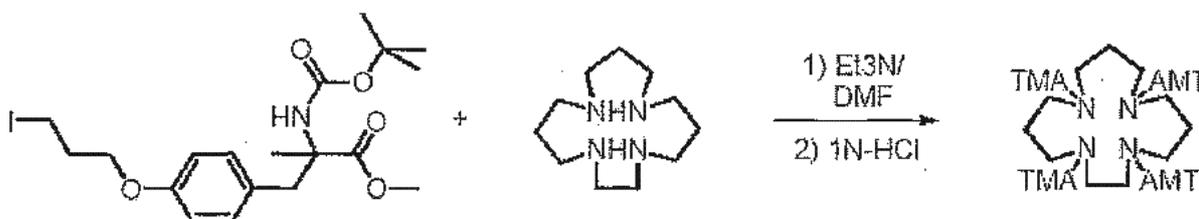
**D. Ejemplo de DG-ciclal N-mono sustituido**

Se ponen 200 mg (0,416 mmol) de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-O-trifluorometanosulfonil-beta-D-manopiranososa en 116 microml (0,832 mmol) de la solución de 209 mg (0,416 mmol) de N,N',N''-tris (trifluoroacetil)-ciclal (del Ejemplo 1, C) y 84,2 mg de trietil amina en 10 ml de DMF (anhidro). Se agitó la mezcla a 50 °C durante 6 horas bajo atmósfera de nitrógeno y se evaporó para retirar los volátiles.

Se colocó el residuo en 6 ml de 1,4-dioxano, posteriormente apareció un precipitado blanco. Se descartó el sólido por medio de filtración. Se añadió, gota a gota, 1 ml de HCl 4 N en solución de 1,4-dioxano, a la solución de filtrado, posteriormente precipitó un polvo de color marrón claro. Se disolvió el sólido recogido con filtración en 3 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N y se agitó durante 30 minutos. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> 1 N a la solución anterior a pH de aproximadamente 9. Se evaporó la solución en un liofilizador y se disolvió en el agua mínima. Se recogieron 123,3 mg (rendimiento de un 78,7 %) de un sólido blanco a través de liofilizador tras aislamiento en Sephadex G-25.

**Ejemplo 7****Reacción de ciclal con alfa metiltirosina yodada (AMT)**

Se podrían usar unas condiciones de reacción similares para preparar otros conjugados de ciclal-agente diana.

**A. Ejemplo de AMT N,N',N'',N'''-tetra-sustituido**

Se colocan 286,4 mg (0,6 mmol) de I-AMT en la solución de 32,2 mg (0,15 mmol) de ciclal y 83,6 µl de trietil amina (0,6 mmol) en 10 ml de DMF (anhidro). Se agitó la mezcla a 70 °C durante 16 horas bajo atmósfera de nitrógeno y se evaporó para retirar los volátiles. Se vertieron 5 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N en la solución del residuo de evaporación en 5 ml de etanol. Se calentó la mezcla de reacción a 60 °C durante 30 minutos sin condensador y se enfrió. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> 1 N a la solución anterior hasta pH de aproximadamente 9. Se retiró el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en el agua mínima. Se recogieron 91,3 mg (rendimiento de un 52,7 %) de un sólido blanco a través de un liofilizador tras aislamiento en Sephadex G-75.

**B. Ejemplo de AMT N,N',N''-tri-sustituido**

Se colocan 286,4 mg (0,6 mmol) de I-AMT en la solución de 42,9 mg (0,2 mmol) y 83,6 microl (0,6 mmol) de trietil amina en 10 ml de DMF (anhidro). Se agitó la mezcla a 70 grados durante 16 horas bajo atmósfera de nitrógeno y se evaporó para retirar los volátiles.

Se vertieron 5 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N en la solución del residuo de evaporación en 5 ml de etanol. Se calentó la mezcla de reacción a 60 grados durante 30 minutos sin condensador y se enfrió. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> 1 N a la solución anterior hasta pH de aproximadamente 9. Se retiró el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en el mínimo de agua. Se recogieron 76,7 mg (rendimiento de un 41,7 %) de un sólido blanco a

través de un liofilizador tras aislamiento en Sephadex G-75.

### C. Ejemplo de AMT N,N'-di-sustituido

5 Se colocan 286,4 mg (0,6 mmol) de I-AMT en la solución de 64,3 mg (0,3 mmol) de ciclal y 83,6  $\mu$ l de trietil amina (0,6 mmol) en 10 ml de DMF (anhidro). Se agitó la mezcla a 70 °C durante 16 horas bajo atmósfera de nitrógeno y se evaporó para retirar los volátiles. Se vertieron 5 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N en la solución del residuo de evaporación en 5 ml de etanol. Se calentó la mezcla de reacción a 60 °C durante 30 minutos sin condensador y se enfrió. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> 1 N a la solución anterior hasta pH de aproximadamente 9. Se retiró el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en el agua mínima. Se recogieron 52,3 mg (rendimiento de un 25,9 %) de un sólido blanco a través de un liofilizador tras aislamiento en Sephadex G-75.

### D. Ejemplo de AMT N-mono sustituido

15 Se colocan 286,4 mg (0,6 mmol) de I-AMT en la solución de 301,4 mg (0,6 mmol) de N,N',N"-tris(trifluoroacetil)-ciclal (del Ejemplo 1-3) y 83,6 microl de trietil amina (0,6 mmol) en 10 ml de DMF (anhidro). Se agitó la mezcla a 70 °C durante 16 horas bajo atmósfera de nitrógeno y se evaporó para retirar los volátiles. Se vertieron 2 ml de carbonato de potasio 1 N en la solución de residuo de evaporación en 5 ml de etanol y se mantuvo a 40 grados durante 1 hora.

20 Se añaden 9 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N a la solución anterior. Se calentó la mezcla de reacción a 60 °C durante 30 minutos sin condensador y se enfrió. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> 1 N a la solución anterior hasta pH de aproximadamente 9. Se retiró el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en el agua mínima. Se recogieron 233,4 mg (rendimiento de un 86,5 %) de un sólido blanco a través de un liofilizador tras aislamiento en Sephadex G-25.

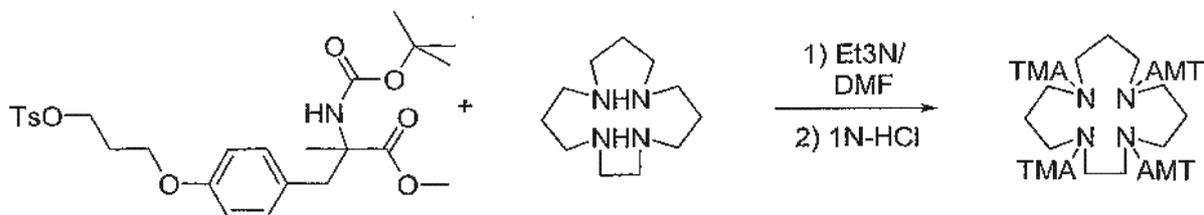
25

### Ejemplo 8

#### Reacción de ciclal con alfa metiltirosina sulfonada (TsO-AMT)

30 Se pueden usar unas condiciones de reacción similares a las presentadas en la presente memoria para preparar otros conjugados de ciclal-agentes diana.

#### A. Ejemplo de AMT N,N',N'',N'''-tetra-sustituido



35

Se ponen 313 mg (0,6 mmol) de TsO-AMT en la solución de 32,2 mg (0,15 mmol) de ciclal y 167,2  $\mu$ l (1,2 mmol) de trietil amina en 10 ml de DMF (anhidro). Se siguió la reacción anterior según el ejemplo 7-1). Se recogieron 72,3 mg (rendimiento de un 41,7 %) de un sólido blanco.

40

#### B. Ejemplo de AMT N,N',N''-tri-sustituido

Se ponen 313 mg (0,6 mmol) de TsO-AMT en la solución de 42,9 mg (0,2 mmol) de ciclal y 167,2 microl (1,2 mmol) de trietil amina en 10 ml de DMF (anhidro). Se siguió la reacción anterior según el ejemplo 7-2). Se recogieron 56,7 mg (rendimiento de un 30,8 %) de un sólido blanco.

45

#### C. Ejemplo de AMT N,N'-di-sustituido

Se ponen 313,0 mg (0,6 mmol) de TsO-AMT en la solución de 64,3 mg (0,3 mmol) de ciclal y 167,2 microl (1,2 mmol) de trietil amina en 10 ml de DMF (anhidro). Se siguió la reacción anterior según el ejemplo 7-3). Se recogieron 45,4 mg (rendimiento de un 22,1 %) de un sólido blanco.

50

#### D. Ejemplo de AMT N-mono sustituido

55 Se ponen 313,0 mg (0,6 mmol) de TsO-AMT en la solución de 301,4 mg (0,6 mmol) de N,N',N"-tris(trifluoroacetil)-ciclal (del ejemplo 1-3) y 167,2  $\mu$ l (1,2 mmol) de trietil amina en 10 ml de DMF (anhidro). Se siguió la reacción anterior según el ejemplo 7-4). Se recogieron 197,2 mg (rendimiento de un 73,1 %) de un sólido blanco.

**Ejemplo 9****Formación de imágenes usando derivados N4****5 A. Materiales y Métodos**Reacción de ciclama con conjugados de tetracetato manosa (N4-DG-ciclama)

Se añadió 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-O-trifluorometanosulfonil-beta-D-manopiranososa (300 mg, 0,625 mmol) en 5 ml de DMF a la mezcla de 1,4,8,12-tetraazaciclopentacecano (N4) (250,2 mg, 1,237 mmol) y trietil amina (174 microl, 1,249 mmol) en 5 ml de DMF. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 6 horas. Se evaporó el disolvente de reacción hasta sequedad a 40-45 °C en condiciones de alto vacío. Posteriormente, se añadió una solución de 1,4-dioxano (10 ml). Se filtró el precipitado. Se añadió lentamente ácido clorhídrico (4N) en solución de 1,4-dioxano (2 ml, 8 mmol). Se enfrió la mezcla en un baño de hielo. Se filtró la mezcla a través de un embudo de Buchner y se lavó con éter dietílico (2 x 5 ml). Se evaporó el filtrado hasta sequedad, dando como resultado 383,1 mg (90,8 %) de un sólido blanco. RMN 1H de N4-DG  $\delta$ (ppm) 8,50 (s, 1H), 3,98-40,1 (m, 1H), 3,76 (s, 2H), 3,54-3,60 (m, 9H), 3,38-3,45 (m, 8H), 3,31-3,37 (m, 1H), 3,18-3,22 (m, 1H), 2,02-2,31 (m, 4H), 2,15 (s, 12H). RMN 13C de N4-DG  $\delta$ (ppm) 197,3, 175,2, 170,4, 165,6, 67,0, 66,8, 66,4, 51,7, 45,3, 44,0, 43,6, 43,2, 42,9, 42,5, 41,9, 38,6, 37,5, 37,3, 31,8, 19,5, 19,3, 14,5. La Figura 1 muestra el esquema sintético.

Radiomarcaje de N4-DG (N4-DG-ciclama)

Se disolvió N4-DG (5 mg) en 0,2 ml de agua. Se añadió solución de cloruro de estaño (II) (0,1 ml, 1 mg/ml). Se añadió pertecnetato ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ , 37-370 MBq, Mallinckrodt, Houston, Texas). Finalmente, se añadió agua a esta solución para ajustar el volumen hasta 1 ml. Se determinó la pureza radioquímica por medio de TLC (ITLC SG, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) sometido a elución con metanol: acetato de amonio (1:4). A partir de radio-TLC análisis (Bioscan, Washington, DC) la pureza radioquímica fue mayor de un 97 %.

Para el marcaje de  $^{68}\text{Ga}$ , se sometió a elución  $^{68}\text{Ga}$  a partir de  $^{68}\text{Ga}$ /generador de  $^{68}\text{Ga}$  (Isotope Products Laboratories, Valencia, CA) usando HCl 1 N. Se evaporó la solución ácida hasta sequedad bien con un vehículo de  $\text{GaCl}_3$  añadido o bien sin vehículo añadido. Se reconstituyó la solución en agua. Posteriormente se añadió N4-DG (5 mg) disuelto en 0,2 ml de agua a la solución radioactiva.

Captación Celular In Vitro de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N4-DG (N4-DG-ciclama) y N4-DG-cicla

Se usaron dos estirpes celulares de cáncer diferentes (NSLC A549 de pulmón humano, 13762 de mama) para los ensayos de captación celular. Se obtuvieron las estirpes celulares a partir de American Type Culture Collection (Rockville, MD). Se colocaron células en una placa de cultivo tisular de 12 pocillos que contenía 50.000 por cada pocillo. Se añadieron 4  $\mu\text{Ci}$  (0,148 MBq) de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - y  $^{68}\text{Ga}$ -N4-DG o N4 (0,1 mg/pocillo) a cada pocillo. Se incubaron las células con radiotrazadores a 37 °C en diferentes intervalos de tiempo. Tras la incubación, se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo (PBS) dos veces y se sometió a tratamiento con tripsina con 0,5 ml de solución de tripsina. Posteriormente, se recogieron las células y se midió la radioactividad por medio de un contador gamma. Los datos se expresan en media  $\pm$  DE de proporción de captación en porcentaje de las tres mediciones.

Biodistribución de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N4-DG en Ratas que Portan Tumor de Mama

Se alojaron los animales en la instalación de The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center. Todos los protocolos que implican el uso de animales (ratas y conejos [véase a continuación]) están aprobados por el M.D. Anderson Animal Use and Care Committee. Se inocularon ratas Fischer-344 (150  $\pm$  25 g) (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) (n=18) subcutáneamente con células de adenocarcinoma de mama de ratas (10<sup>6</sup> células/roedor) en la región lumbar en las patas usando agujas de calibre 25. Se llevaron a cabo los estudios de 12 a 15 días tras la inoculación. Se midieron tamaños de tumor de aproximadamente 1 cm. Se llevaron a cabo estudios de biodistribución usando  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N4-DG. Se dividieron los roedores en tres grupos, representando cada grupo un intervalo de tiempo (0,5, 2 y 4 horas, n = 3/punto de tiempo) y que contenían 9 roedores por compuesto. La actividad de inyección fue de 25 $\pm$ 0,5  $\mu\text{Ci}$  (0,925 $\pm$ 0,019 MBq)/rata. La masa inyectada de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N4-DG fue de 0,1 mg/roedor. Tras la administración de los radiotrazadores, se sacrificaron las ratas y se sometieron a escisión los tejidos seleccionados, se pesaron y se contaron en cuanto a radioactividad. Se calculó la biodistribución de trazador en cada muestra como el porcentaje de la dosis inyectada por cada gramo de peso húmedo de tejido (% de ID/g). Se calcularon las proporciones de densidad de cuenta de tejido no diana/tumor a partir de los correspondientes valores de % de ID/g.

Estudios de Formación de Imágenes Escintigráficas

- 5 Se inocularon ratas hembra Fischer 344 (150 ± 25 g) (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) subcutáneamente con 0,1 ml de células de tumor de mama procedentes de una suspensión de estirpe celular tumoral 13762 (10<sup>6</sup> células/rata, una estirpe celular tumoral específica de ratas Fischer) en las patas traseras. Se llevaron a cabo estudios de formación de imágenes de 12 a 15 días después de la inoculación. Se midieron tamaños tumorales de aproximadamente 1-1,5 cm. Se obtuvieron imágenes escintigráficas usando una cámara-M de Siemens Medical Systems (Hoffman Estates, IL). Se equipó la cámara con un colimador de orificios paralelos de baja energía. El campo de visión es de 53,3 cm x 38,7 cm. La resolución espacial intrínseca es de 3,2 mm y el tamaño de pixel es de 10 19,18 mm (32x32, ampliación = 1) hasta 0,187 mm (1024x1024, ampliación = 3,2). Con un colimador de alta resolución y baja energía (según se requiere con <sup>99m</sup>Tc), el sistema se diseña para una sensibilidad plana de al menos 172 cuentas/minuto (cpm)/μCi y una resolución espacial de 4-20 mm. Se usó uPET para los estudios de formación de imágenes de PET (0,5 mCi/rata).
- 15 Se obtuvo escintigrafía plana en el intermedio, 0,5-4 horas después de inyección i.v. de <sup>99m</sup>Tc-N4-DG o <sup>99m</sup>Tc-N4 (0,3 mCi/rata; 0,1 mg de masa/conejo). Para comparar la acumulación de radiotrazador, se determinaron ROIs (región de interés en cuentas por píxel). Se usó la cuenta de ROIs entre el tumor y el músculo para calcular las proporciones de tumor con respecto a ausencia de tumor.

20 **B. Resultados**Estudios de Captación Celular In Vitro

- 25 Hubo un aumento de la captación de <sup>99m</sup>Tc- o <sup>68</sup>Ga-N4-DG o <sup>99m</sup>Tc-N4-AMT como función del tiempo de incubación en las estirpes celulares de cáncer sometidas a ensayo (Figura 2, Figura 3, Figuras 4 A-C). La captación de <sup>99m</sup>Tc-N4 como grupo de control fue menor de un 0,5 % en cualquier momento de tiempo.

Estudios de Biodistribución y Formación de Imágenes Escintigráficas

- 30 La biodistribución de <sup>99m</sup>Tc-N4-DG en ratas que portan tumores mostró proporciones mayores de densidad de cuentas de tumor con respecto a tejido en función del tiempo (Tabla 2). Las imágenes planas de los modelos en animales que portaban tumor confirmaron que los tumores se podrían visualizar de forma clara con <sup>99m</sup>Tc- o <sup>68</sup>Ga-N4-DG (Figuras 5A-B, Figura 6, Figura 7) y N4-AMT (Figura 9, Figura 10). La región de interés resaltada por ordenador (ROI) mostró que las proporciones de tumor/fondo en el grupo de <sup>99m</sup>Tc-N4-DG aumentaron en función del tiempo (Figura 8). El tiempo óptimo de formación de imágenes fue de 1 h en un modelo con ratas.

**TABLA 2. Biodistribución de <sup>99m</sup>Tc-N4-DG<sub>2</sub>-(Ciclama) en Ratas que Portan Tumores de Mama**  
% de dosis inyectada por gramo de peso de tejido (n = 3 /tiempo, intervalo, iv)

	30 MIN	2 HORAS	4 Horas
SANGRE	4,102 ± 0,560	1,185 ± 0,154	0,984 ± 0,034
CORAZÓN	0,847 ± 0,069	0,306 ± 0,017	0,253 ± 0,018
PULMÓN	3,659 ± 0,212	2,368 ± 0,050	3,196 ± 0,395
HÍGADO	20,959 ± 3,548	24,282 ± 0,723	26,653 ± 2,238
BAZO	8,535 ± 0,886	16,647 ± 3,310	11,962 ± 0,655
RIÑÓN	6,995 ± 0,464	7,512 ± 0,643	8,405 ± 0,146
INTESTINO	0,626 ± 0,147	0,454 ± 0,124	0,256 ± 0,033
ÚTERO	0,575 ± 0,067	0,294 ± 0,032	0,230 ± 0,002
MÚSCULO	0,122 ± 0,021	0,060 ± 0,007	0,048 ± 0,002
TUMOR	0,624 ± 0,050	0,345 ± 0,019	0,274 ± 0,020
TIROIDES	1,285 ± 0,298	0,485 ± 0,075	0,314 ± 0,031
ESTÓMAGO	0,547 ± 0,033	0,331 ± 0,038	0,216 ± 0,003
T/MÚSCULO	5,348 ± 1,347	6,010 ± 1,111	5,723 ± 0,079
T/SANGRE	0,157 ± 0,033	0,297 ± 0,023	0,279 ± 0,026
H/SANGRE	0,208 ± 0,012	0,264 ± 0,023	0,257 ± 0,010
H/MÚSCULO	7,057 ± 0,802	5,328 ± 1,007	5,353 ± 0,633

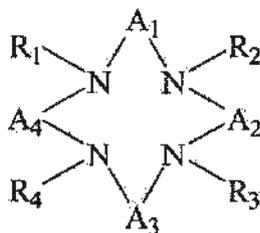
Los datos representan la media ± desviación estándar de 3 animales

## Referencias

- Patente de Estados Unidos 4.141.654  
 Patente de Estados Unidos 5.268.163  
 5 Patente de Estados Unidos 5.648.063  
 Patente de Estados Unidos 5.880.281  
 Patente de Estados Unidos 5.955.053  
 Patente de Estados Unidos 5.986.074  
 Patente de Estados Unidos 6.691.724  
 10 Patente de Estados Unidos 5.605.672  
 Patente de Estados Unidos 6.071.490  
 Patente de Estados Unidos 6.613.305  
 Patente de Estados Unidos 6.737.247
- 15 Solicitud Au 01/75210A5  
 Solicitud PCT WO 01/80906A2  
 Solicitud PCT WO 01/97807A2  
 Solicitud PCT WO 91/16076A1
- 20 Alauddin y Conti, Nucl. Med. Biol., 25(3): 175-180 1998.  
 Alauddin y Conti, J. Nucl. Med., 42(11): 1682-1690, 2001.  
 Alauddin y Conti, Nucl. Med. Biol., 23(6): 787-792 1996.  
 Alauddin y Conti, Nucl. Med. Biol., 25: 371-376, 1999.  
 Blondeau et al., Can. J. Chem. 45: 49-52, 1967.  
 25 Connors, Ann. Oncol., 7(5): 445-52, 1996.  
 Davison et al., Inorg. Chem., 20: 1629-1632, 1980.  
 Gambhir et al., J. Nucl. Med., 39(11): 2003-2011, 1998.  
 Gambhir et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 96(5):2333-2338, 1999.  
 Gambhir et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 97:2785-2790, 2000.  
 30 Goldsmith, Sem. Nucl., Med., 27:85-93, 1997.  
 Iyer et al., J. Nucl. Med., 42(1):96-105, 2001.  
 Mathias et al., J. Nucl. Med., 37:1003-1008, 1996.  
 Mathias et al., J. Nucl. Med., 38:133P, 1997b.  
 Mathias et al., J. Nucl. Med., 38:87P, 1997a.  
 35 Namavari et al., Nucl. Med. Biol., 27(2):157-162 2000.  
 Reed, Cancer Cell, 3:17-22, 2003.  
 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.  
 Seabold et al., J. Nucl. Med., 40(9):1434-1440, 1999.  
 Srivastava et al., J. Tox. Env. Health, 47:173-182, 1996.  
 40 Surma et al., Nucl. Med. Comm., 15:628-635, 1994.  
 Tjuvajev et al., J. Nucl. Med., 43(8):1072-1083, 2002.  
 Van Nerom et al., Eur. J. Nucl. Med., 16:417, 1990.  
 Van Nerom et al., Eur. J. Nucl. Med., 20:738-746, 1993.  
 Verbruggen et al., Eur. J. Nucl. Med., 16:429, 1990.  
 45 Verbruggen et al., J. Nucl. Med., 33:551-557, 1992.  
 Yaghoubi et al., J. Nucl. Med., 42:1225-1234, 2001.

REIVINDICACIONES

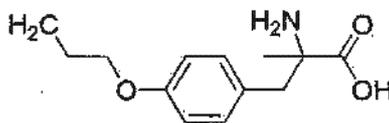
1. Un compuesto definido por tener la fórmula



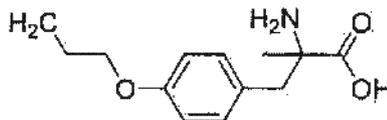
5 en la que

- A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub> son cada uno independientemente  $-(CH_2)_x-$ , en donde  $x = 2-4$ ;
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cada uno independientemente hidrógeno o

10



- y
- R<sub>4</sub> es



15

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto está quelado con un átomo metálico.

3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que el átomo metálico no es radioactivo.

20

4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que el átomo metálico es cobre, cobalto, platino, hierro, arsénico, renio o germanio.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto está quelado con un radionúclido.

25

6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que el radionúclido es <sup>99m</sup>Tc, <sup>188</sup>Re, <sup>186</sup>Re, <sup>183</sup>Sm, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>89</sup>Sr, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>183</sup>Gd, <sup>59</sup>Fe, <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Bi, <sup>211</sup>At, <sup>45</sup>Ti, <sup>60</sup>Cu, <sup>61</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu o <sup>62</sup>Cu; prefiriéndose <sup>68</sup>Ga, <sup>90</sup>Y, <sup>68</sup>Ga y <sup>188</sup>Re; y prefiriéndose particularmente <sup>99m</sup>Tc.

30

7. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1.

8. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 6 para su uso en un método de tratamiento de cáncer o en un método de formación de imágenes.

35

9. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en donde el método de tratamiento de cáncer o el método de formación de imágenes se realizan en un mamífero, en particular en un ser humano.

10. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en donde el tratamiento de cáncer se realiza en combinación con un segundo compuesto anti-canceroso.

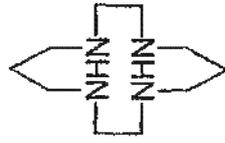
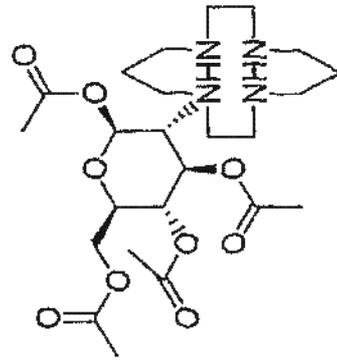
40

11. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en donde el tratamiento de cáncer se realiza en combinación con terapia de radiación o cirugía.

12. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en donde la formación de imágenes es formación de imágenes PET o SPET.

45

13. Un kit que comprende un compuesto de la reivindicación 1 y un agente reductor.
14. El kit de la reivindicación 13, comprendiendo además el kit un radionúclido, en particular un radionúclido tal como  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{183}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{183}\text{Gd}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{45}\text{Ti}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  o  $^{62}\text{Cu}$ .
15. El kit de la reivindicación 13, comprendiendo además el kit un antioxidante, en particular un antioxidante tal como vitamina C, tocoferol, piridoxina, tiamina o rutina.
16. El kit de la reivindicación 13, comprendiendo además el kit un agente quelante de transición, en particular un agente quelante de transición tal como glucoheptonato, gluconato, glucarato, citrato o tartrato.
17. El kit de la reivindicación 13, en el que el agente reductor es cloruro de estaño (II) o trifenilfosfina.



+

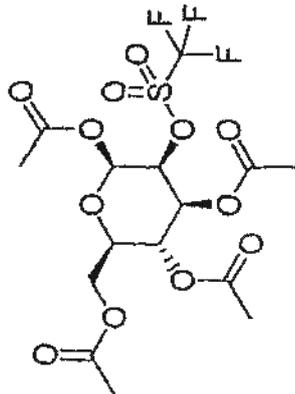


FIG. 1

**Captación Celular In Vitro de  $^{99m}\text{Tc-N}_4\text{-DG}$   
(Ciclama) en Células de Cáncer de Mama 231**

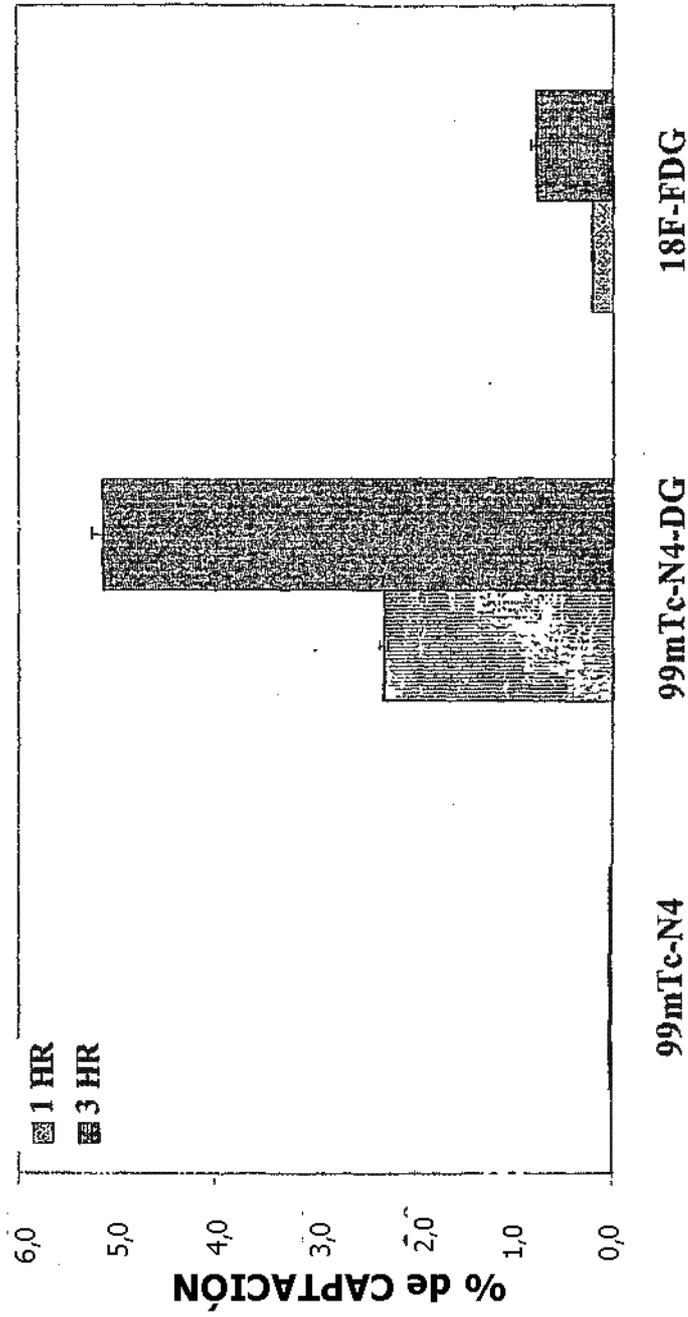
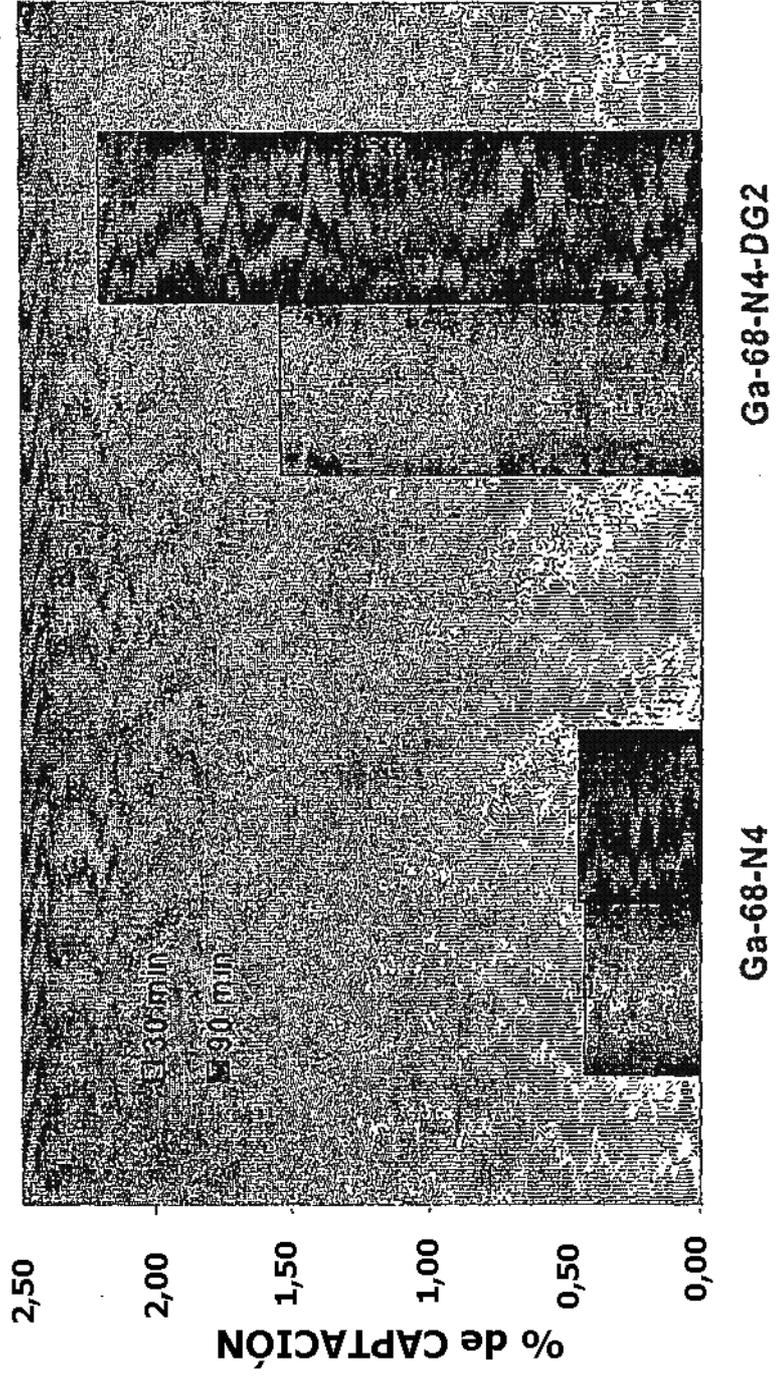


FIG. 2

**Captación Celular de  $^{68}\text{Ga-N4-DG2}$  (ciclama)  
en Células de Cáncer de Pulmón Humano**



**FIG. 3**

**Captación celular de  $^{68}\text{Ga-N4-DG2}$  (ciclama)  
en Células de Tumor de Mama en Ratas**

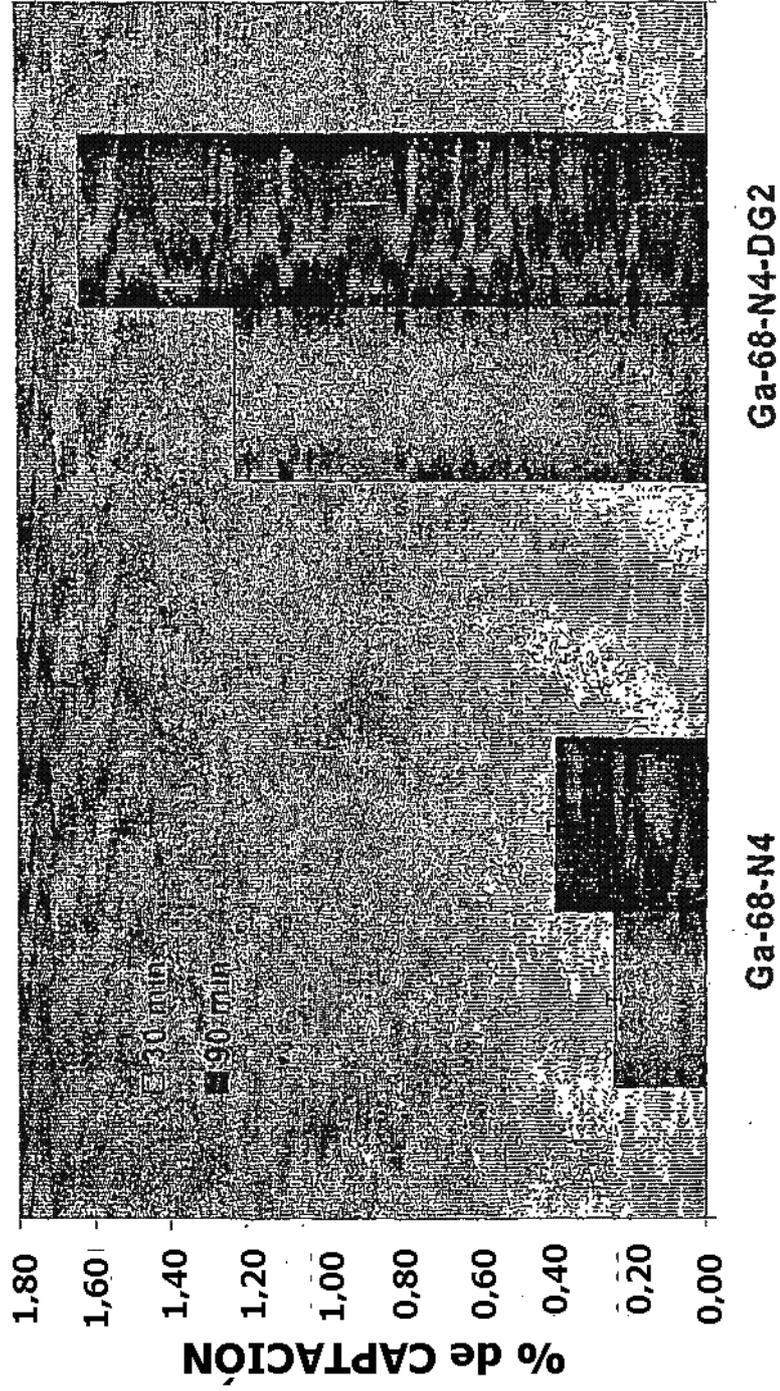


FIG. 4A

### Estudio de Captación Celular de $^{99m}\text{Tc-N}_4\text{-DG}$ (cicala)

en Células Mamarías de Ratas

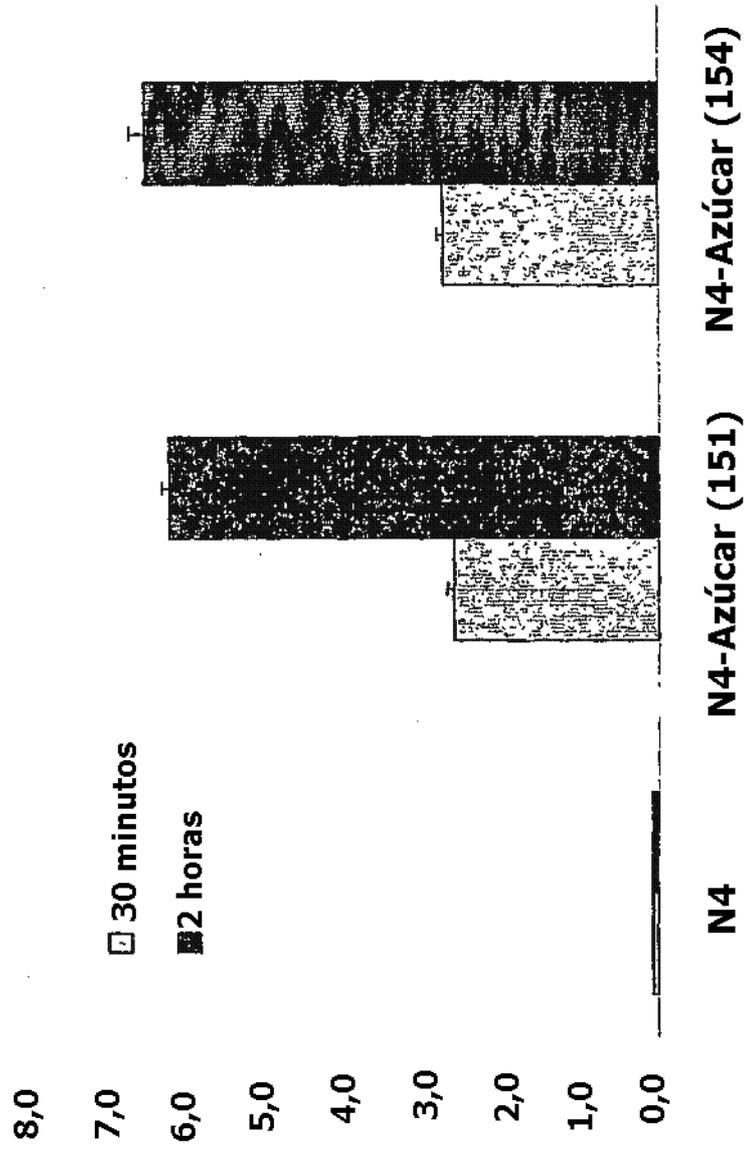
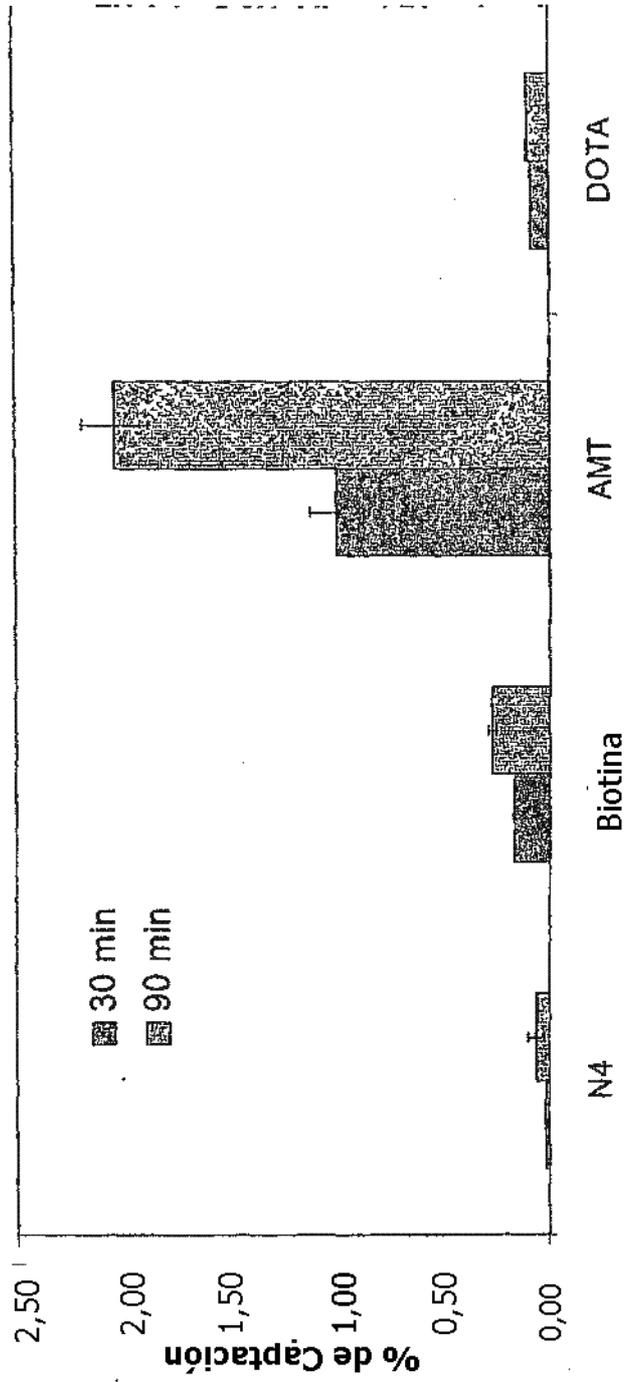


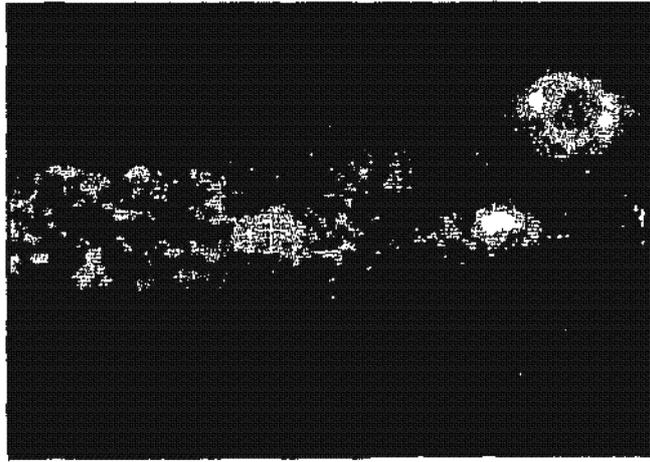
FIG. 4B

**Estudio In Vitro de Compuestos de N4 marcado con 99m Tc,  
Biotina, AMT y DOTA en Estirpe Celular de Cáncer de Mama  
13762**



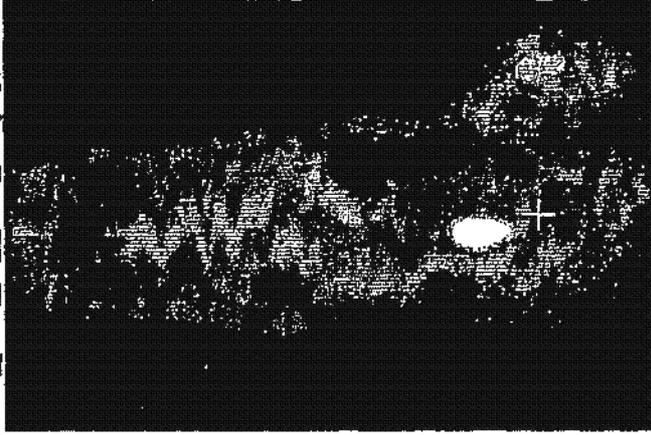
**FIG. 4C**

$^{68}\text{Ga-N4-DG}$  vs  $^{18}\text{F-FDG}$  (uPET)



$^{68}\text{Ga-N4-DG}$

150 minutos después de inyección



$^{18}\text{F-FDG}$

45 minutos después de inyección

FIG. 5A

Imágenes de uPET de  $^{68}\text{Ga-N}_4$

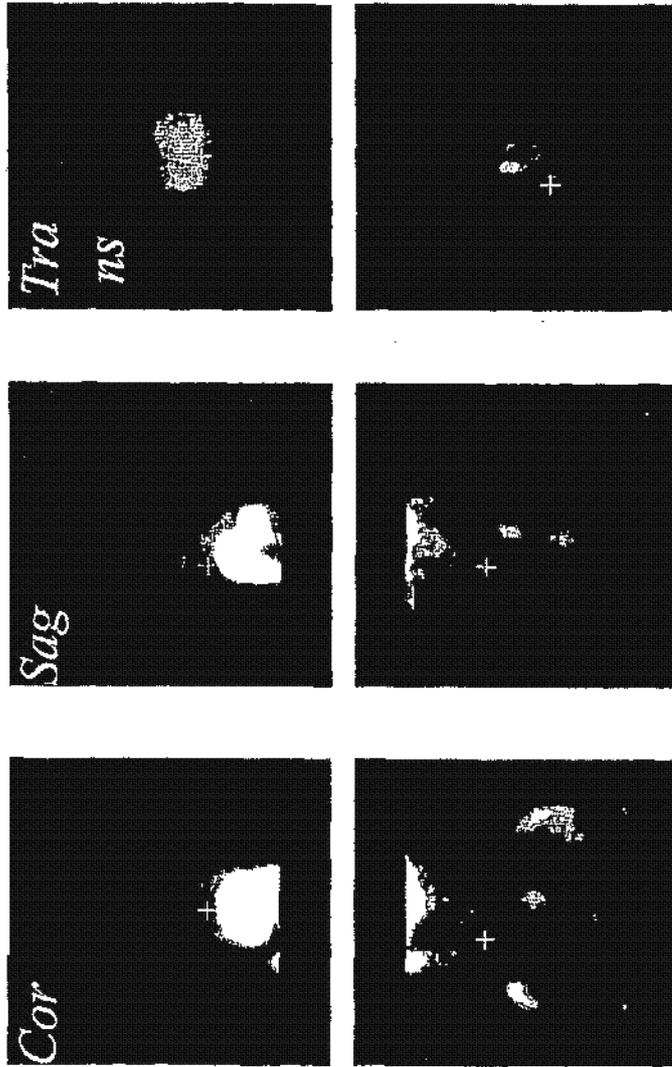


FIG. 5B

Formación de Imágenes de 99mTc-N4-DG (ciclama) a los 10, 60 y 120 minutos en ratas con y sin tumor

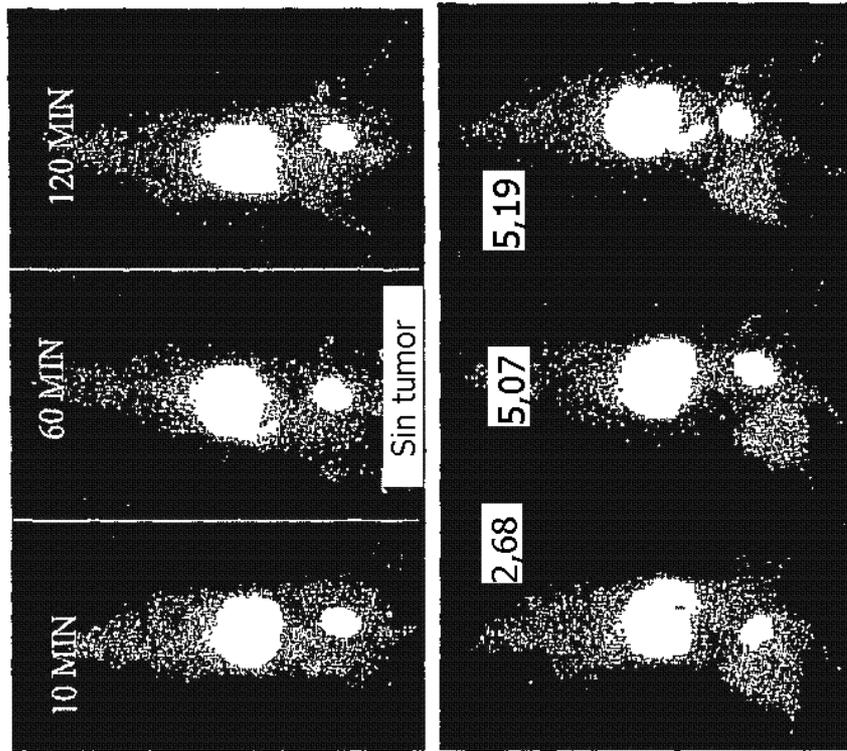


FIG. 6

Comparación de imagen de imagen de 99mTc-N4-DG (ciclama) & 99mTc-EC-DG a los 60 y 120 minutos de ratas que portan estirpe celular de tumor de mama

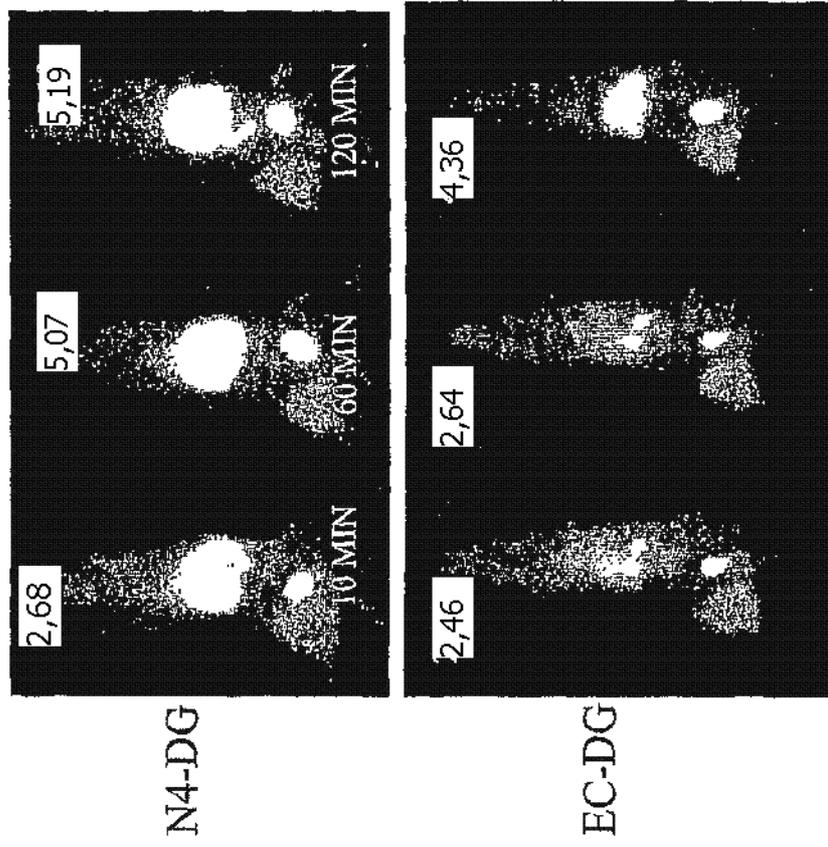


FIG. 7

Proporciones de Densidad de Cuentas Tumor con respecto a Músculo de formación de imágenes de  $^{99m}\text{Tc-N4-DG}$  (ciclama) en ratas que portan o no portan estirpe celular de cáncer de mama

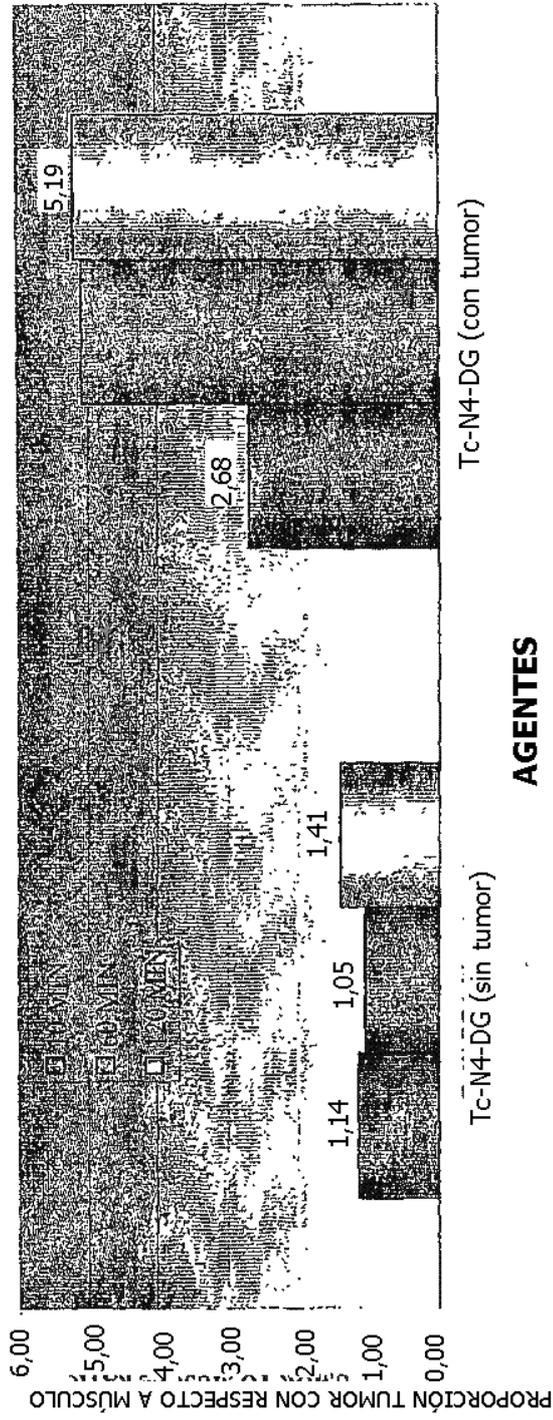


FIG. 8

Comparación de formación de imágenes de  $^{99m}\text{Tc-N4}$  &  $^{99m}\text{Tc-N4-AMT}$  (ciclama) en Intermedio de Conejo, 1 HORA y 3 HORAS después de la inyección

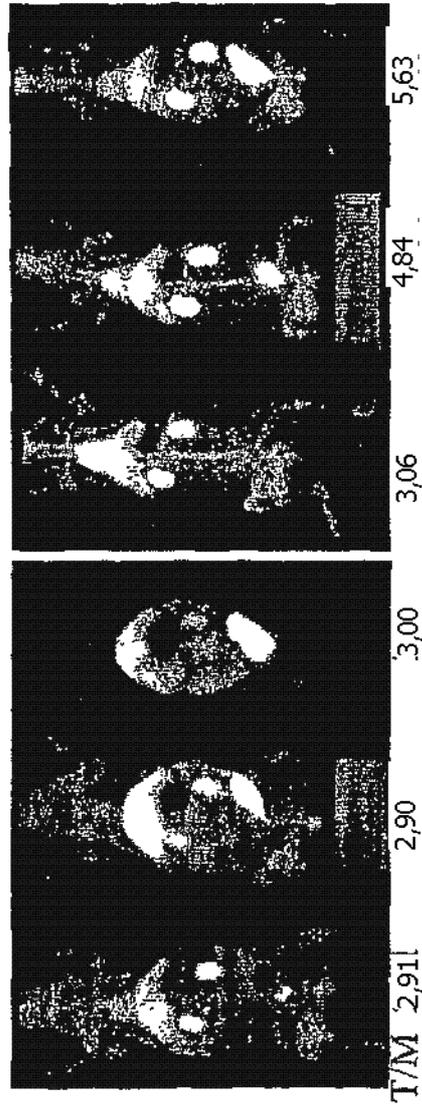
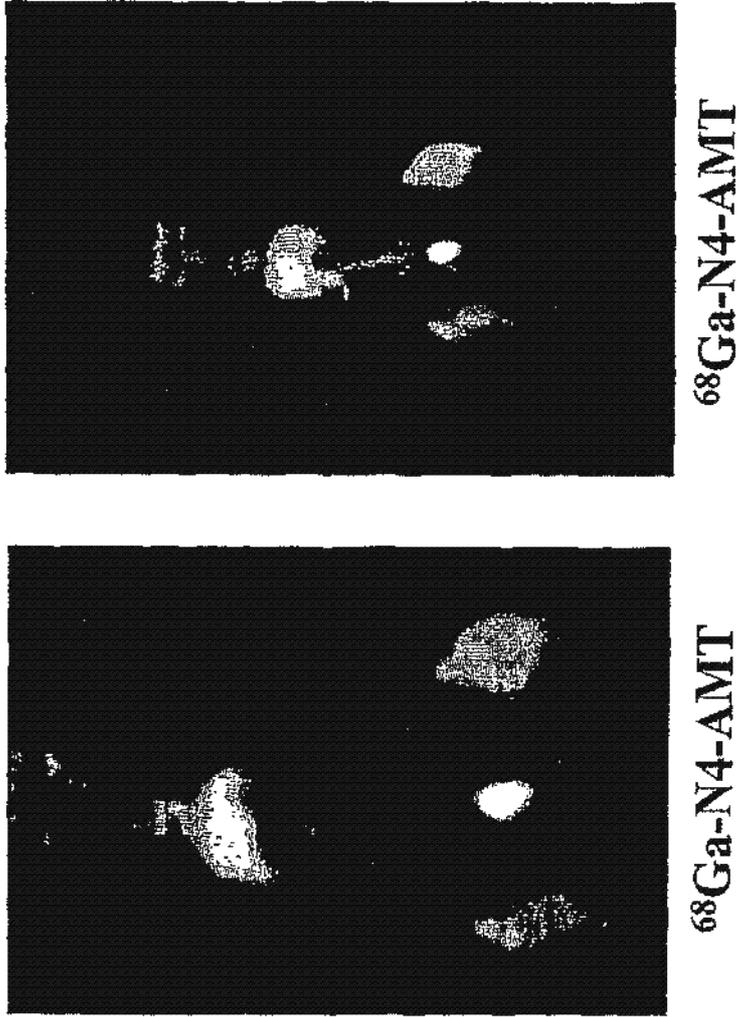


FIG. 9

**Formación de Imágenes de Micro-PET de  $^{68}\text{Ga}$**



**FIG. 10**