

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 704**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4427 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2014 PCT/EP2014/074415**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15071334**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2014 E 14799724 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 3068787**

54 Título: **Ciclamas de puente cruzado con picolinato, quelatos con cationes metálicos y uso de los mismos**

30 Prioridad:

12.11.2013 EP 13192597

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

06.03.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE (50.0%)

3, rue des Archives

29200 Brest, FR y

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)

72 Inventor/es:

TRAPIER, RAPHAËL y

HALIME, ZAKARIA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 657 704 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

Ciclamas de puente cruzado con picolinato, quelatos con cationes metálicos y uso de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a quelatos resultantes de la formación de complejos de Ciclamas de puente cruzado con picolinato con cationes metálicos, preferiblemente de cobre (II) o galio (III). La invención se refiere adicionalmente a ligandos de ciclamas de puente cruzado con picolinato. Otro objeto de la invención es los quelatos de la invención para uso en medicina nuclear y el uso de ligandos de la invención en la detección de cationes o depuración de efluentes.

Antecedentes de la invención

15 Los tetraazamacrociclos tales como los derivados de ciclam (1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano) generan un interés importante en muchos campos tales como la medicina, especialmente la medicina nuclear; la depuración de efluentes contaminados con elementos radioactivos o metales, como el plomo; catálisis; extracción sólido/líquido y la extracción líquido/líquido; o la detección de trazas de cationes metálicos. La presente invención se refiere a todos estos campos de aplicaciones, especialmente la medicina nuclear.

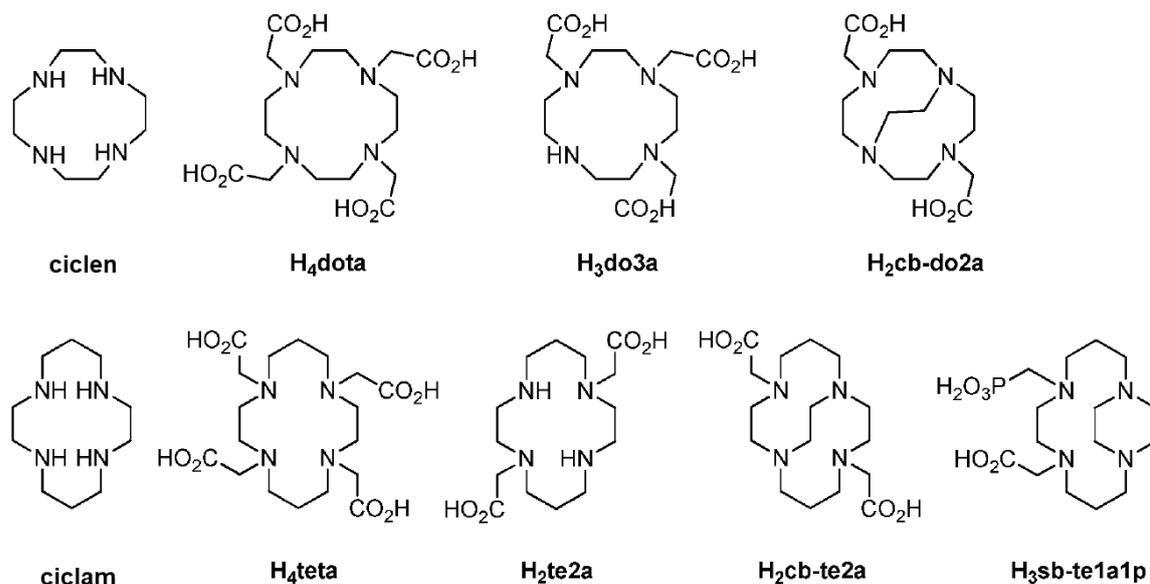
20 En la medicina nuclear, los radiofármacos utilizados como agentes terapéuticos o como agentes formadores de imágenes a menudo comprenden quelatos de radioelementos. Para mejorar la eficiencia de los radiofármacos, se puede anexar una biomolécula objetivo sobre la fracción quelante con el fin de inducir un suministro específico de sitio de la radiación, lo que lleva a un agente de quelación bifuncional (BCA). La obtención de un BCA requiere la introducción de un grupo de conjugación apropiado en la estructura del quelador de metal, para permitir la bioconjugación antes o después de marcado con el radioisótopo. El agente de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un hapteno o un péptido. Dependiendo de la naturaleza del radionúclido, es, por ejemplo, posible realizar formación de imágenes PET (Tomografía por Emisión de Positrones), SPECT (Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único) o RIT (Radioinmunoterapia).

30 Para aplicaciones en la medicina nuclear, por lo tanto, el quelato debe ser bioconjugado a un vector biológico, aunque atrapando el radionúclido para formar un complejo estable que previene la liberación del metal en el organismo. Más aún, cuando se utilizan emisores radiactivos, se tiene que considerar la restricción cinética debido a la vida media limitada del radionúclido.

35 El Dota (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) es un tetra ciclen N-funcionalizado (esquema 1). En el esquema 1, dota se conoce como "H₄dota", los cuatro átomos de hidrógeno especificados antes de "dota" que reflejan el hecho de que con el fin de tener las cuatro funciones de ácido carboxílico en forma de "COOH", se deben protonar las cuatro aminas del macrociclo. La misma nomenclatura se utiliza a lo largo de la descripción para los macrociclos que comprenden funciones de ácido carboxílico.

40 Dota es el ligando más utilizado para formar complejo con el gadolinio (III) para formación de imágenes de MRI. Dota también permite formar complejos con otros metales utilizados comúnmente en medicina nuclear, como, por ejemplo, ¹¹¹In, ⁶⁸Ga, ¹⁴⁹Tb, ²¹³Bi, ²¹²Bi, ²¹²Pb, ⁶⁴Cu o ⁶⁷Cu. Los derivados de dota, son hoy ampliamente estudiados (esquema 1).

45



Esquema 1. Derivados de ciclen y ciclam

Entre el rango de metales potencialmente útiles en la medicina nuclear, el cobre ha estado recibiendo mucho interés debido a la existencia de diversos radionúclidos con diferentes tiempos de vida media y las propiedades de emisión adecuadas para la formación de imágenes de diagnóstico o aplicaciones terapéuticas. Los núclidos más interesantes son ^{67}Cu ($t_{1/2} = 62.0$ h, $\beta^-100\%$, $E_{\text{max}} = 0.577$ MeV) para radioterapia, y ^{64}Cu ($t_{1/2} = 12.7$ h, $\beta^+ 17.4\%$, $E_{\text{max}} = 0.656$ MeV, $\beta^-39.6\%$, $E_{\text{max}} = 0.573$ MeV) tanto para tomografía por emisión de positrones (PET) y radioterapia. El cobre existe predominantemente como catión metálico divalente que prefiere los grupos de donantes tales como aminas y carboxilatos aniónicos para formar complejos con números de coordinación de 4-6. En general se prefieren los números de coordinación altos, proporcionando a menudo geometrías piramidales cuadradas, bipiramidales triangular u octaédricas, de tal manera que rodee totalmente el catión metálico. Dentro del amplio rango de de ligandos acíclicos y cíclicos utilizados con éxito para la formación de complejos de cobre, la familia de macrociclos tetraaza con los brazos de coordinación de N adjuntos se destacan debido a la eficiencia y versatilidad de su quelación de cobre.

Al igual que el cobre, el galio prefiere números de coordinación altos, especialmente bajo la forma de geometrías octaédricas y se pueden utilizar macrociclos tetraaza con los brazos de coordinación de N adjuntos para su quelación. El núclido más interesante para la formación de imágenes nucleares es ^{68}Ga ($t_{1/2} = 68$ min, $\beta^+100\%$, $E_{\text{max}} = 2.921$ MeV), para la tomografía de emisión de positrones (PET).

Los siguientes requisitos son admitidos comúnmente en la técnica como especificaciones para un quelato optimizado destinado a ser utilizado en medicina nuclear:

- a) rápida cinética de metalación con respecto al tiempo de vida media del radionúclido, incluso bajo condiciones ácidas en las que se producen la mayoría de los radionúclidos;
- b) una muy buena estabilidad termodinámica;
- c) inercia con respecto a otros metales, especialmente Zn^{2+} que está presente en grandes cantidades en el medio biológico o como subproducto de la producción de radionúclidos tales como ^{64}Cu ;
- d) inercia cinética;
- e) estabilidad después de la reducción en los medios biológicos del metal quelado, tal como, por ejemplo, la estabilidad de cobre (I) complejo como una forma reducida del cobre (II) inicialmente quelado.

La cinética de metalación (punto a) se puede determinar utilizando espectrometría UV-visible al medir el aumento de intensidad de la banda de transición d-d del complejo. Cuando sea posible, es decir, dependiendo de si el metal es paramagnético o no, la cinética de metalación también se puede determinar mediante RMN. La cinética de metalación adecuada depende de la vida media del radionúclido utilizado para formar el quelato.

La estabilidad termodinámica (punto b) se puede evaluar al determinar las constantes de estabilidad de los complejos, especialmente la constante de asociación K y pK (o $\log K$). Las constantes de estabilidad se pueden medir mediante potenciometría o espectroscopias. Los valores de pM se pueden calcular a partir de pK con el fin de

comparar la estabilidad termodinámica con valores correspondientes de otros ligandos de la técnica anterior. De hecho, pM refleja la cantidad de ligando no quelado, teniendo en cuenta la basicidad del ligando. En la presente invención, una "muy buena estabilidad termodinámica" se refiere a una estabilidad termodinámica por lo menos comparable, preferiblemente mejor que aquella del quelato dota formado con el mismo metal.

La inercia con respecto a otros metales (punto c) se puede evaluar al determinar y comparar el pCu^{2+} frente a pZn^{2+} . También se pueden llevar a cabo experimentos competitivos. Especialmente, el exceso de zinc necesario para conducir a una transquelación se puede determinar en experimentos competitivos con zinc. En la presente invención, se considera que un quelato tiene una inercia adecuada con respecto a otros metales cuando tiene inercia por lo menos comparable, preferiblemente mejor que aquella del quelato dota formado con el mismo metal.

La inercia cinética (punto d) se puede evaluar al medir la disociación del metal luego de competencia con H^+ , en medio ácido. Especialmente, la vida media del complejo se puede determinar en presencia de H^+ a diferentes concentraciones y temperaturas. En la presente invención, se considera que un quelato tiene una inercia cinética adecuada cuando es por lo menos comparable, preferiblemente mejor que aquella del quelato dota formado con el mismo metal.

La estabilidad luego de la reducción (punto e) se puede evaluar al determinar la disociación del metal reducido. La disociación se puede medir con voltametría cíclica en experimentos electroquímicos. En la presente invención, se considera que un quelato tiene una estabilidad adecuada después de reducción cuando es por lo menos comparable, preferiblemente mejor que aquella del quelato dota formado con el mismo metal.

Los quelatos con una buena estabilidad termodinámica y una inercia cinética evitan posibles transquelación del metal cuando el complejo se expone con ligandos biológicos o bioreductores.

También es importante que el quelato y el quelador exhiban buena solubilidad en agua.

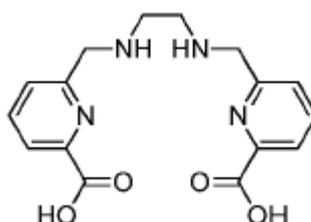
Como se ha indicado anteriormente, el dota comercialmente disponible se utiliza para formar complejos con $^{64}Cu(II)$, $^{67}Cu(II)$ y $^{68}Ga(III)$. Sin embargo, los quelatos de cobre y dota están lejos de cumplir con los requisitos de las especificaciones anteriores.

Debido a su buena afinidad con el cobre (II), los derivados de tetraazacicloalcanos de ciclam, tales como, por ejemplo, teta y te2a (esquema 1), se utilizaron recientemente para formar complejos con ^{64}Cu o ^{67}Cu para aplicaciones de PET o RIT. Su funcionalización de N adecuada también les puede dar una buena afinidad hacia otros metales tales como metales pesados o lantánidos y extender su uso en estas aplicaciones con, por ejemplo, ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{111}In , ^{68}Ga , ^{89}Zr , ^{177}Lu , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{212}Bi (^{212}Pb), ^{213}Bi y ^{225}Ac . Sin embargo, los quelatos formados a partir de estos derivados de ciclam no cumplen con todos los requisitos de las especificaciones anteriores.

Por lo tanto, subsiste la necesidad de nuevos ligandos que permitan formar quelatos que cumplan todos los requisitos de las especificaciones mencionadas anteriormente. Especialmente, los ligandos potencialmente útiles para radiofármacos deben combinar una alta estabilidad termodinámica e inercia cinética de los complejos con una formación de complejos metálica rápida bajo condiciones suaves, ya que esto es crucial para aprovechar al máximo los cortos tiempos de vida media del radioisótopo y permitir el uso de biomoléculas sensibles al calor y pH.

Se ha demostrado que los brazos de picolinato inducen la capacidad de coordinación fuerte hacia los metales de transición y post-transición cuando se adjuntan sobre ligandos macrocíclicos, así como ligandos no macrocíclicos. De hecho, la fracción de picolinato es bidentada: tiene un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno, ambos capaces de participar para la coordinación de un metal. Por lo tanto, se han utilizado recientemente los derivados de picolinato para la formación de complejos de lantánidos, plomo o de bismuto (Rodríguez-Rodríguez A. et al. Inorg. Chem. 2012, 51, 13419-13429; Rodríguez-Rodríguez A. et al. Inorg. Chem. 2012, 51, 2509-2521). También se utilizaron recientemente para la formación de complejos de cobre.

Orvig et coll. Divulga un derivado de etilendiamina injertado con dos brazos de picolinato de H_2dedpa , representado en el esquema 2 a continuación para la quelación de cobre (Boros et al., JACS, 2010, 132, 15726-33; Boros et al. Nucl. Med. Biol. 2011, 38, 1165-1174).



Esquema 2. Estructura de H₂dedpa

También se propusieron los derivados de H₂dedpa, con diversos grupos de bioconjugación (Boros et al. Inorg. Chem. 2012, 51, 6279-6284; Bailey et al. Inorg. Chem. 2012, 51, 12575-12589; Boros et al. Nucl. Med. Biol. 2012, 39, 785-794). Sin embargo, los resultados fueron bastante decepcionantes, especialmente para la coordinación de Cu(II), para una aplicación en medicina. De hecho, los complejos de Cu(II) muestran baja estabilidad cinética y termodinámica, así como estabilidad en suero reducida (Boros et al. Inorg. Chem. 2012, 51, 6279-6284), por lo tanto, no cumplen con los requisitos b), d) y e) de las especificaciones mencionadas anteriormente.

En un trabajo preliminar, el solicitante propuso un macrociclo triaza con un picolinato y dos brazos colgantes picolilo, Hno1pa2py (3 esquema), que se encontró que también forma fácilmente complejos de cobre(II) estables e inertes, y, adicionalmente, resultó en un radiomarcado muy eficiente con ⁶⁴Cu (Roger et al. Inorg. Chem. 2013, 21 (9), 5246-5259). A pesar de las propiedades prometedoras, no del todo cumplieron con todos los requisitos de las especificaciones mencionadas anteriormente: la estabilidad del quelato de cobre formado con este ligando necesita ser mejorada, en particular luego de la reducción de cobre (II) a cobre (I) en los medios fisiológicos.



Esquema 3. Generaciones anteriores del Solicitante de quelantes funcionalizados de picolinato

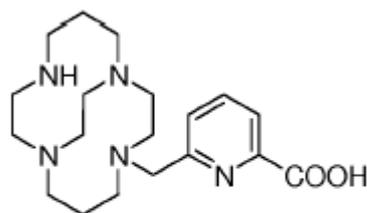
El Solicitante luego desarrolló derivados de picolinato de ciclen y ciclam (esquema 3), especialmente una primera generación de derivado de monopicolinato de ciclam, Hte1pa (Lima et al. Inorg. Chem. 2012, 51(12), 6916-6927). El quelato de cobre correspondiente da buenos resultados con respecto a los requisitos a)-c) de las especificaciones. Sin embargo, no se optimizaron la inercia en medio ácido, (punto d) de las especificaciones, y la inercia con respecto a la reducción (punto e).

Por lo tanto, la investigación del Solicitante realizada proporciona un nuevo ligando que comprende brazos de picolinato, superando los inconvenientes mencionados anteriormente, es decir, mejorar la inercia en medio ácido e inercia en un medio reductor, mientras que se cumplen los otros requisitos de las especificaciones mencionadas anteriormente.

Los tetraazamacrociclos rígidos, conocidos como "queladores con puente cruzado", son el tema de gran interés debido al comportamiento excepcional de sus complejos, especialmente su inercia.

Ejemplos de queladores con puente cruzado son derivados de ciclam con puente cruzado cb-te2a y puente lateral sb-te1a1p o derivado de ciclen con puente cruzado cb-do2a (esquema 1). Los queladores con puente cruzado se definen como que contienen una unidad de puente de etileno (o propileno) que conecta dos átomos de nitrógeno del macrociclo en la posición trans y se han originado algunos de los complejos de cobre(II) más inerte que los reportados. Adicionalmente, también se han logrado con éxito el radiomarcado y la bioconjugación de algunos ejemplos. Especialmente, el cb-te2a con puente cruzado atrae un gran interés ya que forma los complejos de cobre más inertes (puntos d) y e), de las especificaciones anteriores), lo que conduce a limitar si se presenta cualquier liberación de cobre en el cuerpo.

Por lo tanto, el Solicitante consideró la introducción de un puente cruzado en Hte1pa, para formar el nuevo ligando Hcb-te1pa, con el fin de mejorar la inercia:

**Hcb-te1pa**

5 Sin embargo, todos los quelantes puenteados limitados descritos en la técnica, que incluyen Hcb-te2a, son muy básicos, ya que son de protones esponjas: un protón permanece bloqueado en la cavidad del macrocíclico debido a la estructura del compuesto, y estos protones no se pueden desplazar fácilmente por el metal. Este comportamiento de protones esponja hace la cinética de metalación muy lenta. Son necesarias condiciones drásticas para desplazar el protón, tales como temperaturas elevadas, lo cual es incompatible cuando los vectores biológicos sensibles se injertan al quelato para formar un bioconjugado.

10 Como consecuencia, los queladores con puente cruzado, y especialmente Hcb-te2a, cumplen con las especificaciones mencionadas anteriormente, especialmente los puntos de inercia d) y e), con la notable excepción de una muy lenta cinética de metalación (punto a).

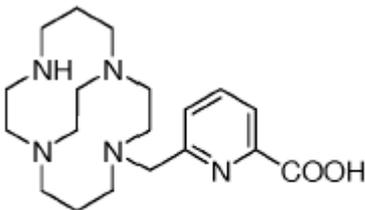
15 Por lo tanto, al introducir un puente cruzado en Hte1pa para mejorar la inercia, el Solicitante espera una disminución drástica de la cinética de metalización, lo que lleva a un ligando que ofrece un compromiso entre la buena inercia y cinética rápida pero que no cumple los 5 requisitos de las especificaciones anteriores.

20 Como se esperaba, el Solicitante demostró que, como otros derivados con puente cruzado, el ligando Hcb-te1pa de la invención es un protón-esponja (véase estudios acido-básico - ejemplo 5, párrafo B.1).

25 Sin embargo y de forma inesperada, el Hte1pa con puente cruzado forma Hcb-te1pa y los derivados del mismo no conducen a una disminución de la cinética de metalación, en comparación con las ciclamas con puente no cruzado. Por el contrario, el ligando con puente cruzado de la invención Hcb-te1pa muestra sorprendentemente una cinética de metalación muy rápida, incluso bajo condiciones ácidas. La metalación se produce casi instantáneamente: por ejemplo, se quela más del 90% de cobre inmediatamente y el cobre restante se quela dentro de unos pocos segundos (véase parte experimental - ejemplo 5, párrafo B.3). Para el conocimiento del Solicitante, no existe otro caso reportado en la técnica de un ciclam o ciclen con puente cruzado que tenga una cinética de metalación rápida en medio ácido acuoso y la presente invención supera un fuerte prejuicio del experto.

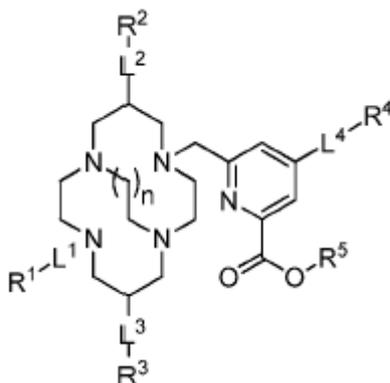
30 Sin desear estar vinculado por una teoría, parece que el carácter pre-organizado del ligando con puente cruzado, que se pone de manifiesto en estudios cristalográficos (Figura 1), junto con la presencia de un grupo carbonilo sobre la fracción aromática, podría estar en el origen de este comportamiento inesperado. Se observó que la estructura del quelato está cerca de la estructura del ligando (Figura 2).

35 Por lo tanto el Solicitante proporciona un nuevo ligando de la fórmula Hcb-te1pa:

**Hcb-te1pa**

40 y derivados del mismo, especialmente derivados funcionalizados con funciones de acoplamiento adecuadas para los grupos de vectorización de injerto o derivados que comprenden grupos de vectorización.

En una realización preferida, la invención se refiere a ligandos de fórmula (I)



en la que n, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, L¹, L², L³ y L⁴ son como se define adelante.

5 Luego de la formación de complejos con cationes metálicos, los ligandos de la invención conducen a quelatos que cumplen los 5 requisitos de las especificaciones anteriores. Especialmente, se reportan las propiedades del quelato de cobre (II) de Hcb-te1pa se informan en la parte experimental a continuación y se comparan con aquellas de los quelatos de cobre(II) de la técnica, evidenciando que el quelato de la invención satisface por completo las especificaciones.

10 La invención también se refiere a quelatos que resultan de la formación de complejos de un ligando de fórmula (I) con cationes metálicos.

15 El ligando de fórmula (I) de la invención presenta la ventaja de ser fabricado fácilmente utilizando una síntesis química simple.

Más aún, el ligando Hcb-te1pa y derivados del mismo presentan una competencia para diversos radioisótopos útiles en la medicina nuclear, como, por ejemplo, ⁶⁴Cu, ⁶¹Cu, ⁶⁸Ga, ⁸⁹Zr, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹⁰At, ²¹²Bi (²¹²Pb), ²¹³Bi, ²²⁵Ac, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵³Sm, ¹⁴⁹Tb o ¹⁶⁶Ho.

20 La estructura de Hcb-te1pa permite la biovectorización del quelato mediante la introducción de grupos de vectorización en el núcleo de ciclam, a través de funcionalización de N y/o funcionalización de C. Especialmente, el núcleo de ciclam puede ser funcionalizado en C de acuerdo con el procedimiento descrito en la solicitud de patente WO2013/072491. Más aún, también se puede funcionalizar la función carboxílica del brazo de picolinato. Por lo tanto, la invención abarca el ligando Hcb-te1pa, derivados funcionalizados y/o vectorizados del mismo y los quelatos correspondientes con cationes metálicos, preferiblemente de cobre(II) o galio(III).

30 El quelato de la invención se obtiene en un medio acuoso, al contrario de lo que se hace actualmente en la técnica, que es muy ventajoso para aplicaciones de medicina nuclear.

Además de las aplicaciones en la medicina nuclear, el ligando de fórmula (I) de la invención se puede utilizar para depuración de efluentes contaminados con elementos radioactivos o metales, tales como plomo; catálisis; extracción sólido/líquido y extracción líquido/líquido; o la detección de trazas de cationes metálicos.

35 Definiciones

En la presente invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

40 - "complejo" o "quelato" se refiere a una molécula que une un ión metálico. Quelación (o formación de complejos) implica la formación o presencia de dos o más enlaces coordinados separados entre una molécula polidentada (unida múltiple) y un solo átomo central. Las moléculas polidentadas son a menudo compuestos orgánicos, y se denominan ligandos, quelantes, queladores, agentes de quelación, o agentes secuestrantes.

45 - "ligando" o "quelador" se refiere a una molécula polidentada capaz de formar enlaces coordinados con un ión metálico para dar un quelato.

50 - "función de acoplamiento" se refiere a una función capaz de reaccionar con otra función. En una realización preferida de la invención, la función de acoplamiento se selecciona del grupo que comprende amina; isotiocianato; isocianato; éster activado tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxiglutarimida o éster de maleimida; ácido carboxílico; ácido carboxílico activado tal como, por ejemplo, anhídrido de ácido o haluro de ácido; alcohol; alquino; haluro; azida; siloxi; ácido fosfónico; tiol; tetrazina; norborneno; oxoamina; aminooxi; tioéter;

haloacetamida tal como, por ejemplo, cloroacetamida, bromacetamida o yodoacetamida; glutamato; anhídrido glutárico, anhídrido succínico, anhídrido maleico; aldehído; cetona; hidrazida; cloroformato y maleimida.

5 - “grupo de vectorización” se refiere a un grupo químico adecuado para inducir suministro específico a sitio del compuesto una vez se administra. En una realización preferida de la invención, el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal; hapteno, péptido, proteínas, azúcares, nanopartícula, liposomas, lípidos, poliaminas tal como, por ejemplo, espermina.

10 - “función de activación” se refiere a una fracción química capaz de hacer que una función química sea reactiva. Por ejemplo, para una función química de ácido carboxílico, una función de activación puede ser N-hidroxisuccinimida, N-hidroxiglutarimida maleimida, haluro o fracciones anhidras.

15 - “alquilo” se refiere a cualquier cadena de hidrocarburos lineal o ramificada saturada, con 1 a 12 átomos de carbono, preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono, y más preferiblemente metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, s-butilo y t-butilo, pentilo y sus isómeros (por ejemplo, n-pentilo, iso-pentilo), y hexilo y sus isómeros (por ejemplo, n-hexilo, iso-hexilo).

20 - “alqueno” o “alquenilo” se refiere a cualquier cadena de hidrocarburos lineal o ramificada que tiene por lo menos un enlace doble, de 2 a 12 átomos de carbono, y preferiblemente 2 a 6 átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquenilo son etenilo, 2-propenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-pentenilo y sus isómeros, 2-hexenilo y sus isómeros, 2,4-pentadienilo y similares.

25 - “alquino” o “alquinilo” se refiere a cualquier cadena de hidrocarburos lineal o ramificada que tiene por lo menos un enlace triple, de 2 a 12 átomos de carbono, y preferiblemente 2 a 6 átomos de carbono. Ejemplos no limitantes de grupos alquinilo son etinilo, 2-propinilo, 2-butinilo, 3-butinilo, 2-pentinilo y sus isómeros, 2-hexinilo y sus isómeros y similares.

30 - “arilo” se refiere a un grupo hidrocarbilo poliinsaturado, aromático que tiene un solo anillo (es decir, fenilo) o múltiples anillos aromáticos o fusionados (por ejemplo, naftilo) o unidos covalentemente, normalmente contiene de 5 a 12 átomos; preferiblemente de 6 a 10, en los que por lo menos un anillo es aromático. El anillo aromático puede incluir opcionalmente uno a dos anillos adicionales (ya sea cicloalquilo, heterociclilo o heteroarilo) fusionados al mismo. Ejemplos no limitantes de arilo comprenden fenilo, bifenililo, bifenilenilo, 5- o 6-tetralinilo, naftalen-1- o -2-ilo, 4-, 5-, 6 o 7-indenilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-acenaftenilo, 3-, 4- o 5-acenaftenilo, 1- o 2-pentalenilo, 4- o 5-indanilo, 5-, 6-, 35 7- o 8-tetrahidronaftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, 1,4-dihidronaftilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-pirenilo.

- “arilalquilo” se refiere a un grupo alquilo sustituido por un grupo arilo: aril-alquil-.

- “alquilarilo” se refiere a un grupo arilo sustituido por un grupo alquilo: alquil-aril-.

40 - “heteroarilo” se refiere pero no se limita a anillos aromáticos de 5 a 12 átomos de carbono o sistemas de anillos que contienen de 1 a 2 anillos que están fusionados o unidos covalentemente, normalmente contienen de 5 a 6 átomos; por lo menos uno de los cuales es aromático, en el que uno o más átomos de carbono en uno o más de estos anillos se sustituyen por átomos de oxígeno, nitrógeno y/o azufre, en los que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y los heteroátomos de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizados. 45 Dichos anillos pueden estar fusionados a un anillo arilo, cicloalquilo, heteroarilo o heterociclilo. Ejemplos no limitantes de dicho heteroarilo, incluyen: furanilo, tiofenilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo, oxatriazolilo, tiatriazolilo, piridinilo, pirimidilo, pirazinilo, piridazinilo, oxazinilo, dioxinilo, tiazinilo, triazinilo, imidazo[2, 1 -b] [1 ,3] tiazolilo, tieno [3 ,2-b] furanilo, tieno [3 ,2-b] tiofenilo, tieno[2,3-d][1,3]tiazolilo, tieno[2,3-d]imidazolilo, tetrazolo[1,5-a]piridinilo, indolilo, indolizínilo, isoindolilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, benzotiofenilo, isobenzotiofenilo, indazolilo, bencimidazolilo, 1,3-benzoxazolilo, 1,2- 50 bencisoxazolilo, 2,1-bencisoxazolilo, 1,3-benzotiazolilo, 1,2-benzoisotiazolilo, 2,1-benzoisotiazolilo, benzotriazolilo, 1,2,3-benzoxadiazolilo, 2,1,3- benzoxadiazolilo, 1 ,2,3-benzotiadiazolilo, 2, 1 ,3-benzotiadiazolilo, tienopiridinilo, purinilo, imidazo[1,2-a]piridinilo, 6-oxo-piridazin-1(6H)-ilo, 2- oxopiridin-1(2H)-ilo, 6-oxo-piridazin-1(6H)-ilo, 2- oxopiridin- 1(2H)-ilo, 1,3-benzodioxolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinnolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo.

55 - “heteroarilalquilo” se refiere a un grupo alquilo sustituido por un grupo arilo: heteroarilalquil-.

- “alquilheteroarilo” se refiere a un grupo arilo sustituido por un grupo alquilo: alquilheteroaril-.

60 - “tioéter” se refiere a un grupo funcional con la conectividad C-S-C.

- “haluro” se refiere a flúor, cloro, bromo, o yodo. Los grupos halo preferidos son fluoro y cloro.

65 - “oxoamina” se refiere a un grupo $-(C=O)-NH_2$.

- “aminooxi” se refiere a un grupo $-O-NH_2$.

- "cetona" se refiere a un grupo funcional con la conectividad C-(C=O)-C.

5 - "hapteno" se refiere a una molécula pequeña que puede provocar una respuesta inmunitaria solo cuando está unida a un vehículo grande.

- "radiofármaco" se refiere a un producto médico radiactivo. Los radiofármacos se utilizan en el campo de la medicina nuclear para el tratamiento de muchas enfermedades y/o como trazadores para su diagnóstico.

10 - "paciente" se refiere a un animal de sangre caliente, más preferiblemente un humano, que está pendiente de la recepción de, o que está recibiendo atención médica o es/será objeto de un procedimiento médico.

15 - "tratar", "tratando" y "tratamiento, como se utiliza aquí, se entiende que incluyen aliviar, atenuar o anular una afección o enfermedad y/o sus síntomas acompañantes.

- "prevenir", "que previene" y "prevención", como se utiliza aquí, se refieren a un procedimiento para retrasar o precluir la aparición de una afección o enfermedad y/o sus síntomas acompañantes, impedir que un paciente adquiera una afección o enfermedad, o reducir el riesgo de adquirir una afección o enfermedad de un paciente.

20 - "cantidad terapéuticamente efectiva" (o más simplemente una "cantidad efectiva") como se utiliza aquí significa la cantidad de agente activo o ingrediente activo que es suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado en el paciente al cual/que se administra.

25 - "administración", o una variante de la misma (por ejemplo, "administrar"), significa proporcionar el agente activo o ingrediente activo, solo o como parte de una composición farmacéuticamente aceptable, al paciente cuya afección, síntoma o enfermedad se va a tratar o evitar.

- Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende que los ingredientes de una composición farmacéutica son compatibles entre sí y no perjudiciales para el paciente de los mismos.

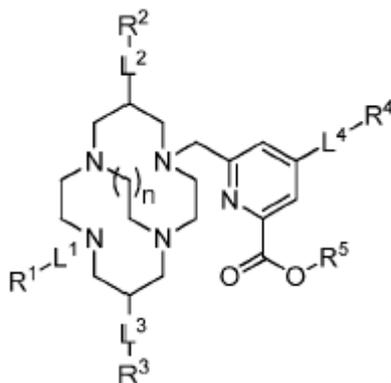
30 - "vehículo farmacéutico" como se utiliza aquí significa un vehículo o medio inerte utilizado como solvente o diluyente en el que el agente farmacéuticamente activo se formula y/o administra. Ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticos incluyen cremas, geles, lociones, soluciones, y liposomas.

35 - "aproximadamente" que precede a una cifra significa más o menos 10% del valor de dicha cifra.

Descripción Detallada

Ligando

40 Esta invención se refiere a un ligando derivado de ciclam con puente cruzado de picolinato de la fórmula (I):



45 en la que

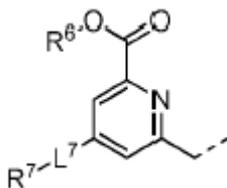
n es un entero seleccionado de 1 y 2;

R¹ representa:

50

- un átomo de hidrógeno;

- un brazo de picolinato de la fórmula (II)



5 - una función de acoplamiento, en la que la función de acoplamiento se selecciona del grupo que comprende amina; isotiocianato; isocianato; éster activado tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxiglutarimida o éster de maleimida; ácido carboxílico; ácido carboxílico activado tal como, por ejemplo, anhídrido de ácido o haluro de ácido; alcohol; alquino; haluro; azida; siloxi; ácido fosfónico; tiol; tetrazina; norborneno; oxoamina; aminooxi; tioéter; haloacetamida tal como, por ejemplo, cloroacetamida, bromacetamida o yodoacetamida; glutamato; anhídrido glutárico, anhídrido succínico, anhídrido maleico; aldehído; cetona; hidrazida; cloroformato y maleimida;

10 - un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

15 R^2 , R^3 , R^4 y R^7 cada uno representa independientemente:

- un átomo de hidrógeno;

20 - una función de acoplamiento, en la que la función de acoplamiento se selecciona del grupo que comprende amina; isotiocianato; isocianato; éster activado tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxiglutarimida o éster de maleimida; ácido carboxílico; ácido carboxílico activado tal como, por ejemplo, anhídrido de ácido o haluro de ácido; alcohol; alquino; haluro; azida; siloxi; ácido fosfónico; tiol; tetrazina; norborneno; oxoamina; aminooxi; tioéter; haloacetamida tal como, por ejemplo, cloroacetamida, bromacetamida o yodoacetamida; glutamato; anhídrido glutárico, anhídrido succínico, anhídrido maleico; aldehído; cetona; hidrazida; cloroformato y maleimida;

25 - un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

30 R^5 y R^6 cada uno representa independientemente:

- un átomo de hidrógeno;

35 - una función de activación, en la que la función de activación se selecciona del grupo que comprende N-hidroxisuccinimida, N-hidroxiglutarimida y maleimida; haluro; $-OCOR^8$ en el que R^8 se selecciona de alquilo, arilo;

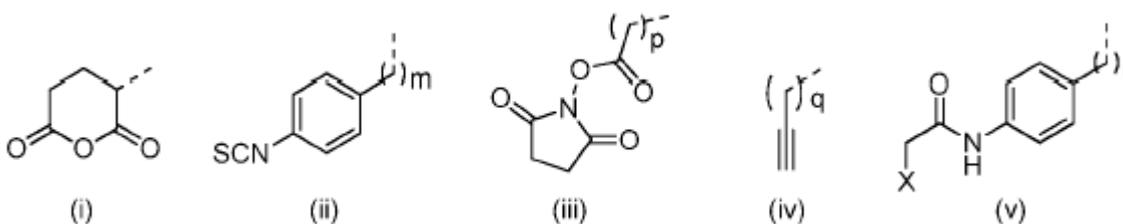
40 - un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

45 L^1 , L^2 , L^3 , L^4 y L^7 cada uno representa independientemente:

- un enlace;

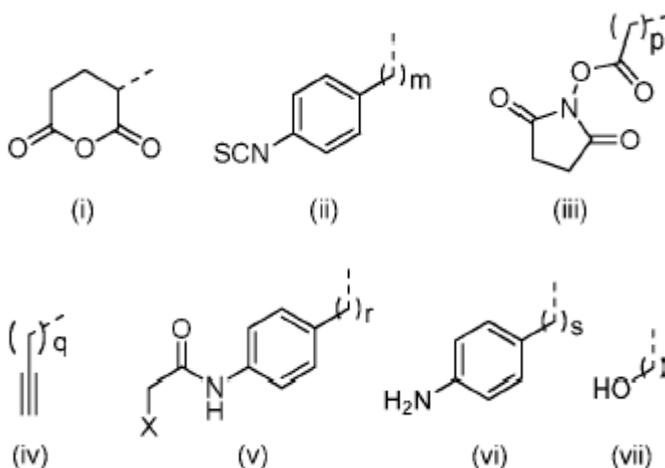
- un ligador seleccionado del grupo que comprende alquilo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, alquilheteroarilo, alquenilo, alquinilo, en el que las fracciones de alquilo se interrumpen opcionalmente por uno o más heteroátomos seleccionados de O, N y S.

50 En una realización, por lo menos uno de $-L^1-R^1$, $-L^2-R^2$, $-L^3-R^3$ y $-L^4-R^4$ se selecciona de las fórmulas (i), (ii), (iii), (iv) y (v):



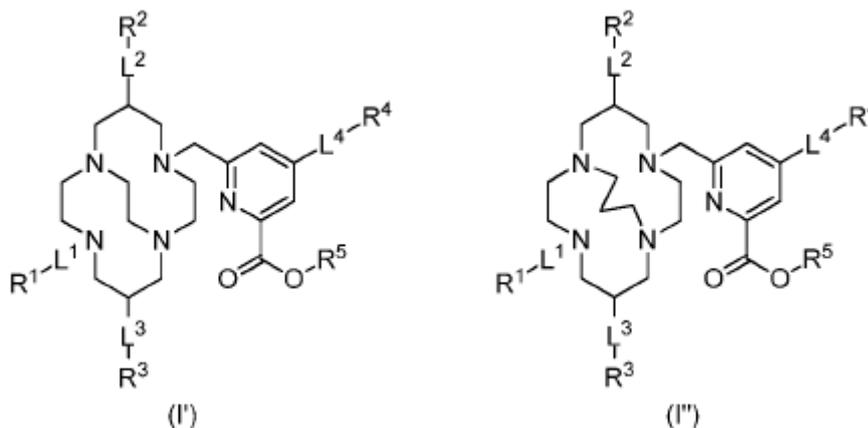
en las que m, p, q y r representan cada uno independientemente un entero que varía desde 0 hasta 10, preferiblemente 0, 1, 2, 3 o 4 y X representa un halógeno, preferiblemente Cl.

5 En una realización, por lo menos uno de -L¹-R¹, -L²-R², -L³-R³ y -L⁴-R⁴ se selecciona de las fórmulas (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) y (vii):



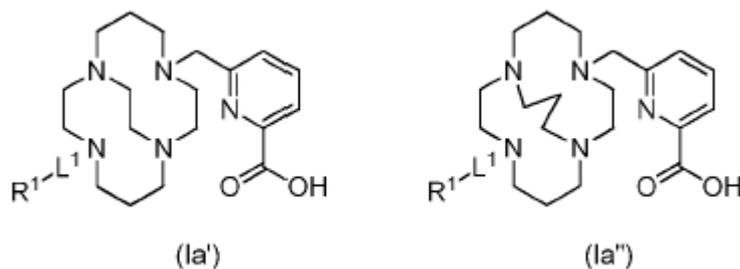
10 en las que m, p, q, r, s y t representan cada uno independientemente un entero que varía desde 0 hasta 10, preferiblemente 0, 1, 2, 3 o 4 y X representa un halógeno, preferiblemente Cl.

15 En una realización, el ligando de la invención es de la fórmula (I') o (I'')



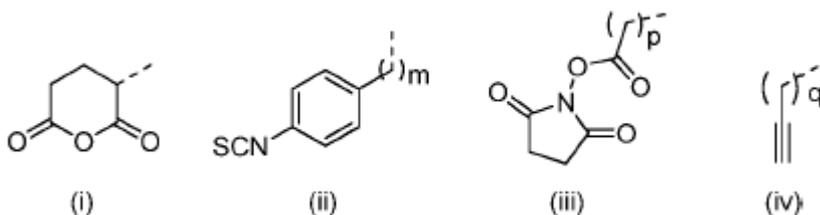
20 en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, L¹, L², L³ y L⁴ son como se define en la fórmula (I).

En una realización, el ligando de la invención es de la fórmula (Ia') o (Ia'')



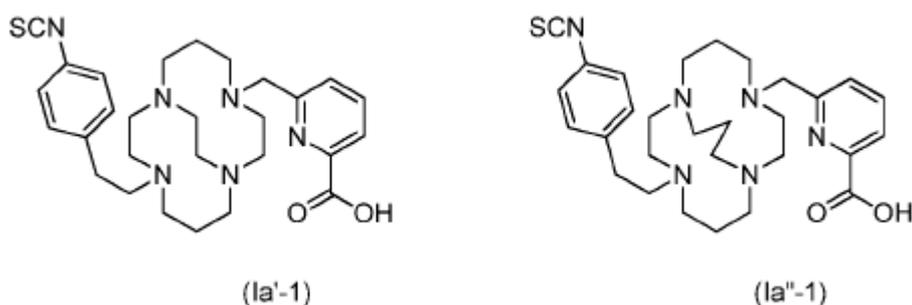
en la que R^1 y L^1 son como se define en la fórmula (I).

5 En una realización, $-L^1-R^1$ en la fórmula (Ia') o (Ia'') preferiblemente se selecciona de las fórmulas (i), (ii); (iii) y (iv):



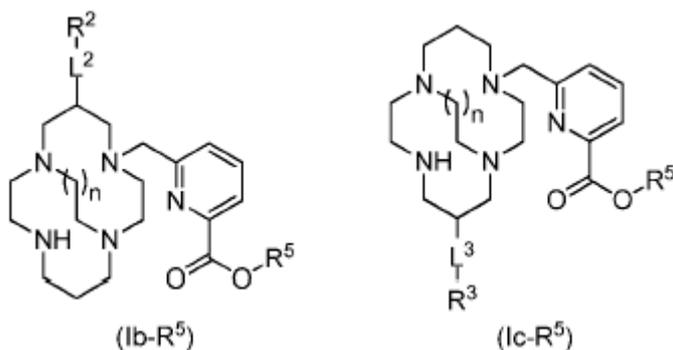
10 en las que m , p y q representan cada uno independientemente un entero que varía desde 0 hasta 10, preferiblemente 0, 1, 2, 3 o 4.

En una realización específica, el ligando de la invención es de la fórmula (Ia'-1) o (Ia''-1)



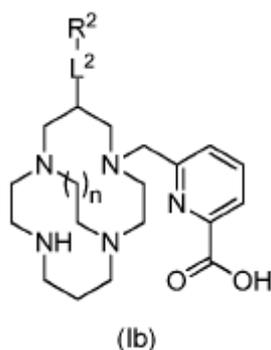
15

En una realización, el ligando de la invención es de la fórmula (Ib-R⁵) o (Ic-R⁵)



20 en la que R^2 , R^3 , L^2 y L^3 son como se define en la fórmula (I), y n es un entero seleccionado de 1 o 2, preferiblemente n es igual a 1.

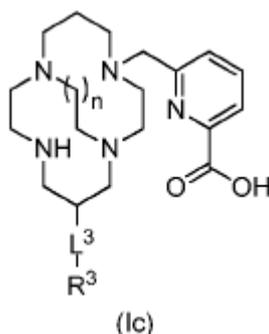
En una realización, el ligando de la invención es de la fórmula (Ib)



en la que R^2 y L^2 son como se define en la fórmula (I), y n es un entero seleccionado de 1 o 2, preferiblemente n es igual a 1.

5

En una realización, el ligando de la invención es de la fórmula (Ic)

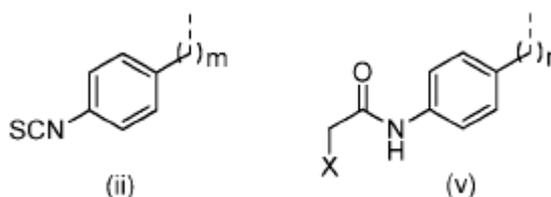


en la que R^3 y L^3 son como se define en la fórmula (I), y n es un entero seleccionado de 1 o 2, preferiblemente n es igual a 1.

10

En una realización, $-L^2-R^2$ en la fórmula (Ib) y $-L^3-R^3$ en la fórmula (Ic) preferiblemente se seleccionan de las fórmulas (ii) y (v):

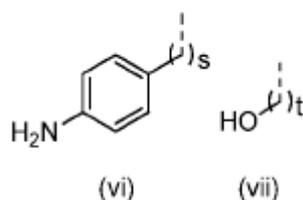
15



en las que m y r representan cada uno independientemente un entero que varía desde 0 hasta 10, preferiblemente 0, 1, 2, 3 o 4 y X representa un halógeno, preferiblemente Cl. En una realización específica, m es preferiblemente igual a 1 en la fórmula (ii).

20

En una realización, $-L^2-R^2$ en la fórmula (Ib) y $-L^3-R^3$ en la fórmula (Ic) son preferiblemente de la fórmula (vi) o (vii):



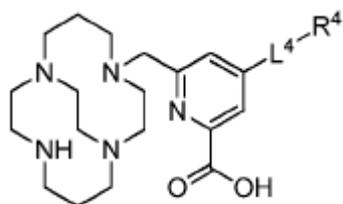
25

en las que s y t representan un entero que varía desde 0 hasta 10, preferiblemente 0, 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente s es igual a 1 o 2.

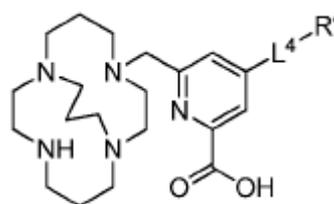
30

La realización anterior se refiere a la definición preferida de $-L^2-R^2$ en la fórmula (Ib) y $-L^3-R^3$ en la fórmula (Ic) también aplica a $-L^2-R^2$ en la fórmula (Ib- R^5) y $-L^3-R^3$ en la fórmula (Ic- R^5).

En una realización, el ligando de la invención es de la fórmula (Id') o (Id'')



(Id')



(Id'')

5

en la que R⁴ y L⁴ son como se define en la fórmula (I).

En una realización, -L⁴-R⁴ en la fórmula (Id') o (Id'') es preferiblemente de la fórmula (iv):



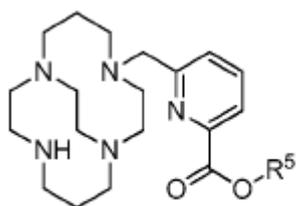
(iv)

10

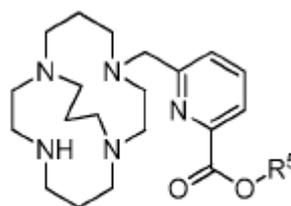
en la que q representa un entero que varía desde 0 hasta 6, preferiblemente 0, 1, 2, 3 o 4.

En una realización, el ligando de la invención es de la fórmula (Ie') o (Ie'')

15



(Ie')

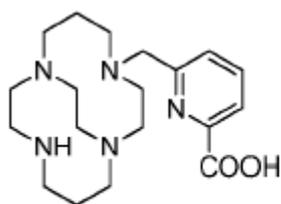


(Ie'')

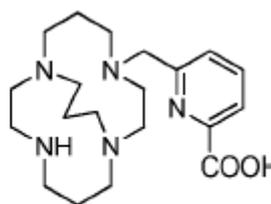
20

en la que R⁵ es como se define en la fórmula (I), preferiblemente R⁵ es una función de activación, en la que la función de activación se selecciona del grupo que comprende N-hidroxisuccinimida, N-hidroxisuccinimida y maleimida; haluro; -OCOR⁸ en el que R⁸ se selecciona de alquilo, arilo.

En una realización específica, el ligando de la invención es de la fórmula "Hcb-te1pa" o "Hpcb-te1pa":



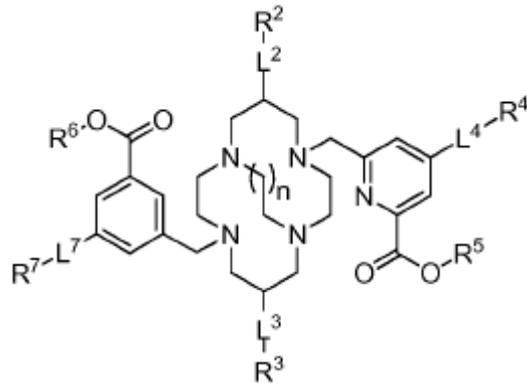
Hcb-te1pa



Hpcb-te1pa

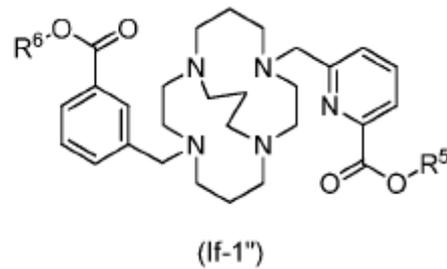
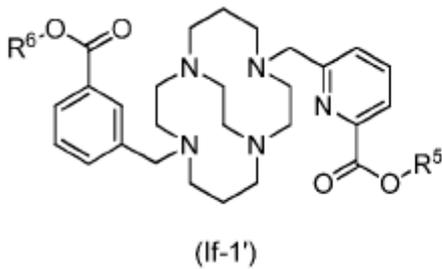
25

En una realización, el ligando de la invención es de la fórmula (If)



en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, L¹, L², L³, L⁴ y L⁷ son como se define en la fórmula (I).

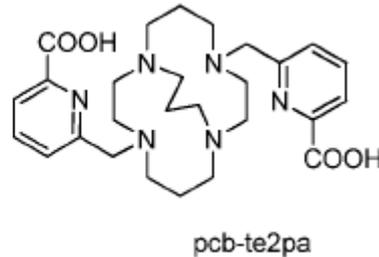
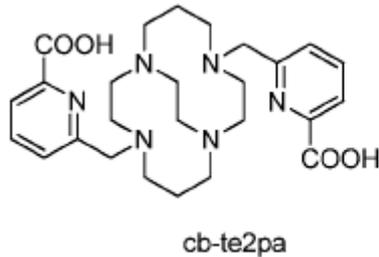
- 5 En una realización, el ligando de la invención es de la fórmula (If-1') o (If-1'')



en la que R⁵ y R⁶ son como se define en la fórmula (I).

10

En una realización específica, el ligando de la invención es de la fórmula "cb-te2pa" o "pcb-te2pa":



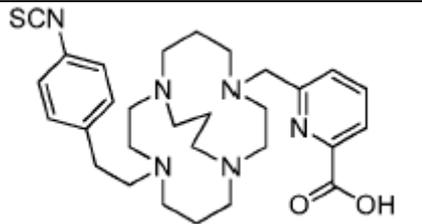
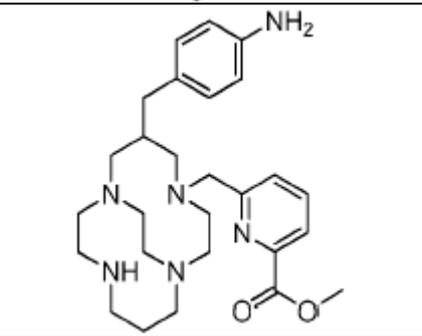
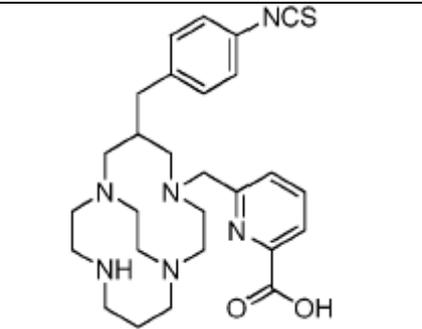
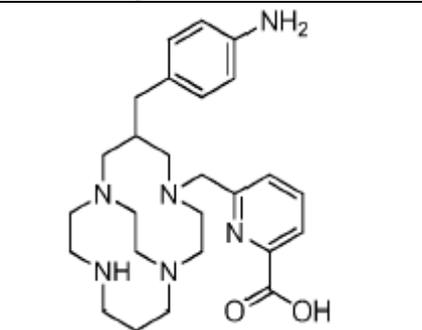
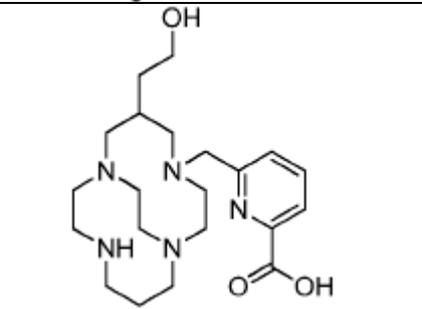
- 15 De acuerdo con una realización específica, el ligando de la fórmula (I) de la invención se injerta sobre nanopartículas.

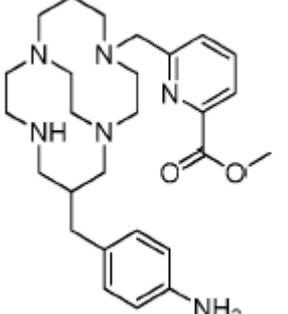
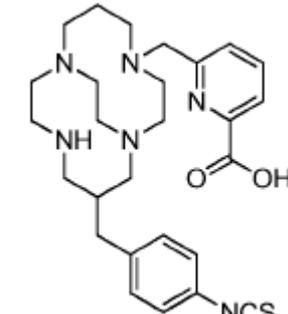
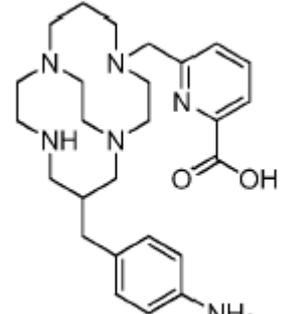
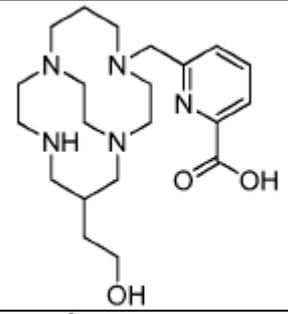
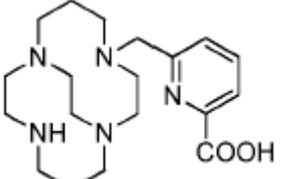
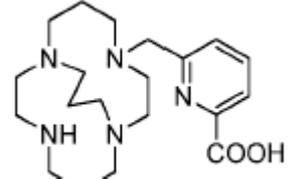
Los compuestos particularmente preferidos de la fórmula (I) de la invención con aquellos enumerados en la Tabla 1 adelante.

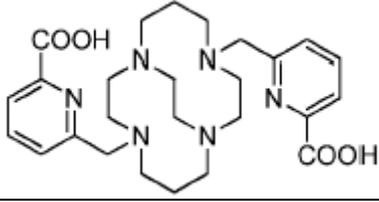
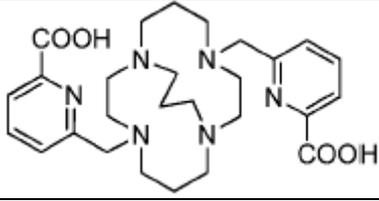
20

TABLA 1

Comp. No.	Estructura	Nombre químico
la'-1		ácido 6-((11-(4-isotiocianatofenetil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico

Comp. No.	Estructura	Nombre químico
Ia ⁿ -1		<p>ácido 6-((11-(4-isotiocianatofenil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.3]heptadecan-4-il)metil)picolínico</p>
Ib-R ⁵ -1		<p>6-((6-(4-aminobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolinato de metilo</p>
Ib-1		<p>ácido 6-((6-(4-isotiocianatobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico</p>
Ib-2		<p>ácido 6-((6-(4-aminobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico</p>
Ib-3		<p>ácido 6-((6-(2-hidroxietyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico</p>

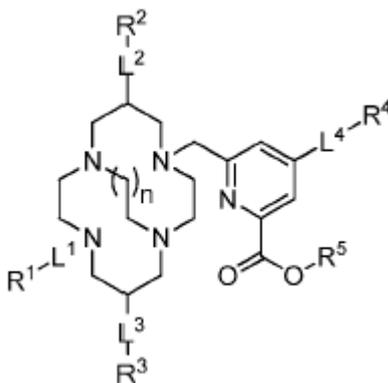
Comp. No.	Estructura	Nombre químico
Ic-R ⁵ -1		6-((13-(4-aminobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolinato de metilo
Ic-1		ácido 6-((13-(4-isotiocianatobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico
Ic-2		ácido 6-((13-(4-aminobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico
Ic-3		ácido 6-((13-(2-hidroxietyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico
Hcb-te1pa		ácido 6-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-ilmetil)picolínico
Hpcb-te1pa		ácido 6-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.3]heptadecan-4-ilmetil)picolínico

Comp. No.	Estructura	Nombre químico
cb-te2pa		ácido 6,6'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano-4,11-diilbis(metileno))dipicolínico
pcb-te2pa		ácido 6,6'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.3]heptadecano-4,11-diilbis(metileno))dipicolínico

Quelato

5 La presente invención se refiere adicionalmente a un quelato que resulta de la formación de complejos de un ligando de la invención de la fórmula (I) y un catión metálico seleccionado del grupo que comprende cobre (II), cobre (I), galio (III), zirconio (IV), tecnecio (III), indio (III), renio (VI), astato (III), bismuto (III), plomo (II), actinio (III), itrio (III), lutecio (III), samario (III), terbio (III) o holmio (III).

10 En una realización, la presente invención se refiere a un quelato que resulta de la formación de complejos de un ligando de la fórmula (I)



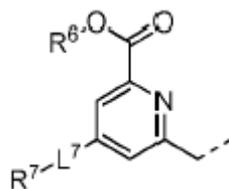
15 en la que

n es un entero seleccionado de 1 y 2;

R¹ representa:

20 - un átomo de hidrógeno;

- un brazo de picolinato de la fórmula (II)



25 - una función de acoplamiento, en la que la función de acoplamiento se selecciona del grupo que comprende amina; isotiocianato; isocianato; éster activado tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxiglutarimida o éster de maleimida; ácido carboxílico; ácido carboxílico activado tal como, por ejemplo, anhídrido de ácido o haluro de ácido; alcohol; alquino; haluro; azida; siloxi; ácido fosfónico; tiol; tetrazina; norborneno; oxoamina; aminooxi; tioéter; haloacetamida tal como, por ejemplo, cloroacetamida, bromacetamida o

30

yodoacetamida; glutamato; anhídrido glutárico, anhídrido succínico, anhídrido maleico; aldehído; cetona; hidrazida; cloroformato y maleimida;

- 5 - un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

R², R³, R⁴ y R⁷ cada uno representa independientemente:

- 10 - un átomo de hidrógeno;

15 - una función de acoplamiento, en la que la función de acoplamiento se selecciona del grupo que comprende amina; isotiocianato; isocianato; éster activado tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxisuccinimida o éster de maleimida; ácido carboxílico; ácido carboxílico activado tal como, por ejemplo, anhídrido de ácido o haluro de ácido; alcohol; alquino; haluro; azida; siloxi; ácido fosfónico; tiol; tetrazina; norborneno; oxoamina; aminooxi; tioéter; haloacetamida tal como, por ejemplo, cloroacetamida, bromacetamida o yodoacetamida; glutamato; anhídrido glutárico, anhídrido succínico, anhídrido maleico; aldehído; cetona; hidrazida; cloroformato y maleimida;

- 20 - un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

R⁵ y R⁶ cada uno representa independientemente:

- 25 - un átomo de hidrógeno;

- una función de activación, en la que la función de activación se selecciona del grupo que comprende N-hidroxisuccinimida, N-hidroxisuccinimida y maleimida; haluro; -OCOR⁸ en el que R⁸ se selecciona de alquilo, arilo;

- 30 - un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

L¹, L², L³, L⁴ y L⁷ cada uno representa independientemente:

- 35 - un enlace;

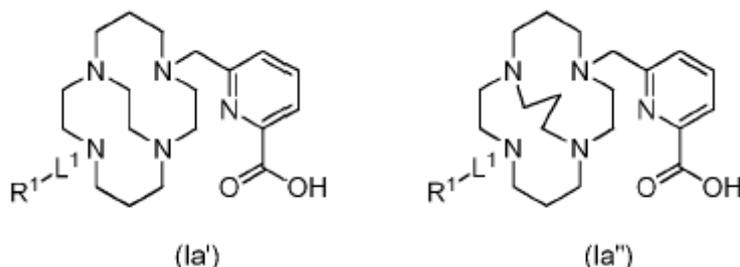
40 - un ligador seleccionado del grupo que comprende alquilo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, alquilheteroarilo, alquenilo, alquinilo, en el que las fracciones de alquilo se interrumpen opcionalmente por uno o más heteroátomos seleccionados de O, N y S; con un catión metálico seleccionado del grupo que comprende cobre (II), cobre (I), galio (III), zirconio (IV), tecnecio (III), indio (III), renio (VI), astato (III), bismuto (III), plomo (II), actinio (III), itrio (III), lutecio (III), samario (III), terbio (III) o holmio (III).

45 De acuerdo con una realización preferida, el catión metálico es un radioisótopo, preferiblemente un radioisótopo seleccionado del grupo que comprende ⁶⁴Cu(II), ⁶⁷Cu(II), ⁶⁸Ga(III), ⁸⁹Zr(IV), ^{99m}Tc(III), ¹¹¹In(III), ¹⁸⁶Re(VI), ¹⁸⁸Re(VI), ²¹⁰At(III), ²¹²Bi (²¹²Pb), ²¹³Bi(III), ²²⁵Ac(III), ⁹⁰Y(III), ¹⁷⁷Lu(III), ¹⁵³Sm(III), ¹⁴⁹Tb(III) o ¹⁶⁶Ho(III), más preferiblemente ⁶⁴Cu(II), ⁶⁷Cu(II) o ⁶⁸Ga(III).

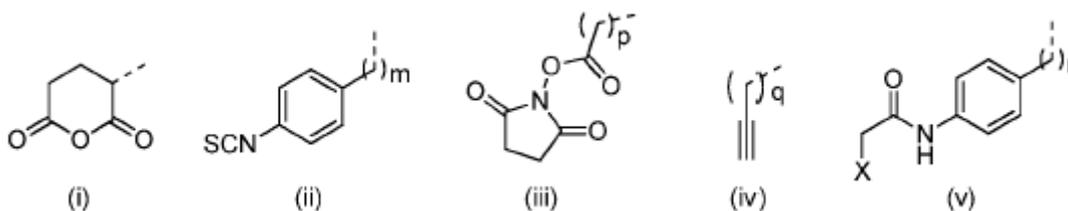
50 Cuando el catión metálico es un radioisótopo, el quelato de la invención es un radiofarmacéutico.

Las realizaciones preferidas que se refieren al ligando de la fórmula I descrito anteriormente aplican al quelato de la invención.

55 Especialmente, en una realización, el ligando del quelato de la invención es de la fórmula (Ia') o (Ia'')

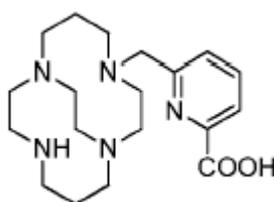


en la que -L¹-R¹ se selecciona de las fórmulas (i), (ii); (iii), (iv) y (v):



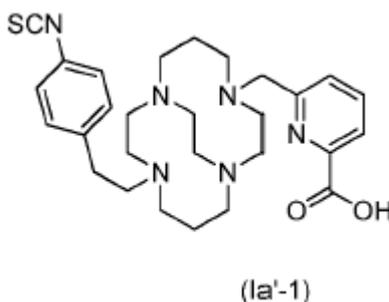
5 en las que m, p, q y r representan cada uno independientemente un entero que varía desde 0 hasta 10, preferiblemente 0, 1, 2, 3 o 4 y X representa un halógeno, preferiblemente Cl.

De acuerdo con una realización específica, el ligando del quelato de la invención es de la fórmula Hcb-te1pa:



10

De acuerdo con una realización específica, el ligando del quelato de la invención es de la fórmula (Ia'-1)



15

De acuerdo con una realización específica, el ligando del quelato de la invención son aquellos enumerados en la Tabla 1 anterior.

20 El quelato de la invención cumple todos los requisitos de las especificaciones descritas en la introducción de la presente solicitud. Las evidencias se proporcionan en la parte experimental a continuación.

Proceso de fabricación de ligando y quelato

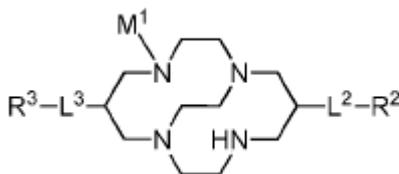
Síntesis del ligando

25

La presente invención se refiere adicionalmente a un proceso para fabricar el ligando de la invención.

De acuerdo con una realización, el proceso para fabricar el ligando de la fórmula (I) de la invención comprende:

30 - hacer reaccionar el compuesto de la fórmula (I)



en la que

35

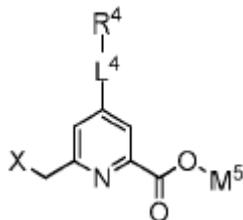
L², R², L³ y R³ son como se define en la fórmula (I),

M¹ representa

un átomo de hidrógeno,

5 un grupo de protección amino tal como, por ejemplo, un grupo carbobenciloxi, p-metoxibencil carbonilo, tertbutoxi carbonilo, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, benzoilo, bencilo, carbamato, p-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, p-metoxifenilo, tosilo, arilsulfonilo, o cualquier otro grupo de protección de amino adecuado conocido por aquellos expertos en la técnica,

10 -L¹-R¹, en la que L¹ y R¹ son como se define en la fórmula (I); con el compuesto de la fórmula (ii)



15 en la que

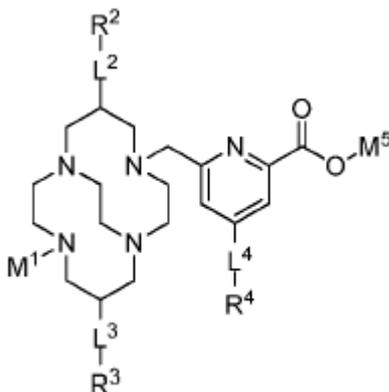
L⁴ y R⁴ son como se define en la fórmula (I)

X representa un átomo de halógeno, preferiblemente Cl; y

20 M⁵ representa

un grupo de protección seleccionado de grupo alquilo, preferiblemente metilo o etilo, más preferiblemente metilo;

25 R⁵, en el que R⁵ son como se define en la fórmula (I) dado que no representa un átomo de hidrógeno; para producir el compuesto de la fórmula (iii)



30 en la que L², R², L³, R³, L⁴ y R⁴ son como se define en la fórmula (I) y M¹ y M⁵ son como se definió anteriormente;

- y en la que se hace necesario realizar (iii) una o más etapas posteriores seleccionadas de:

35 ◦ desproteger la función ácida protegida por M⁵, para producir el compuesto de la fórmula (I) en la que R⁵ representa un átomo de hidrógeno;

◦ introducir una función de activación o un grupo de vectorización sobre la función ácida para producir el compuesto de la fórmula (I) en la que R⁵ representa una función de activación o un grupo de vectorización;

40 ◦ desproteger la función amina protegida por M¹, para producir el compuesto de la fórmula (I) en la que -L¹-R¹ representa -H;

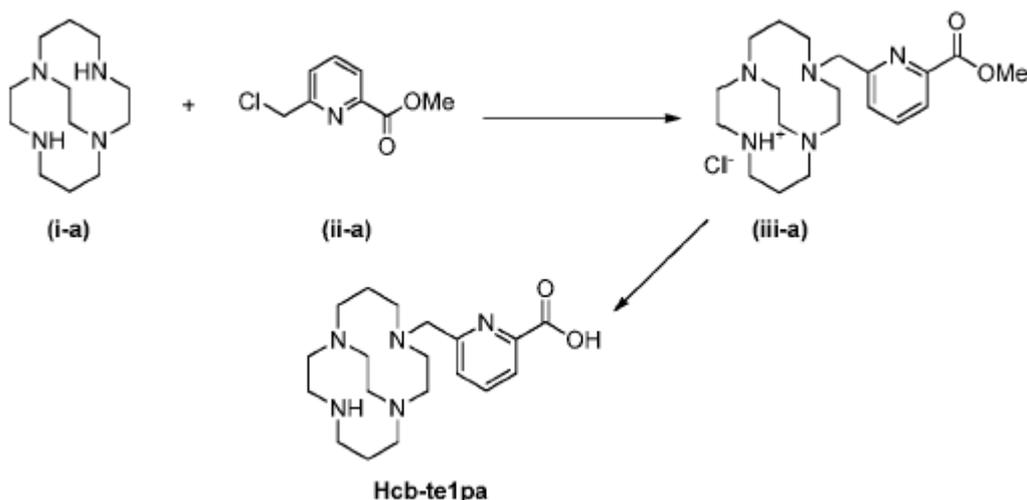
◦ introducir L¹-R¹ sobre la función amina, en la que -L¹-R¹ es como se define en la fórmula (I);

45

para producir el compuesto de la fórmula (I).

De acuerdo con una realización, en el caso en el que M^1 represente $-L^1-R^1$ y M^5 represente R^5 , el compuesto de la fórmula (iii) corresponda el compuesto de la fórmula (I).

De acuerdo con una realización preferida, el protocolo sintético utilizado para la preparación del ligando de Hcb-te1pa de la invención se describe en el esquema 4 y consiste en dos etapas que comienzan a partir de la ciclama de puente cruzado (ia) descrito anteriormente (Wong et al. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 10561-10572) y éster de 6-clorometilpiridina metilo (ii-a) (Mato-Iglesias et al. Inorg. Chem. 2008, 47, 7840-7851). La alquilación del ciclama restringida con el derivado electrofílico en ausencia de una base proporciona el compuesto (iii-a). El derivado de éster (iii-a) se hidroliza posteriormente con una solución ácida acuosa para llevar cuantitativamente a Hcb-te1pa, preferiblemente en su forma de sal de clorhidrato.



Esquema 4. Proceso de fabricación del ligando Hcb-te1pa

Síntesis de quelato

La presente invención se refiere adicionalmente a un proceso de fabricación del quelato de la invención.

De acuerdo con una realización, el proceso para fabricar un quelato de acuerdo con la invención comprende hacer reaccionar un ligando de la fórmula (I) de acuerdo con la invención con un catión metálico seleccionado del grupo que comprende cobre (II), cobre (I), galio (III), zirconio (IV), tecnecio (III), indio (III), renio (VI), astato (III), bismuto (III), plomo (II), actinio (III), itrio (III), lutecio (III), samario (III), terbio (III) o holmio (III).

En una realización, el proceso de fabricación del quelato de la invención comprende hacer reaccionar el ligando de la fórmula (I) de la invención con un catión metálico en un medio acuoso, preferiblemente al ajustar el pH alrededor de la neutralidad con KOH. El proceso de la invención se realiza preferiblemente a una temperatura que varía desde temperatura ambiente hasta reflujo, preferiblemente a temperatura ambiente. El proceso de quelación generalmente se realiza durante un periodo que varía desde pocos minutos hasta 24 horas.

En una realización, el catión metálico utilizado en el proceso la invención está bajo la forma de una sal, preferiblemente sales de perclorato, cloruro, bromuro, nitratos, sulfatos, acetato, triflato.

En una realización preferida, el proceso de fabricación de un quelato de cobre(II) de acuerdo con la invención comprende hacer reaccionar el ligando de la fórmula (I) de la invención con un catión de cobre en una solución acuosa. En una realización, el catión de cobre se selecciona del grupo que comprende $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$, $Cu_2(OAc)_4$, $CuCl_2$, $Cu(NO_3)_2$, $Cu(OSO_2CF_3)_2$. En una realización preferida, la formación de complejos del catión de cobre se realiza a un pH que varía desde 2 hasta 12, preferiblemente desde 2 hasta 7, más preferiblemente un pH de aproximadamente 7.

Uso del quelato

La invención se dirige adicionalmente a los quelatos de la invención para uso en medicina nuclear, preferiblemente como agentes de formación de imágenes o medicamentos, preferiblemente como radiofarmacéuticos.

Los quelatos de la invención son útiles como agentes de formación de imágenes. En particular, quelatos de radioisótopos, preferiblemente se pueden utilizar quelatos de ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{89}Zr , ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{186}Re , ^{177}Lu , ^{153}Sm o

¹⁶⁶Ho en la formación de imágenes de PET y/o en la formación de imágenes de SPECT. Los quelatos de gadolinio (III) se pueden utilizar en formación de imágenes de MRI. Los quelatos de lantánidos, preferiblemente quelatos de Eu(III), Tb(III) o Yb(III), se pueden utilizar para formar imágenes mediante luminiscencia.

5 Los quelatos de la invención también son útiles como medicamentos. En particular, se pueden utilizar los quelatos de radioisótopos, preferiblemente quelatos de ⁶⁷Cu, ⁸⁹Zr, ¹⁸⁸Re, ²¹⁰At, ²¹²Bi (²¹²Pb), ²¹³Bi, ²²⁵Ac, ⁹⁰Y, ¹⁵³Sm o ¹⁴⁹Tb en RIT. Dependiendo del grupo de vectorización presente sobre el quelato, se puede dirigir una amplia variedad de enfermedades. Por ejemplo, se pueden dirigir las siguientes enfermedades utilizando grupos de vectorización específicos:

10

Enfermedades	Grupo de vectorización	
	Nombre	Tipo
linfomas	anti-CD20	Anticuerpo
cáncer de próstata	anti-CEA bombesina	péptido de anticuerpo
cáncer de mama	anti-HER2	Anticuerpo
cáncer colorrectal	anti-EGFR	Anticuerpo
Tumores neuroendocrinos	análogos de somatostatina tal como octreotida, TATE, TOC	péptido
neoangiogénesis de tumor	análogos de RGD (para direccionamiento de integrina)	péptido

Por lo tanto, la invención proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva de un quelato de la invención, preferiblemente un quelato de un radioisótopo, para uso en el tratamiento de un paciente en necesidad del mismo.

15 La invención proporciona adicionalmente el uso de un quelato de la invención, preferiblemente un quelato de un radioisótopo, para la fabricación de un medicamento, preferiblemente un radiofarmacéutico.

De acuerdo con una realización, se pueden administrar los quelatos de la invención como parte de una terapia de combinación. Por lo tanto, se incluyen dentro del alcance de la presente invención las realizaciones que comprenden la coadministración de un compuesto de la presente invención como ingrediente activo y agentes terapéuticos y/o ingredientes activos adicionales.

20

La presente invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende el quelato de la invención en asociación con por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25

La presente invención se refiere adicionalmente a un medicamento que comprende el quelato de la invención.

En general, para uso farmacéutico, los quelatos de la invención se pueden formular como una preparación farmacéutica que comprende por lo menos un quelato de la invención y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente, excipiente y/o adyuvante, y opcionalmente uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

30

Por medio de ejemplos no limitantes, dicha formulación puede estar en una forma adecuada para administración oral, administración parenteral (tal como por vía intravenosa, intramuscular, inyección intradérmica o subcutánea o infusión intravenosa), para la administración intralesional, para administración submucosa, para administración intra-articular, para administración intra-cavitaria, para administración tópica (que incluye ocular), por embolización de las arterias, para administración mediante inhalación, para un parche para la piel, para un implante, para un supositorio, etc. Dichas formas de administración adecuadas - que pueden ser sólidas, semi-sólidas o líquidas, dependiendo de la forma de administración -, así como procedimientos y vehículos, diluyentes y excipientes para uso en la preparación de los mismos, serán evidentes para el experto; se hace referencia a la última edición de Remington Pharmaceutical Sciences.

35

40

Algunos ejemplos preferidos pero no limitantes de dichas preparaciones incluyen comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles, ungüentos, cremas, lociones, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios, gotas, soluciones inyectables estériles y polvos empacados estériles (que por lo general se reconstituyen antes de uso) para administración en forma de bolo y/o administración continua, que se puede formular con vehículos, excipientes y diluyentes que son adecuados per se para dichas formulaciones, tales como sales (especialmente NaCl), glucosa, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, povidona, polietilenglicol, celulosa, agua (estéril), metilcelulosa, metil- y propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio, aceites comestibles, aceites vegetales y aceites minerales o mezclas adecuadas de los mismos. Las formulaciones pueden contener opcionalmente otras sustancias que se utilizan comúnmente en formulaciones farmacéuticas, tales como tampones, antioxidantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes dispersantes, desintegrantes, agentes de carga, rellenos, agentes

50

conservantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, reguladores de flujo, agentes de liberación, etc. Las composiciones también se pueden formular con el fin de proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del compuesto activo(s) contenido en las mismas.

5 Las preparaciones farmacéuticas de la invención están preferiblemente en una forma de dosificación unitaria, y se pueden empacar convenientemente, por ejemplo, en una caja, blíster, frasco, botella, bolsa, ampolla o en cualquier otro soporte o recipiente de una sola dosis o múltiples dosis adecuado (que puede ser marcado adecuadamente); opcionalmente con uno o más folletos con información y/o instrucciones para uso del producto.

10 Uso del ligando

De acuerdo con una realización, el ligando de la invención se utiliza para la síntesis de un quelato de acuerdo con la presente invención.

15 De acuerdo con una realización, el ligando de la invención se puede utilizar como agentes de quelación para quelatos que se pueden utilizar como agentes de formación de imágenes o medicamentos en medicina nuclear.

De acuerdo con una realización, el ligando de la invención se puede utilizar como agente de eliminación.

20 De acuerdo con una realización, el ligando de la invención se utiliza para la descontaminación de medio líquido mediante atrapamiento de cationes metálicos.

De acuerdo con una realización específica, el ligando de la invención se puede utilizar en depuración de efluentes contaminados con metales. Especialmente, el ligando de la invención se puede utilizar para atrapar plomo o elementos radioactivos. En una realización preferida, el ligando de la invención se utiliza para ultrapurificación de líquidos. En la presente invención, la "ultrapurificación" se refiere a la purificación de una solución contaminada a un nivel de contaminante que es mucho menor de 1 ppm (parte por millón), y generalmente en el rango de ppb (parte por billón), ppt (parte por trillón), o menor, es decir, una solución ultrapura.

25

30 De acuerdo con otra realización, el ligando de la invención se puede utilizar en la detección de catión, preferiblemente en la detección de trazas de cationes metálicos.

De acuerdo con una realización, el ligando y/o el quelato de la invención se puede injertar en el soporte sólido, tal como, por ejemplo, nanopartículas, preferiblemente nanopartículas de oro o nanopartículas de hierro.

35 De acuerdo con una realización, el ligando y/o el quelato de la invención se pueden ligar a otros ligandos/ quelatos, tal como, por ejemplo, porfirinas, ciclodextrinas, calixarenos o azacicloalcanos.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 es una vista de la estructura cristalina de rayos X de $\text{cb-te1pa}(\text{ClO}_4)_2$ en la que los aniones de perclorato y átomos de hidrógeno unidos a átomos de carbono se omiten para claridad. La gráfica ORTEP está en el nivel de probabilidad del 30%.

45 La Figura 2 es una vista de ORTEP de $[\text{Cu}(\text{cb-te1pa})](\text{ClO}_4)_2$ en la que los aniones de perclorato, moléculas de agua y átomos de hidrógeno unidos a átomos de carbono se omiten para claridad.

Ejemplos

50 La presente invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos están destinados a representar las realizaciones específicas de la invención, y no pretenden ser limitantes del alcance de la invención.

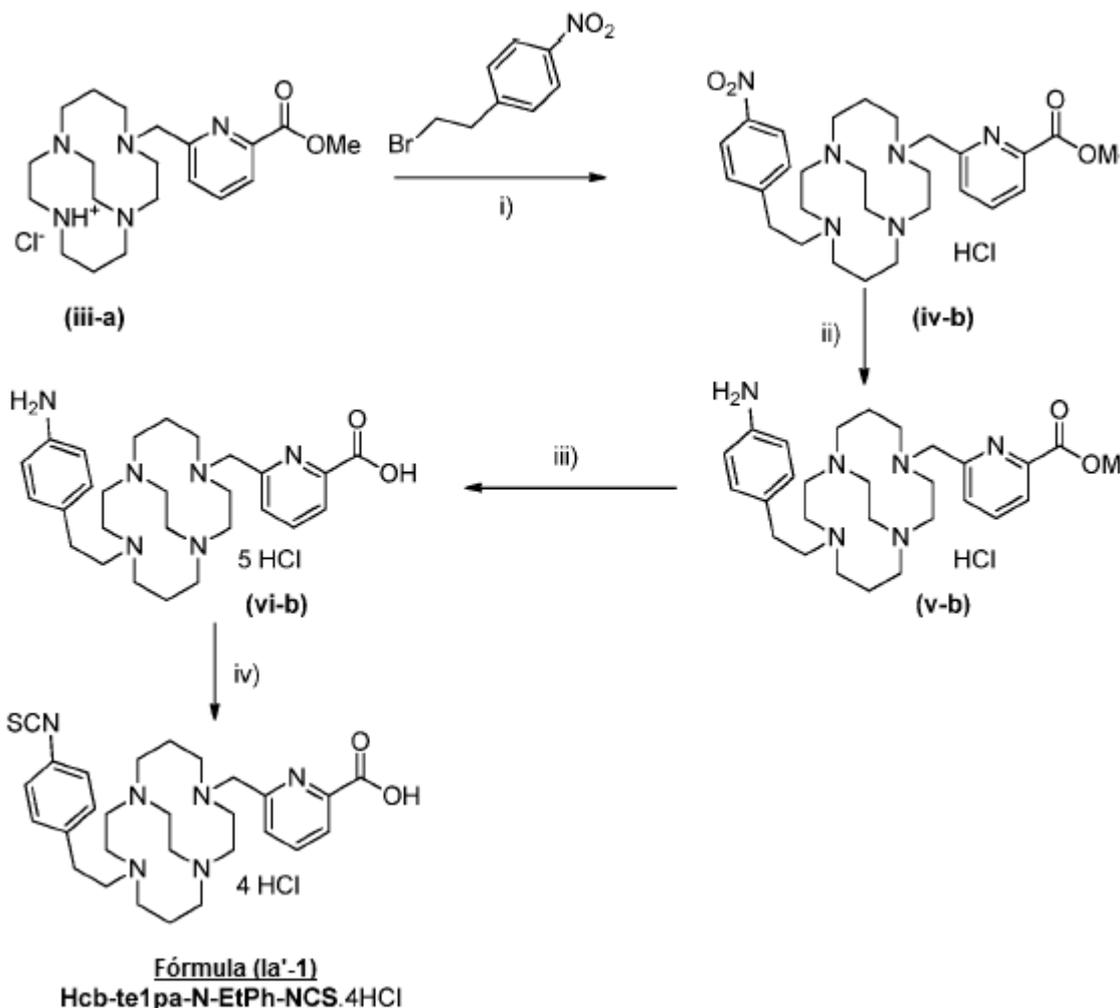
I. Materiales y Procedimientos

55 Los reactivos se adquirieron de Aldrich Chemical Co. La ciclama i-a con puente cruzado se adquirió de CheMatech (Dijon, Francia) y el éster de metilo de ácido 6-clorometil-piridina-2-carboxílico ii-a se sintetizó como se describió previamente (Mato-Iglesias, M. Et al. Inorg. Chem. 2008, 47, 7840-7851). Los análisis elementales se realizaron en el Service de Microanalyse, CNRS, 69360 Solaize, Francia. Los espectros de masas RMN y MALDI se registraron en los "Servicios communs" de la Universidad de Brest. Los espectros ^1H y ^{13}C RMN se registraron con el espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz). Los espectros de masas MALDI se registraron con un espectrómetro smartbeam Autoflex MALDI TOF III.

60

Cuando se utiliza en lo sucesivo, "ca." significa "calculado".

65 II. Síntesis de los ligandos



Etapa i) trans-di-N-funcionalización de ciclam de mono-metilpicolinato con puente cruzado iii-a que produce el compuesto iv-b

Se agregaron bromuro de 4-nitrofeniletilo (0.968 g, 4.20 mmol) y carbonato de potasio (0.872 g, 6.31 mmol) a una solución de iii-a (0.865, 2.10 mmol) en 200 mL de acetonitrilo destilado. La mezcla se sometió a reflujo durante la noche. Después de la evaporación del solvente, el producto crudo se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (CHCl₃/MeOH 8/2) para producir compuesto iv-b como un aceite amarillo (1.000 g, 85%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1.63-1.70 (m, 4 H); 2.50-3.42 (m, 23 H); 3.77-3.85 (m, 6 H); 7.41 (d, J = 9 Hz, 2 H); 7.43 (d, J = 6 Hz, 1 H); 7.72 (t, J = 6 Hz, 1 H); 7.86 (d, J = 6 Hz, 1 H); 7.86 (d, J = 9 Hz, 2 H); 10.50 (S; 1 H). RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 24.1; 24.5; 30.2; 50.0; 51.6; 51.7; 52.6; 52.8; 53.0; 53.6; 53.9; 54.0; 56.3; 57.7; 58.6; 123.5; 123.8; 127.2; 129.9; 137.5; 146.2; 147.4; 147.6; 157.7; 165.2. ESI-HRMS: calculado m/z = 525.31838 [M + H]⁺ para C₂₈H₄₁N₆O₄, encontrado 525.31838.

Etapa ii): Reducción del compuesto iv-b que produce v-b.

Se agregaron cloruro de estaño (1.810 g, 9.55 mmol) y iv-b (0.500 g, 0.95 mmol) a una solución de 40 mL 1/9 de MeOH/HCl ac. 12M. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche luego el exceso de HCl se neutralizó utilizando carbonato de potasio. El compuesto v-b deseado se obtuvo mediante extracción con cloroformo a pH = 14 como aceite amarillo (420 mg, 83%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1.55 (b s, 4 H); 2.46-3.14 (m, 23 H); 3.69-3.84 (m, 8 H); 6.51 (d, J = 9 Hz, 2 H); 6.77 (d, J = 9 Hz, 2 H); 7.38 (d, J = 6 Hz, 1 H); 7.69 (t, J = 6 Hz, 1 H); 7.84 (d, J = 6 Hz, 1 H); 10.46 (S; 1 H). RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 24.0; 24.5; 30.2; 51.0; 51.6; 51.8; 52.2; 52.4; 52.6; 54.0; 54.2; 55.1; 56.3; 56.8; 58.4; 115.2; 123.7; 127.1; 128.5; 129.1; 137.5; 145.1; 147.3; 157.7; 165.3. ESI-HRMS: calculado m/z = 495.34475 [M + H]⁺ para C₂₈H₄₃N₆O₄, encontrado 495.34420.

Etapa iii): Hidrólisis del compuesto v-b que produce vi-b.

Ae agregó lentamente ácido clorhídrico (10 mL, 6 M) al compuesto v-b (0.200 g, 0.38 mmol) y la mezcla se sometió a reflujo durante la noche. Después de enfriamiento a temperatura ambiente, el solvente se evaporó para producir vi-b como un sólido blancuzco en rendimiento cuantitativo.

RMN ¹H (D₂O, 300 MHz): 1.63-1.70 (m, 4 H); 2.11-3.68 (m, 28 H); 4.70 (d, J = 15 Hz, 1 H); 5.03 (d, J = 15 Hz, 1 H); 6.74 (d, J = 9 Hz, 2 H); 6.93 (d, J = 9 Hz, 2 H); 7.26-7.33 (m, 2 H); 7.56 (t, J = 6 Hz, 1 H). RMN ¹³C (D₂O, 75 MHz): 20.9; 21.4; 28.5; 48.4; 50.9; 60.0; 52.2; 53.2; 55.6; 55.9; 57.4; 57.8; 58.0; 59.2; 60.2; 123.5; 123.8; 127.2; 129.9; 137.5; 146.2; 147.4; 147.6; 157.7; 165.2. ESI-HRMS: calculado m/z = 481.32910 [M + H]⁺ para C₂₇H₄₁N₆O₄, encontrado 481.32855.

Etapa iv): Formación del derivado de isotiocianato del compuesto vi-b que produce cb-te1pa-N-EtPh-NCS.

vi-b.5 HCl (100 mg, 0.15 mmol) se disolvió en ácido clorhídrico (1 mL, 3 M) luego se agregó una solución de tiofosgeno (0.435 mg, 3.00 mmol) en 1 mL de cloroformo a la mezcla de reacción. Después de agitación durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se lavó con cloroformo (5 x 1 mL) mediante agitación bifásica vigorosa seguida por decantamiento de la fase orgánica para eliminar el exceso de tiofosgeno. El compuesto cb-te1pa-N-EtPh-NCS se obtuvo mediante una liofilización durante la noche como un sólido blancuzco esponjoso en rendimiento cuantitativo.

RMN ¹H (D₂O, 300 MHz): 1.13 (t, J = 7.5 Hz, 2 H); 1.64-1.81 (m, 2 H); 2.39-4.01 (m, 26 H); 4.31 (d, J = 15 Hz, 1 H); 5.22 (d, J = 15 Hz, 1 H); 7.52 (d, J = 9 Hz, 2 H); 7.03 (d, J = 9 Hz, 2 H); 7.50-7.57 (m, 2 H); 7.82 (t, J = 6 Hz, 1 H). RMN ¹³C (D₂O, 75 MHz): 21.1; 21.5; 28.5; 48.5; 51.2; 52.2; 53.5; 55.7; 56.0; 57.9; 58.2; 59.3; 60.6; 128.4; 129.0; 130.2; 132.0; 132.2; 137.0. 138.1; 141.8; 149.0; 153.7; 169.5. ESI-MS: m/z = 523.30 (M+1).

II.3. Síntesis de compuestos funcionalizados en C

Los compuestos funcionalizados en C, especialmente aquellos de la fórmula (Ib-R⁵-1), (Ib-1), (Ib-2), (Ib-3), (Ic-R⁵-1), (Ic-1), (Ic-2) y (Ic-3), se pueden preparar como se describe en WO2013/072491, especialmente como se describe para los compuestos del tipo XVI, y más precisamente como se describe en ejemplo 3 para el compuesto (10) (página 30 del documento WO2013/072491).

II.4. Conjugación de Ib-1 a Trastuzumab

Se agrega trastuzumab (4 mg) a una solución de Ib-1 (0.53 mg) en Na₂CO₃ 0.1 M (pH 9.0, 100 µL). La solución resultante se agita gentilmente a temperatura ambiente durante la noche. Al siguiente día, esta solución luego se coloca sobre un centricon YM-50 (Millipore), y se centrifuga para reducir el volumen y se lava con PBS (pH 7.4, 2 mL) tres veces para eliminar el quelador Ib-1 sin reaccionar. El conjugado Ib-1-trastuzumab purificado se recolecta finamente en 2 mL de PBS y se almacena a -20 °C.

III. Síntesis de quelatos

III.1. Formación de complejos de cobre(II) mediante Hcb-te1pa

Preparación de [Cu(cb-te1pa)]ClO₄.

Se agregó Cu(ClO₄)₂·6H₂O (0.070 g, 0.19 mmol) a una solución de Hcb-te1pa·4.5HCl·3H₂O (0.100 g, 0.17 mmol) en 10 mL de agua, y el pH se ajustó a ≈7 con una solución de KOH acuosa. La mezcla se calentó a 80°C durante 2 h y luego se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se filtraron las impurezas sólidas, y la solución se evaporó hasta secado. Después de adición de acetonitrilo, el polvo gris se filtró y el filtrado se evaporó para producir compuesto [Cu(cb-te1pa)]ClO₄ como un polvo azul (0.090 g, 83%).

Una vista ORTEP de la estructura de [Cu(cb-te1pa)](ClO₄)₂ se muestra en la Figura 2.

Se puede realizar la formación de complejos de otro catión metálico al utilizar el mismo protocolo.

III.2. Formación de complejos de ⁶⁴Cu o ⁶⁸Ga mediante cb-te1pa

Se alcanzó radiomarcado de ⁶⁴Cu de quelato mediante adición de 50 µL de solución de ⁶⁴CuCl₂ (40 a 60 MBq; composición metálica: 10 ppm de cobre para 60 ppm de metales en total) a una mezcla de 50 µL de hidróxido de sodio 0.1 M y 500 µL de soluciones de Hcb-te1pa 1 mM en acetato de amonio 0.1 M. Las mezclas de reacción se agitaron a temperatura ambiente (temperatura ambiente) durante 15 min para Hcb-te1pa. [⁶⁴Cu]acetato se obtuvo mediante adición de 50 µL de solución de ⁶⁴CuCl₂ a una mezcla que contiene 50 µL de hidróxido de sodio 0.1 M y 500 µL de acetato de amonio 0.1 M. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La pureza radioquímica de la solución [⁶⁴Cu]cb-te1pa se controló con TLC y HPLC. Se tomó el [⁶⁴Cu]acetato como referencia en el sistema cromatográfico.

Se radiomarcó ^{64}Cu Hcb-te1pa con éxito a temperatura ambiente en menos de 15 min. Ambos cromatogramas TLC y HPLC mostraron un total de especies radiomarcadas mayor de 99% de rendimiento. Esto confirma los resultados obtenidos para la formación de complejos de cobre natural(II) por Hcb-te1pa. Las pruebas llevadas a cabo para optimizar el marcado también mostraron que el Hcb-te1pa se puede radiomarcarse incluso utilizando una concentración de ligando 0.01 mM. Esto demuestra una importante selectividad de Hcb-te1pa para el cobre(II) sobre cationes divalentes contaminantes en solución (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} o Zn^{2+}), ya que la relación de Hcbte1pa/metales totales fue inferior a 1.

El radiomarcado ^{68}Ga quelato se consiguió utilizando el mismo procedimiento con reactivos apropiados. El Hcb-te1pa se radiomarcó ^{68}Ga con éxito y se obtuvo un total de especies radiomarcadas de más del 99% de rendimiento.

III.3. Formación de complejos de ^{64}Cu por Ib-2

La formación de complejos de ^{64}Cu con Ib-2 se puede lograr mediante una preincubación de 30 min de Ib-2 (100 μg) en EtOH con un exceso de Cs_2CO_3 a 90°C con agitación constante. Después de centrifugación, se agrega $^{64}\text{CuCl}_2$ al sobrenadante aislado. La mezcla se agita con vórtex y se incuba a 90°C durante 30 min. La mezcla se centrifuga, y se evapora el sobrenadante aislado. La mezcla seca se disuelve en agua, y se hace pasar a través de filtro de 0.2 μm de Nylon Acrodisk 13. La formación de complejos de ^{64}Cu -Ib-2 se puede verificar por radio-TLC utilizando una fase móvil que consiste de MeOH: acetato de amonio al 10% (1:1) sobre placas de sílice. Se puede lograr análisis Radio-HPLC de ^{64}Cu -Ib-2 utilizando la columna Xbridge C18 (4.6 x 150 mm, 5 μm) con un procedimiento isocrático (0.1% de TFA en agua: MeOH (96:4), 1 mL/min de índice de flujo).

III.4. Formación de complejos de ^{64}Cu por Ib-1-trastuzumab

Se agregó ^{64}Cu (0.5-2 mCi) en tampón de NH_4OAc 0.1 M (pH 8.0, 100 μL) a 80 μg de Ib-1-trastuzumab (párrafo cf II.4 anterior) en tampón de NH_4OAc 0.1 M (pH 8.0, 100 μL) o agua destilada simple. Se incuba la mezcla de reacción a 25°C durante 10 min, luego se agrega 50 μg de DTPA y la mezcla de reacción se incuba adicionalmente durante 20 min a 30°C. El rendimiento radioquímico se puede comprobar con cromatografía en capa fina instantánea (ITLC-SG, solución salina). El Ib-1- trastuzumab marcado con ^{64}Cu se purifica mediante centrifugación utilizando filtro YM-50 para eliminar cualesquiera complejos de ^{64}Cu -DTPA. La pureza radioquímica se puede determinar mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión por tamaño (Bio Silect SEC 250-5 300 x 7.8 mm; velocidad de flujo 1 mL/min, con la fase móvil isocrática que consiste en PBS, pH 7.4).

35 Determinación de actividad específica de ^{64}Cu -Ib-1-trastuzumab

Se agrega la cantidad fija de ^{64}Cu (220 μCi) en tampón de NH_4OAc 0.1 M (pH 8.0, 100 μL) a diversas concentraciones (1-80 μg) de Ib-1-trastuzumab en tampón NH_4OAc 0.1 M (pH 8.0, 100 μL). Se incuba la mezcla de reacción a 25°C durante 10 min, a continuación, se agregan 50 μg de DTPA y la mezcla de reacción se incuba adicionalmente durante 20 min a 30°C. El rendimiento radioquímico se comprueba con cromatografía en capa fina instantánea (ITLC-SG, solución salina). Se pueden utilizar tres concentraciones de Ib-1-trastuzumab que muestran 40-90% de rendimiento de radiomarcado para calcular la actividad específica del Ib-1-trastuzumab marcado con ^{64}Cu .

45 IV. Propiedades fisicoquímicas del complejo cobre(II) de Hcb-te1pa

IV.A. Procedimientos

IV.A.1. Estudios potenciométricos

Equipo y condiciones de trabajo. La configuración potenciométrica se ha descrito en Roger, M. et al. Inorg. Chem. 2013, 52, 5246-5259. El reactivo de titulación fue una solución de KOH preparada en ca. 0.1 M de una ampolla comercial de grado analítico, y su concentración exacta se obtuvo mediante aplicación del procedimiento de Gran luego de titulación de una solución de HNO_3 estándar (Rossotti, F. J. and Rossotti, H. J. J. Chem. Educ. 1965, 42, 375-378). Se prepararon soluciones de ligandos a aproximadamente 2.0×10^{-3} M, y las soluciones Cu^{2+} y Zn^{2+} a ca. 0.05 M de sales de nitrato de grado analítico y estandarizado por titulaciones complejométricas con H_4edta (ácido etilendiaminetetraacético). Las soluciones de muestra para la titulación contenían aproximadamente 0.04 mmol de ligando en un volumen de 30 mL, en la que la fuerza iónica se mantuvo a 0.10 M utilizando KNO_3 como electrolito de fondo. Se agregaron cationes de metal en 0.9 equiv. de la cantidad de ligando en titulaciones de formación de complejos. Se prepararon titulaciones en tanda de una manera similar, pero con cada punto de titulación correspondiente a 1/10 de la cantidad de una muestra de titulación convencional. Los puntos de titulación en tanda se incubaron en frascos herméticamente cerrados a 25°C hasta que las mediciones de potencial alcanzan estabilidad completa, que ocurrieron en una semana.

Mediciones. Todas las mediciones se llevaron a cabo a $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ en atmósfera inerte. La fuerza electromotriz de las soluciones de muestra se midió después de la calibración de los electrodos mediante titulación de una solución

de HNO₃ estándar a 2.0x10⁻³ M en las condiciones de trabajo. El [H⁺] de las soluciones se determinó por medición de la fuerza electromotriz de la celda, $E = E^{\circ} + Q \log [H^+] + E_j$. El término pH se define como $-\log[H^+]$. E^o y Q se determinaron a partir de la región de ácido de las curvas de calibración. Las desviaciones de la ley de Nernst a muy bajo pH (pH <2.5) se corrigieron con el software VLpH (software de calibración del fabricante de Hyperquad disponible gratuitamente en <http://www.hyperquad.co.uk/>), que realiza una [H⁺] de corrección basado en un procedimiento de calibración de pH muy bajo. Por el contrario, se encontró que el potencial de unión líquida, E_j, fue insignificante para pH > 2.5 bajo las condiciones experimentales utilizadas. El valor de K_w = [H⁺][OH⁻] se encontró que era igual a 10^{-13.78} mediante titulación de una solución de conocida [H⁺] a la misma fuerza iónica en la región de pH alcalina, considerando E^o y Q válido para todo el rango de pH. Cada titulación consistía de 80-100 puntos de equilibrio en el rango de pH 2.5 a 11.5 (o 1.5-11.5 para formaciones de complejo Cu²⁺), y por lo menos dos titulaciones replicadas se realizaron para cada sistema particular.

Cálculos. Los datos potenciométricos se refinaron con el software Hyperquad, y los diagramas de especiación se representaron utilizando el software HySS. Las constantes de equilibrio generales β^H y β_{MmHhLi} se definen por $\beta_{MmHhLi} = [M_m H_h L_i] / [M]^m [H]^h [L]^i$ ($\beta^H = [H_h L_i] / [H]^h [L]^i$ y $\beta_{MH-1L} = \beta_{ML(OH)} x K_w$). Las diferencias en unidades logarítmicas entre los valores de las constantes protonadas (o hidrolizadas) y no protonadas proporcionan las constantes de reacción en formas de etapa (log K) (siendo $K_{MmHhLi} = [M_m H_h L_i] / [M_m h_h L_i] [H]$). Los errores citados son las desviaciones estándar calculadas por el programa de ajuste de todos los datos experimentales para cada sistema.

IV.A.2. Estudios de cinética

Formación del complejo. La formación del complejo cobre(II) de Hcb-te1pa se estudió en soluciones acuosas tamponadas a 25°C. El aumento de la intensidad de la banda de d-d de transición del complejo en el rango visible (600 nm) fue seguida a pH = 5.0 (tampón de potasio de acetato 0.2 M) y pH = 7.4 (regulador HEPES 0.2 M), con [Cu²⁺] = [Hcb-te1pa] = 0.8 mM. Adicionalmente, también se estudió la formación de complejos a pH = 3.0 (0.2 M (K, H) Cl) bajo condiciones de pseudo-primer orden, siguiendo la banda de transferencia de carga cada vez mayor en el rango UV (a 310 nm) a [Cu²⁺] = 10x[Hcb-te1pa] = 2 mM.

Disociación de complejos. La disociación asistida por ácido del complejo de cobre (II) de Hcb-te1pa se estudió bajo condiciones de pseudo-primer orden en soluciones acuosas de HCl 5 M o HClO₄ 5 M que contenían el complejo en 1.0 x 10⁻³ M. Se agregó ácido concentrado a soluciones de muestra que contenían el complejo preformado sin control de la fuerza iónica, y la reacción se siguió por la intensidad decreciente de la banda de transición d-d del complejo, a la temperatura de 20, 25, 37, 60, y 90°C en HCl, y a 25°C en HClO₄.

IV.A.3. Estudios electroquímicos

Se midieron los voltamogramas cíclicos utilizando equipos Autolab a temperatura ambiente. Todas las mediciones se hicieron utilizando un sistema de tres electrodos: un electrodo de carbón vitrificado como un electrodo de trabajo, un alambre de platino como un contraelectrodo y un electrodo de referencia de calomelanos saturado. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron en ca. soluciones acuosas 1 mM del complejo preformado en una atmósfera de N₂ que contenía NaClO₄ 0.1 M como el electrólito de soporte. Desde el potencial inicial del análisis (0 V), el voltaje se elevó a -1.3 V, a continuación, a 0.2 V, y de nuevo a 0 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Todos los potenciales se expresan con respecto al electrodo de calomelanos saturado (SCE), excepto que se indique lo contrario.

IV.B Resultados y discusión

IV.B.1. Propiedades ácido-base de Hcb-te1pa

Las constantes de protonación de Hcb-te1pa se estudiaron en solución acuosa a 25.0°C. El compuesto tiene cinco centros básicos que consisten en los cuatro aminas y la función carboxilato, de los que sólo dos se pudo determinar con precisión mediante titulaciones potenciométricas (Tabla 1). Los resultados obtenidos para Hcb-te1pa se comparan con aquellos de otros dos tetraazacicloalcanos: te1pa y cb-ciclam.

El comportamiento de protones-esponja de compuestos macrocíclicos de tetraaza con puente cruzado es bien conocido, que corresponde al muy alto valor de la primera constante de protonación. Para Hcb-te1pa, dicho comportamiento se verificó por titulación espectroscópica RMN ¹H en D₂O en el rango de pH básico. Si bien no se marcan los cambios de resonancia en el rango de pD = 8-12, que corresponde sin duda, a la segunda constante de protonación del compuesto (véase adelante), no existen cambios de resonancias en el rango de pD = 12-14, y empezarán a ser visibles cambios de menor importancia a sólo por encima de pD = 14. Por lo tanto, es evidente que sólo en pD > 14 se lleva a cabo la última etapa de desprotonación. Sin embargo, los datos espectroscópicos que se podrían obtener para los valores más altos de pH no permiten la determinación de la primera protonación constante, ya que sólo se detectó el principio del proceso de desprotonación. Por lo tanto, un valor de 15 se postuló para la primera constante de protonación, que se utilizó posteriormente como una constante en todas las otras determinaciones de equilibrio termodinámico. Esta particularmente alta constante de protonación debe corresponder a la protonación de una de las aminas macrocíclicas, y debe ser altamente influenciada por las interacciones de

enlace de hidrógeno como es habitual en los compuestos relacionados con relativamente pequeñas y parcialmente cavidades estructurales cerradas.

5 Las constantes de protonación restantes de Hcb-te1pa se determinaron mediante titulaciones potenciométricas convencionales en solución acuosa y en fuerza iónica de KNO₃ 0.10 M. La segunda constante (log K = 10.13) debe corresponder a la protonación de una segunda amina macrocíclica, mientras que el tercero (log K = 2.43) debe corresponder a la protonación del grupo carboxilato, como se observa en la estructura de estado sólido de H₃cb-te1pa (ClO₄)₂ descrito anteriormente. No se pueden calcular otras constantes de protonación, lo que significa que el equilibrio de protonación adicional sólo pueda ocurrir a pH <2.

10 Tabla 1. Constantes de protonación generales (β_i^H) y en forma de etapas (K_i^H), en unidades logarítmicas, para Hcb-te1pa y compuestos relacionados, a 25.0 °C en KNO₃ 0.10 M.

Reacción de equilibrio ^a	L = cb-te1pa ^b	L = te1pa ^c	L = cb-ciclam ^d
\log/β_i^H			
L + H ⁺ ⇌ HL	>15	11.55	12.42
L + 2 H ⁺ ⇌ H ₂ L	25.13 (5)	21.66	22.61
L + 3 H ⁺ ⇌ H ₃ L	27.56 (5)	24.37	(20.23)
L + 4 H ⁺ ⇌ H ₄ L	<29.56	26.07	24.00
$\log K_i^H$			
L + H ⁺ ⇌ HL	>15	11.55	12.42
HL + H ⁺ ⇌ H ₂ L	10.13	10.11	10.20
H ₂ L + H ⁺ ⇌ H ₃ L	2.43	2.71	-
H ₃ L + H ⁺ ⇌ H ₄ L	<2.0	1.7	1.39

^a L denota el ligando en general; se omiten las cargas por razones de simplicidad. ^b Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar en las últimas cifras significativas. ^c De Lima, L. M. P. Et al. Inorg. Chem. 2012, 51, 6916-6927. ^d De ref. Sun, X. et al. J. Med. Chem. 2002, 45, 469-477, con I = 0.1 M en KCl.

15 IV.B.2. Estabilidad termodinámica de los complejos metálicos de Hcb-te1pa

Esta parte corresponde a los puntos b) y c) de las especificaciones mencionadas anteriormente.

20 Las constantes de estabilidad de los complejos formados por Hcb-te1pa con Cu²⁺ y Zn²⁺ se determinaron mediante titulaciones potenciométricas en solución acuosa a 25.0°C en fuerza iónica de KNO₃ 0.10 M (Tabla 2). Los resultados obtenidos para Hcb-te1pa se comparan con aquellos otros dos de tetraazacicloalcanos: te1pa y cb-ciclam.

25 El equilibrio de formación del cobre(II) y especialmente el zinc(II) es lento en el rango de pH ácido. En el caso de Cu²⁺, la formación de complejos es casi completa desde pH bajo, pero relativamente lenta hasta pH = 4. Para superar este doble problema, se realizaron titulaciones convencionales a valores de pH por debajo de 2 con el fin de observar un porcentaje significativo de ión de metal libre (por lo menos 18%) y de este modo permitir la determinación de la constante de estabilidad correspondiente, mientras que la solución tiene tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio antes del comienzo de la titulación. Durante las titulaciones, cada punto experimental incluía un tiempo de equilibrio complementario con el fin de producir mediciones completamente estabilizadas. En el caso de Zn²⁺, esencialmente no hay formación de complejos por debajo de pH = 4, y en el rango de pH = 4-6 la formación de complejos es extensa pero muy lenta, tomando hasta una semana para llegar al equilibrio final. Por esta razón, las titulaciones de tanda se prepararon en el intervalo de pH = 4-6 y se dejaron equilibrar hasta estabilización completa, mientras que las titulaciones convencionales se utilizaron para las regiones de pH restantes.

35 Tabla 2. Constantes de protonación generales (β_{MLHn}) y en forma de etapas (K_{MLHn}), en unidades logarítmicas, para complejos de Hcb-te1pa y ligandos relacionados, a 25.0°C en I = KNO₃ 0.10 M.

Reacción de equilibrio ^a	L = cb-te1pa ^b	L = te1pa ^c	L = cb-ciclam ^d
-------------------------------------	---------------------------	------------------------	----------------------------

log β_{MLHh}			
$Cu^{2+} + L \rightleftharpoons CuL$	26.00 (5)	25.5	27.1
$Cu^{2+} + H^+ + L \rightleftharpoons CuHL$	-	27.67	-
$Cu^{2+} + L \rightleftharpoons CuLOH + H^+$	-	14.35	-
$Zn^{2+} + L \rightleftharpoons ZnL$	18.83 (6)	18.86	-
$Zn^{2+} + H^+ + L \rightleftharpoons ZnHL$	-	21.38	-
$Zn^{2+} + L \rightleftharpoons ZnLOH + H^+$	7.50 (7)	7.84	-
log K_{MLHh}			
$Cu^{2+} + L \rightleftharpoons CuL$	26.00	25.5	27.1
$CuL + H^+ \rightleftharpoons CuHL$	-	2.17	-
$CuLOH + H^+ \rightleftharpoons CuL$	-	11.15	-
$Zn^{2+} + L \rightleftharpoons ZnL$	18.83	18.86	-
log K_{MLHh}			
$ZnL + H^+ \rightleftharpoons ZnHL$	-	-	2.52 -
$ZnLOH + H^+ \rightleftharpoons ZnL$	11.33	-	11.02 -

^a L denota el ligando en general; cargos se omiten por razones de simplicidad. ^b Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar en la última cifra significativa. ^c Desde Lima, LMP Et al. Inorg. Chem. 2012, 51, desde 6916 hasta 6927. ^d En ref. Sun, X. et al J. Med. Chem. 2002, 45, 469-477, por la competencia espectrofotométrica sin control de la fuerza iónica.

La especiación es notablemente simple con Cu^{2+} y Zn^{2+} ; el complejo completamente desprotonado es la única especie en el intervalo de pH intermedio, y un complejo de hidroxido de zinc (II) solo puede encontrarse a un pH muy básico. Para una comparación correcta de la estabilidad termodinámica de los complejos de Hcb-te1pa con los valores correspondientes de otros ligandos de la literatura, también se calcularon los valores de pM que tienen en cuenta las propiedades de basicidad variable de diferentes ligandos (Tabla 3). Tanto las constantes de estabilidad obtenidas como los valores de pM calculados demuestran una estabilidad termodinámica muy alta del complejo de cobre (II) de Hcb-te1pa. Es importante destacar que también muestran una muy alta selectividad de Hcb-te1pa para la formación de complejos de cobre (II) sobre el zinc (II). Aunque los otros dos ligandos tomados para comparación exhiben valores de pCu más grandes, el valor obtenido para el complejo de cobre (II) de Hcb-te1pa es todavía lo suficientemente alto para una coordinación muy fuerte de Cu^{2+} y para evitar la potencial transquelación. La estabilidad termodinámica no es el único criterio importante para determinar la eficacia de la complejación del metal porque, dependiendo de la aplicación, otros factores como la inercia cinética o la estabilidad in vivo pueden ser más importantes.

Ion de metal	Hcb-te1pa	Hte1pa	cb-cyclam
Cu^{2+}	15.67	18.64	19.29
Zn^{2+}	8.50	12.00	-

^a Valores calculados a pH = 7.4 para 100% de exceso de ligando con $[M^{2+}]_{tot} = 1 \times 10^{-5}$ M, basado en las constantes de estabilidad presentada.

20 IV.B.3. Formación y Disociación del complejo de Cobre(II)

Esta parte corresponde a los puntos a) y d) de las especificaciones mencionadas anteriormente.

La cinética de complejación rápida es esencial para una formación fácil del complejo de cobre (II). Por lo tanto, algunos de los complejos puenteados cruzados más inertes pueden ser inútiles para aplicaciones médicas dadas las condiciones bastante duras (típicamente muy alta temperatura y/o pH alto) requeridas para lograr una complejación metálica casi cuantitativa dentro de un tiempo razonable con respecto al tiempo de vida limitado de los radioisótopos.

La formación del complejo de cobre (II) con Hcb-te1pa se controló espectroscópicamente en diferentes soluciones tamponadas de pH ácido a neutro. En la relación equimolar de metal a ligando, la formación del complejo es instantánea a pH fisiológico (7.4) y es extremadamente rápida a pH = 5, llegando a completarse (> 99%) en unos pocos segundos en el primer caso y dentro de ca. 3 minutos en el último caso. La reacción se vuelve progresivamente más lenta debido al aumento de la acidez del medio de reacción, lo que permite un estudio cinético en condiciones de pseudo primer orden usando métodos espectroscópicos UV-vis convencionales. En este trabajo, dicho estudio cinético se realizó a pH = 3, que está en el límite inferior del intervalo de pH en el que la complejación de cobre (II) es aproximadamente completa en equilibrio en condiciones equimolares de metal a ligando. Los datos obtenidos para esta reacción en condiciones de pseudo primer orden usando un exceso de 10 equivalentes de catión metálico dieron como resultado un tiempo medio de formación ($t_{1/2}$) de 1.7 minutos y mostraron que la formación es cuantitativa (> 99%) en aprox. 10 minutos.

De acuerdo con estos resultados, Hcb-te1pa es, según el mejor conocimiento del solicitante, el ligando con puente cruzado dotado de la capacidad de complejación más rápida para el cobre (II) en condiciones muy suaves. Sin estar dispuestos a estar vinculados por una teoría, este rendimiento podría ser, al menos en parte, explicado por el análisis de la estructura cristalográfica del ligando libre (Figura 1). De hecho, la preorganización del ligando se ve favorecida por un enlace de hidrógeno entre la función ácida del picolinato y la amina secundaria del macrociclo. El átomo de nitrógeno del brazo de picolinato está situado justo fuera del bolsillo macrocíclico en una posición favorable para la coordinación con el cobre (II), que, por lo tanto, debería ser fácilmente quelado por las cinco funciones amina del ligando.

La disociación lenta de los complejos es probablemente la característica más importante que debe tenerse en cuenta cuando se seleccionan los compuestos que se utilizarán en aplicaciones médicas. La cinética de la disociación asistida por ácido del complejo de cobre (II) de Hcb-te1pa se estudió bajo condiciones de pseudo primer orden en soluciones acuosas ácidas. La disociación se controló siguiendo los cambios en la banda de absorción visible del complejo a 25 °C en HClO₄ 5 M, o a 20, 25, 37, 60 y 90 °C en HCl 5M. Los valores de vida media determinados se recolectan en la Tabla 5 junto con los valores de la literatura para los compuestos relacionados: te1pa, cb-te2a y cb-do2a.

Tabla 4. Inercia de disociación asistida por ácido para los complejos de cobre (II) de Hcb-te1pa y de ligandos de literatura seleccionados.

ligando	condiciones	Vida media ($t_{1/2}$), min
Hcb-te1pa	HCl 5 M, 90 °C	0.7 min
	HCl 5 M, 60 °C	10.4 min
	HCl 5 M, 37 °C	111 min
	HCl 5 M, 25 °C	465 min
	HCl 5 M, 20 °C	946 min
	HClO ₄ 5 M, 25 °C	> 96 días
Hte1pa	HCl 1 M, 25 °C	32 min
	HClO ₄ 5 M, 25 °C	144 min
H ₂ cb-te2a	HCl 5 M, 90 °C	9240 min
H ₂ cb-do2a	HCl 5 M, 30 °C	< 2 min

Una diferencia significativa entre los valores de vida media en medios HClO₄ y HCl, especialmente a 25 °C, se ha explicado generalmente por la importante función que a veces juegan los aniones en el mecanismo de disociación.

Pero más importantes son los valores de vida media muy buenos globales obtenidos para el complejo de cobre (II) de Hcb-te1pa. Los datos cinéticos experimentales se usaron para determinar la dependencia de la temperatura de las constantes de velocidad observadas desde el ajuste hasta la ecuación de Arrhenius. Aunque se encontró una disminución importante de la inercia cinética para temperaturas más altas, la vida media compleja es todavía de casi 2 horas a 37 °C y HCl 5 M

IV.B.4. Electroquímica del complejo de Cobre(II)

Esta parte corresponde al punto e) de las especificaciones mencionadas anteriormente.

5 Una de las explicaciones para la disociación de complejos de cobre (II) de ligandos macrocíclicos en medios biológicos es la reducción de metal a cobre (I) seguido de la desmetalización del complejo. Por lo tanto, es importante garantizar la inercia electroquímica y la reversibilidad del sistema redox. Para determinar el comportamiento redox del complejo de cobre de Hcb-te1pa, se realizaron experimentos de voltametría cíclica en solución acuosa a valores de pH de 2.3 y 6.8. Los experimentos se llevaron a cabo con un electrodo de trabajo de carbono vítreo en soluciones que contenían NaClO₄ 0.1 M como electrolito de soporte.

10 A pH neutro, se observó un sistema cuasi reversible en $E_{1/2} = -0.86 V_{SCE}$ ($\Delta E_p = 160 mV$) con un pico de oxidación despreciable de iones Cu⁺ libres a Cu²⁺ a 0 V_{SCE}. Este estudio indica que el complejo es estable en la escala de tiempo CV. Además, el proceso de reducción observado para el complejo de cobre (II) de Hcb-te1pa ($E_{pc} = -0.696 V$ frente a NHE, tras la conversión) está muy por debajo del umbral estimado de -0.400 V (NHE) para los biorreductantes típicos.

15 IV.C. Descripción de las propiedades y datos comparativos

Las especificaciones para un quelato optimizado destinado a ser utilizado en medicina nuclear se recuperan con los parámetros asociados:

	Especificaciones	Parámetros relacionados
a	cinéticas de metalación	Tiempo requerido para completar la formación de complejo (>99%)
b	estabilidad termodinámica	asociación constante de ligando metal: K_{MLHh} (log K_{MLHh}) y pM calculado
c	inercia con respecto a otros metales	asociación constante con otros metales (log K_{MLHh}' y pM') que se va a comparar con log K_{MLHh} y pM
d	inercia cinética	Vida media ($t_{1/2}$) (ensayo de disociación asistida con ácido)
e	estabilidad luego de reducción	Resultados de ensayo de voltametría cíclica

20 Los valores para el complejo de cobre (II) de cb-te1pa se resumen en la tabla a continuación. Los datos se comparan con los de los quelatos de cobre formados con ligandos de la técnica anterior.

25 Especialmente, las propiedades de los quelatos de cobre de cb-te1pa se comparan con las de te1pa. El quelato de cobre de te1pa da buenos resultados en relación con los requisitos a) -c) de las especificaciones. Sin embargo, la inercia en el medio ácido, (punto d) de las especificaciones, y la inercia con respecto a la reducción (punto e) no están optimizadas, contrariamente al quelato de cobre de cb-te1pa.

30 También se proporcionan datos relativos a dota y cb-do2a, así como para teta y cb-te2a. La introducción de un puente cruzado en dota y teta desacelera drásticamente la cinética de la metalización, que sorprendentemente no se observó cuando te1pa cruza el puente para proporcionar cb-te1pa.

35 La estabilidad termodinámica de dota y teta es mucho menor que la de te1pa y cb-te1pa. El puente cruzado de teta proporciona cb-te2a que mejora la estabilidad termodinámica.

Se mejora drásticamente la inercia cinética en HClO₄, 5 M a 25 ° C para quelato de cobre de cb-te1pa en comparación con otros quelatos.

40 Además, el quelato de cobre de cb-te1pa es el único quelato que muestra una estabilidad adecuada a la reducción entre los comparados en la tabla siguiente.

Por lo tanto, cb-te1pa proporciona quelatos que cumplen todos los requisitos de las especificaciones para un quelato optimizado destinado a ser utilizado en medicina nuclear, lo que nunca se logró con quelatos de ligandos de la técnica anterior.

45

	a) cinéticas de metalación Tiempo requerido para terminar complejación de Cu (>99%)	b) Estabilidad termodinámica		c) Inercia vs Zn		d) inercia cinética			e) estabilidad luego de reducción	
		log K _(CuL)	pCu	log K _(ZnL)	pZn	Vida media (t _{1/2})			Estabilidad Cu(II) -> Cu (I)	potencial de reducción (V)
te1pa	3 min	25.50	18,64	18.86	12.00	HClO ₄ , 5M, 25°C	HCl, 5M, 30°C	HCl, 5M, 90°C	cuasi-reversible	-1,05
cb-te1pa	3 min	26.00	15.67	18.83	8.50	96 días	∣	0.7 min	reversible	-0.696
dota	rápido	22.21	15,19	21.01***	15.01	aprox. 5 min	∣	< 1 min	irreversible	-0.74
cb-do2a	muy lento	∣	∣	∣	∣	∣	∣	< 2 min	irreversible	-0.72
teta	rápido	21.60	15.19	15.81**	10.08	aprox. 8 min	3.5 días	4.5 min	irreversible	-0.98
cb-te2a	muy lento	27.10*	∣	∣	∣	∣	∣	154 horas	cuasi-reversible	-0.88

*estimación por C. Anderson and Ferdani, Cancer Biother. Radiopharm., 2009, 24(4), 379-393

** Delgado and Da Silva, Talanta, 1982, 29, 815-822

*** Chaves et al., Talanta, 1992, 39(3), 249-254

V. Estudios biológicos

V.1. Estabilidad sérica in vitro de ⁶⁴Cu-Ib-2

5 La estabilidad sérica in vitro de ⁶⁴Cu-Ib-2 (véase la parte III.3 anterior) se puede llevar a cabo añadiendo 50 µl de ⁶⁴Cu-Ib-2 (1-2 mCi) a 500 µl de suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum). La solución se incubó a 37 °C y las muestras se analizaron por radio en TLC a las 0, 10, 30, 60 min y 2, 4, 10, 24, 48 y 72 h postadministración a FBS.

10 V.2. Pruebas in vivo de ⁶⁴Cu-Ib-1-trastuzumab

Modelos animales

15 Se pueden preparar modelos de tumor de xenoinjerto de líneas celulares NIH3T6.7 usando ratones sin pelo hembras BALB/c nu/nu de 6 semanas de edad. Se inocularon 5X10⁶ células NIH3T6.7 por vía subcutánea en el hombro izquierdo y el costado derecho de los ratones. Los tumores de tamaño apropiado usualmente crecieron dentro de los 15 días después de la implantación.

Biodistribución

20 Los ratones sin pelo BALB/c que portan tumores NIH3T6.7 (n = 4) se inyectan a través de la vena de la cola con ⁶⁴Cu-Ib-1-trastuzumab (aproximadamente 20 µCi en 200 µl de solución salina por ratón). Los animales se sacrifican 1 y 2 días después de la inyección. Los órganos y tejidos de interés (sangre, músculo, hueso, bazo, riñón, intestino, hígado y tumor) se extraen, se pesan y se cuentan utilizando un contador gamma. El porcentaje de la dosis inyectada por gramo (% ID/g) se puede calcular por comparación con un estándar ponderado y contado.

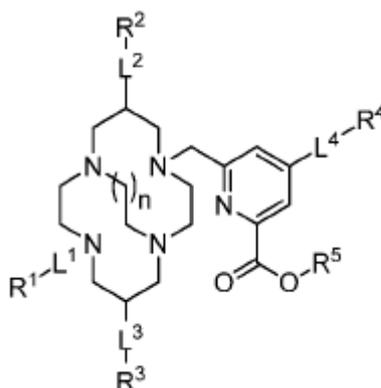
Formación de imágenes MicroPET en ratones sin pelo NIH3T6.7 que tienen tumor

30 Se pueden realizar escaneos de PET de animales pequeños y análisis de imágenes usando un escáner de modelo de roedor microPET R4. Los estudios de imagen se llevan a cabo en ratones sin pelos femeninos con tumores NIH3T6.7. Los ratones se inyectan a través de la vena de la cola con ⁶⁴Cu-TE2A-Bn-NCS-trastuzumab (200 µCi). A los 1, 2 y 3 días después de la inyección, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 1% al 2%, se colocaron en posición prona y se formaron imágenes. Las imágenes se pueden reconstruir mediante un algoritmo bidimensional de expectativa de subconjuntos ordenados (OSEM).

35

REIVINDICACIONES

1. Un quelato que resulta de la formación de complejos de un ligando de la fórmula (I)



5

en la que

n es un entero seleccionado de 1 y 2;

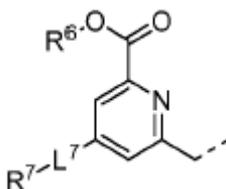
10

R¹ representa:

- un átomo de hidrógeno;

15

- un brazo de picolinato de la fórmula (II)



20

- una función de acoplamiento, en la que la función de acoplamiento se selecciona del grupo que comprende amina; isotiocianato; isocianato; éster activado tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxiglutarimida o éster de maleimida; ácido carboxílico; ácido carboxílico activado tal como, por ejemplo, anhídrido de ácido o haluro de ácido; alcohol; alquino; haluro; azida; siloxi; ácido fosfónico; tiol; tetrazina; norborneno; oxoamina; aminooxi; tioéter; haloacetamida tal como, por ejemplo, cloroacetamida, bromacetamida o yodoacetamida; glutamato; anhídrido glutárico, anhídrido succínico, anhídrido maleico; aldehído; cetona; hidrazida; cloroformato y maleimida;

25

- un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

30

R², R³, R⁴ y R⁷ cada uno representa independientemente:

- un átomo de hidrógeno;

35

- una función de acoplamiento, en la que la función de acoplamiento se selecciona del grupo que comprende amina; isotiocianato; isocianato; éster activado tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxiglutarimida o éster de maleimida; ácido carboxílico; ácido carboxílico activado tal como, por ejemplo, anhídrido de ácido o haluro de ácido; alcohol; alquino; haluro; azida; siloxi; ácido fosfónico; tiol; tetrazina; norborneno; oxoamina; aminooxi; tioéter; haloacetamida tal como, por ejemplo, cloroacetamida, bromacetamida o yodoacetamida; glutamato; anhídrido glutárico, anhídrido succínico, anhídrido maleico; aldehído; cetona; hidrazida; cloroformato y maleimida;

40

- un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

45

- 6-((13-(4-aminobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolinato de metilo;
- ácido 6-((13-(4-isotiocianatobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico;
- 5 - ácido 6-((13-(4-aminobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico;
- ácido 6-((13-(2-hidroxietyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico;
- 10 - ácido 6-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-ilmetil)picolínico;
- ácido 6-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.3]heptadecan-4-ilmetil)picolínico;
- ácido 6,6'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano-4,11-diilbis(metileno))dipicolínico;
- 15 - ácido 6,6'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.3]heptadecano-4,11-diilbis(metileno))dipicolínico.

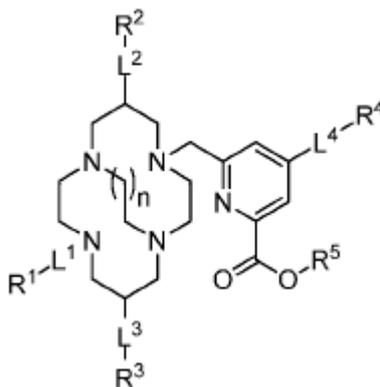
4. El quelato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el catión metálico es un radioisótopo, preferiblemente un radioisótopo seleccionado del grupo que comprende $^{64}\text{Cu}(\text{II})$, $^{67}\text{Cu}(\text{II})$, $^{68}\text{Ga}(\text{III})$, $^{89}\text{Zr}(\text{IV})$, $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{III})$, $^{111}\text{In}(\text{III})$, $^{186}\text{Re}(\text{VI})$, $^{188}\text{Re}(\text{VI})$, $^{210}\text{At}(\text{III})$, ^{212}Bi (^{212}Pb), $^{213}\text{Bi}(\text{III})$, $^{225}\text{Ac}(\text{III})$, $^{90}\text{Y}(\text{III})$, $^{177}\text{Lu}(\text{III})$, $^{153}\text{Sm}(\text{III})$, $^{149}\text{Tb}(\text{III})$ o $^{166}\text{Ho}(\text{III})$, más preferiblemente $^{64}\text{Cu}(\text{II})$, $^{67}\text{Cu}(\text{II})$ o $^{68}\text{Ga}(\text{III})$.

5. Una composición farmacéutica que comprende el quelato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en asociación con por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. Medicamento que comprende el quelato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

7. Un quelato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en medicina nuclear.

8. Un ligando de la fórmula (I)

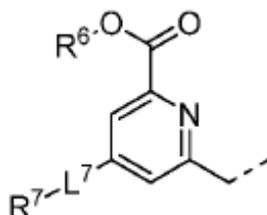


en la que

35 n es un entero seleccionado de 1 y 2;

R¹ representa:

- 40 - un átomo de hidrógeno;
- un brazo de picolinato de la fórmula (II)



5 - una función de acoplamiento, en la que la función de acoplamiento se selecciona del grupo que comprende amina; isotiocianato; isocianato; éster activado tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxiglutarimida o éster de maleimida; ácido carboxílico; ácido carboxílico activado tal como, por ejemplo, anhídrido de ácido o haluro de ácido; alcohol; alquino; haluro; azida; siloxi; ácido fosfónico; tiol; tetrazina; norborneno; oxoamina; aminooxi; tioéter; haloacetamida tal como, por ejemplo, cloroacetamida, bromacetamida o yodoacetamida; glutamato; anhídrido glutárico, anhídrido succínico, anhídrido maleico; aldehído; cetona; hidrazida; cloroformato y maleimida;

10 - un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

R², R³, R⁴ y R⁷ cada uno representa independientemente:

15 - un átomo de hidrógeno;

20 - una función de acoplamiento, en la que la función de acoplamiento se selecciona del grupo que comprende amina; isotiocianato; isocianato; éster activado tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxiglutarimida o éster de maleimida; ácido carboxílico; ácido carboxílico activado tal como, por ejemplo, anhídrido de ácido o haluro de ácido; alcohol; alquino; haluro; azida; siloxi; ácido fosfónico; tiol; tetrazina; norborneno; oxoamina; aminooxi; tioéter; haloacetamida tal como, por ejemplo, cloroacetamida, bromacetamida o yodoacetamida; glutamato; anhídrido glutárico, anhídrido succínico, anhídrido maleico; aldehído; cetona; hidrazida; cloroformato y maleimida;

25 - un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

R⁵ y R⁶ cada uno representa independientemente:

30 - un átomo de hidrógeno;

35 - una función de activación, en la que la función de activación se selecciona del grupo que comprende N-hidroxisuccinimida, N-hidroxiglutarimida y maleimida; haluro; -OCOR⁸ en el que R⁸ se selecciona de alquilo, arilo;

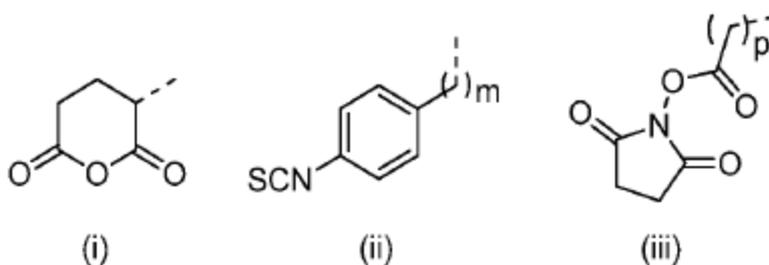
- un grupo de vectorización, en el que el grupo de vectorización se selecciona del grupo que comprende anticuerpo, preferiblemente anticuerpo monoclonal; hapteno; péptido; proteína; azúcar; nanopartícula; liposoma; lípido; poliamina tal como espermina;

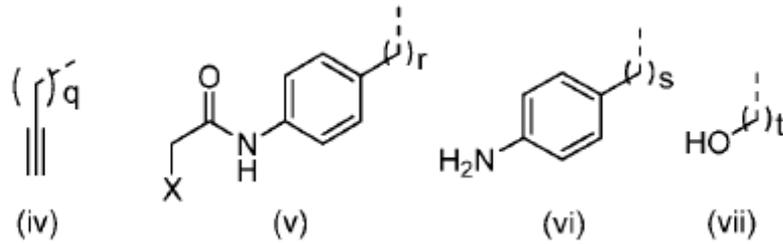
40 L¹, L², L³, L⁴ y L⁷ cada uno representa independientemente:

- un enlace;

45 - un ligador seleccionado del grupo que comprende alquilo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, alquilheteroarilo, alquenilo, alquinilo, en el que las fracciones de alquilo se interrumpen opcionalmente por uno o más heteroátomos seleccionados de O, N y S.

50 9. El ligando de acuerdo con la reivindicación 8, en el que por lo menos uno de -L¹-R¹, -L²-R², -L³-R³ y -L⁴-R⁴ se selecciona de las fórmulas (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) y (vii):

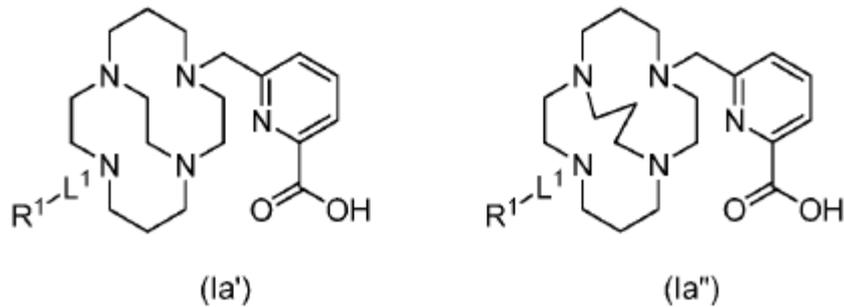




en la que m, p, q, r, s y t representan cada uno independientemente un entero que varía desde 0 hasta 10, preferiblemente 0, 1, 2, 3 o 4 y X representa un halógeno, preferiblemente Cl.

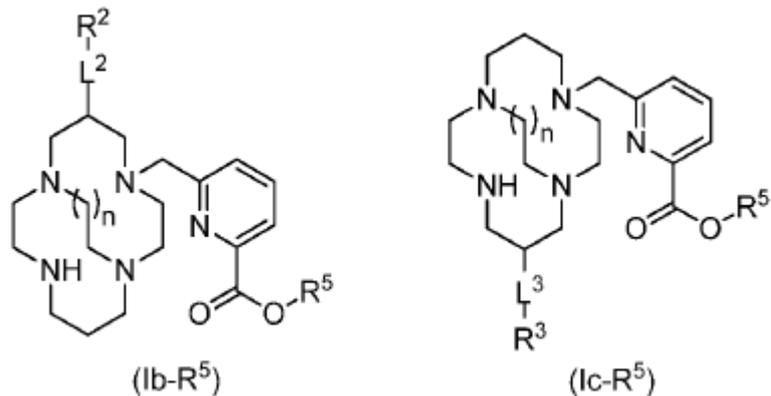
5

10. El ligando de acuerdo con la reivindicación 8 o reivindicación 9, de la fórmula (Ia') o (Ia'')

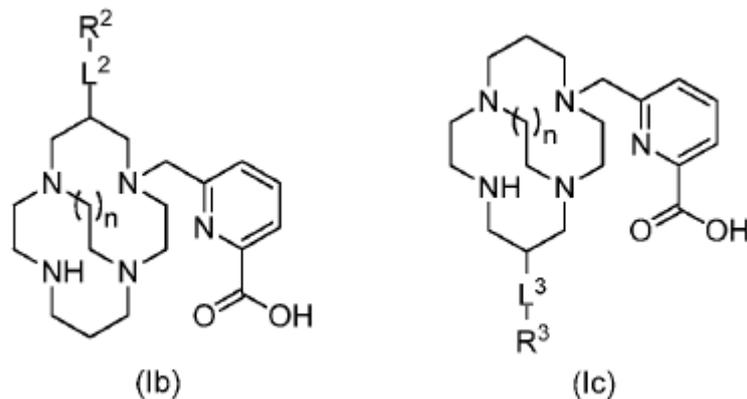


10 en la que R¹ y L¹ son como se define en las reivindicaciones 8 y 9.

11. El ligando de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, de la fórmula (Ib-R⁵), (Ic-R⁵), (Ib) o (Ic)



15



en la que R², R³, L² y L³ son como se define en la reivindicación 8, y n es un entero seleccionado de 1 o 2, preferiblemente n es igual a 1.

20

12. El ligando de acuerdo con la reivindicación 8, seleccionado de:

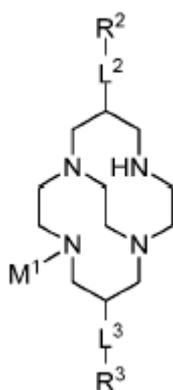
- ácido 6-((11-(4-isotiocianatofenil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico;
- 5 - ácido 6-((11-(4-isotiocianatofenil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.3]heptadecan-4-il)metil)picolínico;
- 6-((6-(4-aminobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolinato de metilo;
- ácido 6-((6-(4-isotiocianatobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico;
- 10 - ácido 6-((6-(4-aminobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico;
- ácido 6-((6-(2-hidroxietil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico;
- 15 - 6-((13-(4-aminobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolinato de metilo;
- ácido 6-((13-(4-isotiocianatobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico;
- ácido 6-((13-(4-aminobencil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico;
- 20 - ácido 6-((13-(2-hidroxietil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico;
- ácido 6-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)metil)picolínico
- 25 - ácido 6-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.3]heptadecan-4-il)metil)picolínico;
- ácido 6,6'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano-4,11-diilbis(metileno))dipicolínico;
- ácido 6,6'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.3]heptadecano-4,11-diilbis(metileno))dipicolínico.

30 13. Uso del ligando de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para la síntesis de un quelato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

35 14. Uso del ligando de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para la descontaminación de medio líquido mediante atrapamiento de cationes metálicos.

15. Proceso para fabricar un ligando de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que comprende:

- 40 - hacer reaccionar el compuesto de la fórmula (i)



en la que

45 L^2 , R^2 , L^3 y R^3 son como se define en la fórmula (i) como se define en la reivindicación 8,

M^1 representa

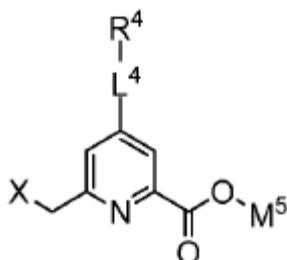
un átomo de hidrógeno;

50 un grupo de protección amino tal como, por ejemplo, un grupo carbobenciloxi, uno p-metoxibencil carbonilo, uno tertbutoxi carbonilo, uno 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, uno benzoilo, uno bencilo, carbamato, uno p-metoxibencilo, uno

3,4-dimetoxibencilo, uno p-metoxifenilo, uno tosilo, uno arilsulfonilo, o cualquier otro grupo de protección de amino adecuado conocido por aquellos expertos en la técnica;

-L¹-R¹, en el que L¹ y R¹ son como se define en la fórmula (I) como se define en la reivindicación 8;

5 con el compuesto de la fórmula (ii)



10 en la que

L⁴ y R⁴ son como se define en la fórmula (I) como se define en la reivindicación 8;

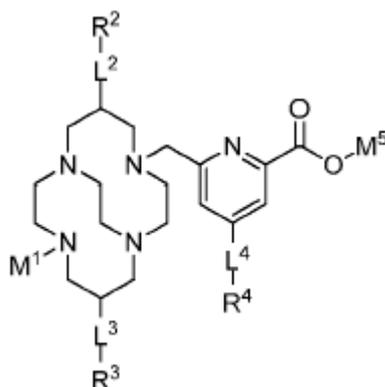
X representa un átomo de halógeno, preferiblemente Cl; y

15 M⁵ representa

un grupo de protección seleccionado de grupo alquilo, preferiblemente metilo o etilo, más preferiblemente metilo;

20 R⁵, en el que R⁵ son como se define en la fórmula (I) como se define en la reivindicación 8 dado que no representa un átomo de hidrógeno;

para producir el compuesto de la fórmula (iii)



25 en la que L², R², L³, R³, L⁴ y R⁴ son como se define en la fórmula (I) como se define en la reivindicación 8 y M¹ y M⁵ son como se definió anteriormente;

30 - y en la que se hace necesario realizar (iii) una o más etapas posteriores seleccionadas de:

◦ desproteger la función ácida protegida por M⁵, para producir el compuesto de la fórmula (I) como se define en la reivindicación 8 en la que R⁵ representa un átomo de hidrógeno;

35 ◦ introducir una función de activación o un grupo de vectorización sobre la función ácida para producir el compuesto de la fórmula (I) como se define en la reivindicación 8, en la que R⁵ representa una función de activación o un grupo de vectorización;

40 ◦ desproteger la función amina protegida por M¹, para producir el compuesto de la fórmula (I) como se define en la reivindicación 8 en la que -L¹-R¹ representa -H;

◦ introducir -L¹-R¹ sobre la función amina, en la que -L¹-R¹ es como se define en la fórmula (I) como se define en la reivindicación 8;

para producir el compuesto de la fórmula (I).

- 5 16. Proceso para fabricar un quelato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende hacer reaccionar un ligando de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 con un catión metálico seleccionado del grupo que comprende cobre (II), cobre (I), galio (III), zirconio (IV), tecnecio (III), indio (III), renio (VI), astato (III), bismuto (III), plomo (II), actinio (III), itrio (III), lutecio (III), samario (III), terbio (III) o holmio (III).

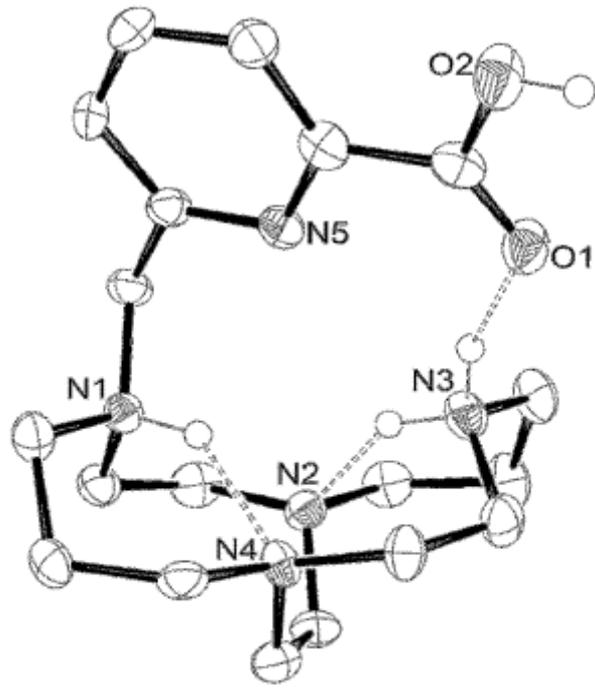


FIG. 1

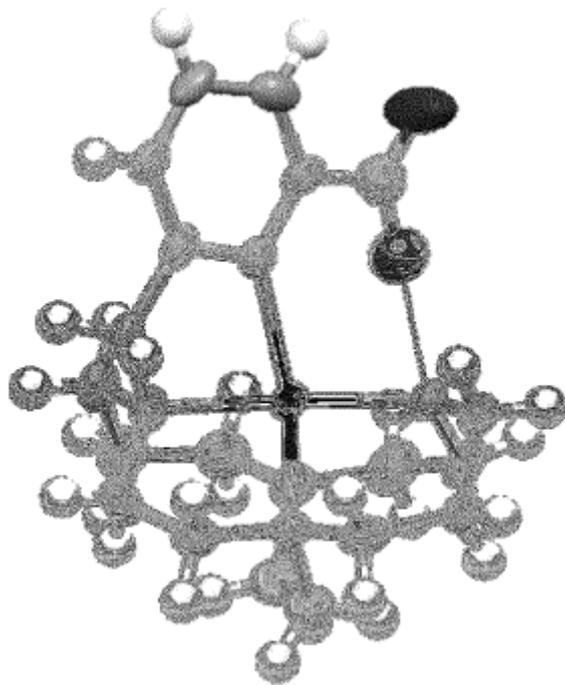


FIG. 2