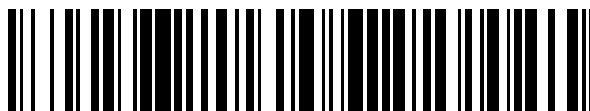


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 875**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/10** (2006.01)

**A61K 51/04** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2011 PCT/EP2011/052158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11098611**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2011 E 11702857 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2533817**

54 Título: **Complejos que emiten alfa-partículas dirigidas a diana que comprenden radionúclido de torio e hidroxipiridinona que contiene ligando**

30 Prioridad:

**12.02.2010 GB 201002508**

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

**04.07.2018**

73 Titular/es:

**BAYER AS (100.0%)  
Drammensveien 288  
0283 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**RAMDAHL, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

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

**ES 2 674 875 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

Complejos que emiten alfa-partículas dirigidas a diana que comprenden radionúclido de torio e hidroxipiridinona que contiene ligando

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a complejos de isótopos de torio y en particular a complejos de torio-227 con ciertos ligandos octadentados. La invención también se refiere al tratamiento de enfermedades, particularmente enfermedades neoplásicas, que implica la administración de dichos complejos.

**Antecedentes de la invención**

- 10 La muerte celular específica puede ser esencial para el tratamiento exitoso de una diversidad de enfermedades en sujetos mamíferos. Los ejemplos típicos de estos están en el tratamiento de enfermedades malignas tales como sarcomas y carcinomas. Sin embargo, la eliminación selectiva de ciertos tipos de células también puede jugar un papel clave en el tratamiento de otras enfermedades, especialmente enfermedades hiperplásicas y neoplásicas.

- 15 Los procedimientos más comunes de tratamiento selectivo actualmente son cirugía, quimioterapia e irradiación con haz externo. La terapia con radionúclidos dirigidos a la diana, es sin embargo, un área prometedora y en desarrollo con el potencial de administrar radiación altamente citotóxica a tipos indeseados de células. Las formas más comunes de productos radio farmacéuticos actualmente autorizados para su uso en humanos emplean radionúclidos beta-emisores y/o gamma-emisores. Sin embargo, ha habido algún interés en el uso de radionúclidos alfa-emisores en terapia debido a su potencial para muerte celular más específica.

- 20 El intervalo de radicación de los alfa-emisores típicos en los alrededores fisiológicos es en general menor de 100 micrómetros, el equivalente de solo unos pocos diámetros celulares. Esto hace a estas fuentes muy adecuadas para el tratamiento de tumores, incluyendo micro metástasis, debido a que si son bien dirigidas a la diana, entonces poca de la energía irradiada pasara más allá de las células diana. De esta manera, puede reducirse al mínimo el daño al tejido saludable circundante (véase Feinendegen y col., Radiat Res 148:195-201 (1997)). En contraste, una beta-partícula tiene un intervalo de 1 mm o más en agua (ver Wilbur, Antibody Immunocon Radiopharm 4: 85-96 (1991)).

- 25 La energía de radiación de alfa-partículas es alta en comparación con aquella transportada por las beta-partículas, rayos gamma y rayos X, típicamente que es 5-8 MeV, o 5 a 10 veces aquella de una beta-partícula y 20 o más veces la energía de un rayo gamma. De esta manera, este depósito de una gran cantidad de energía sobre una distancia muy corta da  $\alpha$ -radiación, una transferencia de energía lineal (LET, por sus siglas en inglés) excepcionalmente alta, eficiencia biológica relativa (RBE, por sus siglas en inglés) alta y relación de mejora de oxígeno (OER, por sus siglas en inglés) baja en comparación a radiación gamma y beta (véase Hall, "Radiobiology for the radiologist", Quinta edición, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, EUA, 2000). Esto explica la citotoxicidad excepcional de los radionúclidos alfa-emisores y también impone demandas severas en la selección de dianas biológicas de estos isótopos y en el nivel de control y estudio de la distribución de los radionúclidos alfa-emisores que es necesaria a fin de evitar efectos secundarios inaceptables.

- 35 La Tabla 1 a continuación muestra las propiedades de descomposición física de los alfa-emisores hasta ahora ampliamente propuestos en la literatura como que tienen posiblemente efectividad terapéutica.

Tabla 1

Núclido Candidato	$T_{1/2}^*$	Clínicamente probado para
<sup>225</sup> Ac	10,0 días	Leucemia
<sup>211</sup> At	7,2 horas	Glioblastoma
<sup>213</sup> Bi	46 minutos	Leucemia
<sup>223</sup> Ra	11,4 días	Metástasis esquelética
<sup>224</sup> Ra	3,66 días	Espondilitis anquilosante
* Vida media		

- 40 Hasta ahora, con respecto a la aplicación en radioinmnuoterapia, se ha enfocado la atención principal en <sup>211</sup>At, <sup>213</sup>Bi y <sup>225</sup>Ac y estos tres núclidos se han explorado en ensayos de inmunoterapia clínica.

Varios de los radionúclidos que se ha propuesto son de vida corta, es decir, tienen vidas medias de menos de 12 horas. Estas vidas medias cortas hacen difícil producir y distribuir productos radio farmacéuticos a base de estos radionúclidos de una manera comercial. La administración de un núclido de vida corta también aumenta la proporción de la dosis de radiación que se emitirá en el cuerpo antes de que se alcance el sitio diana.

La energía de retroceso de la alfa-emisión provocará en muchos casos la liberación de núclidos hijo de la posición de descomposición del precursor. Esta energía de retroceso es suficiente para romper muchos núcleos hijo del ambiente químico que puede haber sostenido al precursor, por ejemplo, donde el precursor se volvió complejo por un ligando tal como un agente quelante. Esto se presentará aun donde el hijo es químicamente compatible con, es decir, se volvió complejo por, el mismo ligando. Igualmente, donde el núclido hijo es un gas, particularmente un gas noble tal como radón, o es químicamente incompatible con el ligando, este efecto de liberación aun será mayor. Cuando los núclidos hijo tienen vidas medias de más de unos pocos segundos, pueden difundirse radiactivos libres entonces pueden provocar toxicidad sistémica indeseada.

El uso de Torio-227 ( $T_{1/2} = 18,7$  días) bajo condiciones donde se propuso el control del isótopo hijo  $^{223}\text{Ra}$  unos pocos años atrás (ver WO 01/60417 y WO 02/05859). Esto fue en situaciones donde se usa un sistema vehículo que permite que los núclidos hijo se retengan por un ambiente cerrado. En un caso, el radionúclido se deposita dentro de un liposoma y el tamaño sustancial de liposoma (en comparación a la distancia de retroceso) ayuda a retener a los núclidos hijo dentro del liposoma. En el segundo caso, se usan complejos del radionúclido, que buscan el hueso, que se incorporan en la matriz ósea y por lo tanto restringen la liberación de los núclidos hijo. Estos son procedimientos potencialmente muy ventajosos, pero la administración de liposomas no es deseable en algunas circunstancias y hay mineralizadas para retener los isótopos hijo.

Más recientemente, se estableció que la toxicidad de los núcleos hijo de  $^{223}\text{Ra}$  liberados en la descomposición de  $^{227}\text{Th}$  podría tolerarse en el cuerpo del mamífero a un mucho mayor grado que lo que se predijo de pruebas anteriores en núcleos comparables. En la ausencia de los medios específicos para retener los hijos de radio de torio-227 analizados anteriormente, la información públicamente disponible con respecto a la toxicidad de radio, hace claro que no fue posible usar torio-227 como un agente terapéutico puesto que las dosis requeridas para lograr un efecto terapéutico de la descomposición de torio-227 darían como resultado una dosis altamente tóxica y posiblemente letal de radiación de la descomposición de los hijos de radio, es decir, no hay una ventana terapéutica.

El documento WO 04/091668 describe el hallazgo inesperado que existe una ventana de tratamiento terapéutico en la cual puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un radionúclido de torio-227 dirigido a un sujeto (típicamente un mamífero) sin generar una cantidad de radio-223 suficiente para provocar mielotoxicidad inaceptable. Por lo tanto, esto puede usarse para tratamiento y profilaxis de todos los tipos de enfermedades tanto en tejidos óseos como en sitios de tejido blando.

El documento WO 2006/003123 desvela el uso de Th-226 o radionúclidos madre del mismo, es decir U-230 o Ac-226, en medicina para el tratamiento de seres humanos y/o mamíferos no humanos, en particular para fines terapéuticos, diagnósticos (detección/formación de imágenes), profilácticos y de paliación de dolor. Dependiendo de las aplicaciones, estos radionúclidos pueden usarse en diversas formas para los fines de tratamiento y/o diagnóstico, en particular en forma catiónica o en forma de radioconjugados o complejos dirigidos al hueso. También se desvelan los procedimientos de producción de estos radionúclidos.

En vista de los desarrollos anteriores, ahora es posible emplear núcleos alfa-emisores de torio-227 en terapia de endoradionúclidos sin mielotoxicidad letal que resulte del  $^{223}\text{Ra}$  generado. Sin embargo, la ventana terapéutica permanece relativamente estrecha y en todos los casos es deseable no administrar más radioisótopo alfa-emisor a un sujeto de lo que es absolutamente necesario. El aprovechamiento útil de esta nueva ventana terapéutica por lo tanto se mejoraría en su mayor parte si los núcleos alfa-emisores de torio-227 se pueden volver complejos y se dirijan a la diana con un alto grado de confiabilidad.

Debido a que los radionúclidos están constantemente descomponiéndose, el tiempo transcurrido en el manejo del material entre el aislamiento y la administración al sujeto es de gran importancia. También sería de considerable valor si los núcleos alfa-emisores de torio se pueda volver complejos, dirigir a la diana y/o administrar en una forma que fuera rápida y conveniente de preparar, requiriendo de manera preferente pocos pasos, cortos periodos de incubación y/o temperaturas que no afecten de manera irreversible las propiedades de la entidad que se dirija la diana.

Los presentes inventores ahora han establecido inesperadamente que el uso de un ion de torio-227 4+ complejo con un ligando octadentado tipo hidroxipiridinona (HOPO) enlazado a un resto dirigido a diana, proporciona un grado notable de control con respecto al ion de torio-227. Adicionalmente, estos complejos pueden ser relativamente rápidos y/o fáciles de preparar usando los procedimientos descritos en el presente documento.

### **Sumario de la invención**

Vista desde un aspecto, la presente invención proporciona por lo tanto un complejo dirigido a una diana de tejido, que comprende una porción dirigida a una diana de tejido, un ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona y el ion de un radionúclido alfa-emisor de torio, como se define en las reivindicaciones. Un aspecto particularmente preferible es dicho complejo dirigido a una diana de tejido que comprende un resto de polipéptido dirigido a diana de tejido, covalentemente unido a un ligando octadentado que comprende al menos un resto 3,2-hidroxipiridinona, dicho ligando complejo al ion 4+ del radionúclido  $^{227}\text{Th}$  alfa-emisor de torio.

Vista desde un aspecto adicional la presente invención proporciona el uso de un complejo dirigido a una diana de tejido que comprende una porción dirigida a una diana de tejido un ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona y el ion de un radionúclido alfa-emisor de torio (incluyendo cualquier complejo descrito en el presente documento) en la elaboración de un tratamiento para el tratamiento de enfermedad hiperplásica o neoplásica que incluye cualquier enfermedad tal descrita en el presente documento.

En un aspecto correspondiente, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un humano o animal no humano (particularmente uno en necesidad del mismo) que comprende la administración de al menos un complejo dirigido a una diana de tejido que comprende un resto dirigido a una diana de tejido, un ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona y el ion de un radionúclido alfa-emisor de torio (incluyendo cualquier complejo descrito en el presente documento). Este procedimiento es preferentemente para el tratamiento de enfermedad hiperplásica o neoplásica incluyendo cualquier enfermedad descrita en el presente documento.

Vista desde un aspecto adicional la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un complejo dirigido a una diana de tejido que comprende un resto dirigido a una diana de tejido, un ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona y el ion de un radionúclido alfa-emisor de torio junto con al menos un excipiente o vehículo farmacéutico, como se define en las reivindicaciones. Para distinguir de los complejos de torio del isótopo de torio que se presenta de forma natural más abundante, es decir, torio-232 (vida media  $10^{10}$  años y eficazmente no radioactivo), se debe entender que los complejos de torio y las composiciones de los mismos, reivindicadas en el presente documento, incluyen el radioisótopo alfa-emisor de torio (es decir al menos un isótopo de torio con una vida media de menos de  $10^3$  años, por ejemplo torio-227) a mayor abundancia relativa que la natural, por ejemplo, al menos un 20 % mayor. Esta necesidad no afecta la definición del procedimiento de la invención donde se requiere explícitamente una cantidad terapéuticamente eficaz de torio-227, pero será preferentemente el caso en todos los aspectos.

Vista desde un aspecto aun adicional la invención también proporciona un kit para su uso en un procedimiento de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho kit un resto dirigido a una diana de tejido, conjugado a un ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona, como se define en las reivindicaciones. Dicho kit incluirá el radionúclido alfa-emisor de torio  $^{227}\text{Th}$ .

#### **Descripción detallada de la invención**

En el contexto de la presente invención, "dirigido a diana de tejido" se usa en el presente documento para indicar que la sustancia en cuestión (particularmente cuando está en forma de un conjugado a un complejo de torio), sirve para localizar por sí misma (y en particular para localizar cualquier complejo conjugado de torio) preferencialmente en al menos un sitio de tejido en el cual es deseada su presencia (por ejemplo para administrar una descomposición radioactiva). La porción dirigida a la diana puede unirse, por ejemplo, a los marcadores de superficie celular (por ejemplo, receptores, proteínas de transporte, moléculas de adhesión celular, etc.) presentes en las células afectadas por la enfermedad o en células en la vecindad de células afectadas por la enfermedad. Estos marcadores de superficie celular incluyen proteínas más fuertemente expresadas en superficies de células enfermas que en superficies de células saludables o aquellas más fuertemente expresadas en superficies celulares durante periodos de crecimiento o replicación que durante las fases inactivas. Los componentes presentes en la vecindad de células o tejidos diana o asociados a los mismos también se pueden utilizar en la diana para terapia de acuerdo con cualquier aspecto de la invención. Por ejemplo, los componentes presentes en o liberados en la matriz alrededor de las células o tejidos diana pueden usarse para la selección como diana si la presencia, forma o concentración permite que la región se distinga de tejidos saludables. Los ejemplos de estos son antígenos de matriz tal como tenascina, que se asocia con tumores cerebrales pero se expresa en la matriz entre células. Estos antígenos de matriz se pueden dirigir a la diana por una porción individual o compuesta dirigida a la diana, como se analiza en el presente documento.

El resto dirigido a una diana de tejido también puede comprender dos o más componentes que tienen colectivamente el efecto de dirigir el complejo de torio hacia el tejido o tejidos diana deseados. Por ejemplo, esto puede ser donde se administra un componente primero y se une a un tejido, tumor o tipo celular particular (un agente de unión a tejido) y un segundo y/o adicional componente (agente de enlace) se administra de manera simultánea, o de manera preferentemente posterior, que se une *in vivo* al agente que se une a tejido. El agente de enlace se conjugara directamente o de forma indirecta al torio alfa-emisor vuelto complejo, y de esta manera, de forma colectiva los agentes de enlace y de unión a tejido formaran una porción dirigida a una diana de tejido. Los pares específicos adecuados de unión para proporcionar el agente de unión a tejido y el agente de enlace con afinidad mutua son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, biotina con avidina o estreptavidina).

Los diversos aspectos de la invención como se describe en el presente documento se refieren al tratamiento de enfermedades, particularmente para la selección de dianas selectivas de tejido enfermo, así como se refiere a complejos, conjugados, medicamentos, formulaciones, kits, etc., útiles en dichos procedimientos. En todos los aspectos, el tejido enfermo puede residir en un sitio único en el cuerpo (por ejemplo en el caso de un tumor solido localizado) o puede residir en una pluralidad de sitios (por ejemplo donde se afecten varias articulaciones en artritis o en el caso de una enfermedad cancerosa distribuida o con metástasis).

El tejido enfermo que se va a seleccionar como diana puede estar en un sitio de tejido blando, en un sitio de tejido calcificado o en una pluralidad de sitios que pueden estar todos en tejido blando, todos en tejido calcificado o pueden incluir al menos un sitio de tejido blando y/o al menos un sitio de tejido calcificado. En una realización, se selecciona como diana al menos un sitio de tejido blando. Los sitios de selección como diana y los sitios de origen de la enfermedad pueden ser los mismos, pero de manera alternativa pueden ser diferentes. Donde este comprendido más de un sitio este puede incluir el sitio de origen o puede ser una pluralidad de sitios secundarios.

La expresión "tejido blando" se usa en el presente documento para indicar tejidos que no tienen una matriz mineralizada "dura". En particular, los tejidos blandos como se usa en la presente pueden ser cualquier tejido que no sean tejidos esqueléticos. De forma correspondiente "enfermedad de tejido blando" como se usa en el presente documento indica una enfermedad que se presenta en un "tejido blando" como se usa en el presente documento. La invención es particularmente adecuada para el tratamiento de cánceres y "enfermedad de tejido blando" abarca de esta manera carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas y cánceres de tipos mezclados que se presentan en cualquier tejido "blando" (es decir, no mineralizado), así como otras enfermedades no cancerosas de este tejido. La "enfermedad de tejido blando" cancerosa incluye tumores sólidos que se presentan en tejidos blandos así como tumores metastásicos y micro-metastásicos. En realidad, la enfermedad de tejido blando puede comprender un tumor sólido primario de tejido blando y al menos un tumor metastásico de tejido blando en el 20 mismo paciente. De manera alternativa, la "enfermedad de tejido blando" puede consistir solo de un tumor sólido o solo de metástasis con el tumor primario que es una enfermedad esquelética.

Es un hallazgo clave reciente que ciertos isótopos alfa-radioactivos de torio (por ejemplo <sup>227</sup>Th) se puedan administrar en una cantidad que sea tanto terapéuticamente eficaz como no genere mielotoxicidad intolerable. Como se usa en el presente documento, el término "no mielotóxico de forma aceptable" se usa para indicar que, de manera más importante, la cantidad de radio-223 generada por descomposición del radioisótopo de torio-227 administrado en general no es suficiente para que sea directamente letal al sujeto. Será claro a un experto en la técnica, que sin embargo, la cantidad de daño a la médula (y la probabilidad de una reacción letal) que será un efecto secundario aceptable del tratamiento, variara de forma significativa con el tipo de enfermedad que se trate, los dianas del régimen de tratamiento, y la prognosis para el sujeto. Aunque los sujetos preferidos para la presente invención son humanos, otros mamíferos, particularmente perros, se beneficiaran del uso de la invención y el nivel de daño aceptable a médula maligna. Una medida bien conocida del nivel de mielotoxicidad es la cuenta de células de neutrófilos, y en la presente invención, una cantidad aceptablemente no mielotóxica de <sup>223</sup>Ra será típicamente una cantidad controlada tal que la fracción de neutrófilos en su punto más bajo (nadir) es no menos de 10 % de la cuenta antes del tratamiento. De manera preferente, la cantidad aceptablemente no mielotóxica de <sup>223</sup>Ra será una cantidad tal que la fracción de células de neutrófilos esta la menos 20 % en nadir y de manera más preferente al menos 30 %. La fracción de células de neutrófilos en nadir de al menos 40 % es lo más preferido.

Además, se pueden usar compuestos que contienen torio radioactivo (por ejemplo <sup>227</sup>Th) en regímenes de alta dosis donde la mielotoxicidad del radio generado (por ejemplo <sup>223</sup>Ra) normalmente sería intolerable cuando se incluya soporte de células madre o un procedimiento comparable de recuperación. En estos casos, el recuento de neutrófilos se puede reducir por debajo del 10 % en nadir y excepcionalmente se reducirá a 5 %, si es necesario por abajo de 5 %, con la condición de que se tomen precauciones adecuadas y se de soporte posterior de células madre. Son bien conocidas estas técnicas. Un isótopo de torio de interés particular en la presente invención es torio-227, y torio-227 es el isótopo preferido para todas las referencias a torio en el presente documento donde lo permite el contexto. Torio-227 relativamente fácil de producir y se puede preparar indirectamente de Ra irradiado con neutrones, que contendrá los núclidos madre de <sup>227</sup>Th, es decir, <sup>227</sup>Ac ( $T_{1/2} = 22$  años). Actinio-227 puede ser bastante fácil de separar de la diana <sup>226</sup>Ra y usar como un generador para <sup>227</sup>Th. Este proceso se puede llevar a escala industrial si es necesario, y por lo tanto se puede evitar el problema de suministro visto con la mayoría de los otros alfa-emisores considerados candidatos para radioterapia dirigida a diana molecular.

El torio-227 se descompone a través del radio-223. En este caso, el hijo primario tiene una vida media de 11,4 días. A partir de una fuente pura de <sup>227</sup>Th, solo se producen cantidades moderadas de radio durante los pocos primeros días. Sin embargo, la toxicidad potencial de <sup>223</sup>Ra es mayor que aquella de <sup>227</sup>Th puesto que la emisión de <sup>223</sup>Ra de un alfa-partícula se sigue en el espacio de minutos por tres alfa-partículas adicionales de los hijos de vida corta (véase la Tabla 2 a continuación que expone la sede de descomposición para torio-227).

Tabla 2

Núclido	Modo de Descomposición	Energía Media de Partícula (Mev)	Vida Media
<sup>227</sup> Th	α	6,02	18,72 días
<sup>223</sup> Ra	α	5,78	11,43 días
<sup>219</sup> Rn	α	6,88	3,96 segundos
<sup>215</sup> Po	α	7,53	1,78 ms
<sup>211</sup> Pb	β	0,45	36,1 minutos
<sup>211</sup> Bi	α	6,67	2,17 minutos
<sup>207</sup> Tl	β	1,42	4,77 minutos
<sup>207</sup> Pb			Estable

Parcialmente debido a que genera productos de descomposición potencialmente peligrosos, no se ha considerado ampliamente el torio-227 ( $T_{1/2} = 18,7$  días) para terapia de alfa-partículas.

Se puede administrar torio-227 en cantidades suficientes para proporcionar efectos terapéuticos deseables sin generar demasiado radio-223 para provocar supresión intolerable de medula ósea. Es deseable mantener los isótopos hijo en la región seleccionada como diana de modo que se puedan derivar efectos terapéuticos adicionales de su descomposición. Sin embargo, no es necesario mantener el control de los productos de descomposición de torio a fin de tener un efecto terapéutico útil sin inducir mielotoxicidad aceptable.

Asumiendo que el efecto de muerte de células tumorales será principalmente de torio-227 y no de sus hijos, la dosis probablemente terapéutica de este isótopo se puede establecer por comparación con otros alfa-emisores. Por ejemplo, para astatina-211, las dosis terapéuticas en animales han sido típicamente 2-10 MBq por kg. A1 corregir la vida media y energía, la dosis correspondiente para torio-227 será al menos 36-200 kBq por kg de peso corporal. Esto establecería un límite inferior en la cantidad de  $^{227}\text{Th}$  que se puede administrar de manera útil con la esperanza de un efecto terapéutico. Este cálculo asume retención comparable de astatina y torio. Sin embargo, claramente la vida media de 18,7 días del torio probablemente dará más por resultado mayor eliminación de este isótopo antes de su descomposición. Estas dosis calculadas por lo tanto se deben considerar normalmente como que es la cantidad mínima eficaz. La dosis terapéutica expresada en términos de  $^{227}\text{Th}$  completamente retenido (es decir,  $^{227}\text{Th}$  que no se elimina del cuerpo) será típicamente al menos 18 o 25 kBq/kg, de manera preferente al menos 36 kBq/kg y de manera más preferente al menos 75 kBq/kg, por ejemplo, 100 kBq/kg o más. Se esperara que mayores cantidades de torio tengan mayor efecto terapéutico pero no se pueden administrar si aparecen efectos secundarios intolerables. Igualmente, si el torio se administra en una forma que tiene una vida media biológica corta (es decir, la vida media antes de la eliminación del cuerpo que tiene aún el torio), entonces, se requerirán mayores cantidades del radioisótopo para un efecto terapéutico debido a que la mayoría del torio se eliminara antes de su descomposición. Sin embargo, habrá una disminución correspondiente en la cantidad de radio-223 generado. Las cantidades anteriores de torio-227 que se van a administrar cuando el isótopo se retenga completamente, se puedan relacionar fácilmente a dosis equivalentes con vidas medias biológicas más cortas. Estos cálculos son bien conocidos en la técnica y se dan en el documento WO 04/091668 (por ejemplo en el texto en los Ejemplos 1 y 2).

Si un compuesto radiomarcado libera núclidos hijo, es importante conocer el destino, si es aplicable, de cualquier núclido o núclidos hijos radioactivos. Con  $^{227}\text{Th}$ , el producto hijo principal es  $^{223}\text{Ra}$ , que está bajo evaluación clínica debido a sus propiedades de búsqueda ósea. El radio-223 se depura de la sangre muy rápidamente y bien se concentra en el esqueleto o se excreta mediante rutas intestinales y renales (véase Larsen, J Nucl Med 43(5, Supplement) 160P (2002)). El radio-223 liberado *in vivo* a partir de  $^{227}\text{Th}$  por lo tanto no puede afectar el tejido blando saludable en un mayor grado. En el estudio de Muller en Int. J. Radiat. Biol. 2E:233-243 (1971) con respecto a la distribución de  $^{227}\text{Th}$  como la sal disuelta de citrato, se encontró que el  $^{223}\text{Ra}$  generado a partir de  $^{227}\text{Th}$  en tejidos blandos se re-distribuyó fácilmente a hueso o se excretó. La toxicidad conocida del radio alfa-emisor, particularmente a la medula ósea, de esta manera es una cuestión con las dosis de torio.

Se estableció por primera vez en el documento WO 04/091668 que, en realidad, se puede administrar una dosis de al menos 200 kBq/kg de  $^{223}\text{Ra}$  y tolerar en sujetos humanos. Estos datos se presentan en esa publicación. Por lo tanto, ahora se puede ver que, a pesar de ser inesperado, existe una ventana terapéutica en la cual se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de  $^{227}\text{Th}$  (tal como más de 36 kBq/kg) a un sujeto mamífero sin la expectación que ese sujeto sufrirá un riesgo inaceptable de mielotoxicidad seria o aun letal. Sin embargo, es extremadamente importante que se haga el mejor uso de esta ventana terapéutica y por lo tanto es esencial que el torio radiactivo se vuelva complejo de forma rápida y eficiente, y se mantenga con muy alta afinidad de modo que se administre al sitio diana la proporción más grande posible de la dosis.

La cantidad de  $^{223}\text{Ra}$  generada a partir de un producto farmacéutico de  $^{227}\text{Th}$  dependerá de la vida media biológica del compuesto radiomarcado. La situación ideal sería usar un complejo con una rápida captación tumoral, incluyendo internalización en la célula tumoral, fuerte retención tumoral y una corta vida media biológica en tejidos 15 normales. Sin embargo, pueden ser útiles los complejos con menos de la vida media biológica ideal en tanto que se mantenga la dosis de  $^{223}\text{Ra}$  dentro del intervalo tolerable. La cantidad de radio-223 generada *in vivo* será un factor de la cantidad de torio administrada y el tiempo de retención biológica del complejo de torio. La cantidad de radio-223 generada en cualquier caso particular se puede calcular fácilmente por un experto en la técnica. La cantidad máxima administrable de  $^{227}\text{Th}$  se determinara por la cantidad de radio generada *in vivo* y debe ser menor que la cantidad que producirá un nivel intolerable de efectos secundarios, particularmente mielotoxicidad. Esta cantidad en general será menos de 300kBq/kg, particularmente menos de 200 kBq/kg y de manera más preferente menos de 170 kBq/kg (por ejemplo menos de 130 kBq/kg). La dosis mínima efectiva se determinara por la citotoxicidad del torio, la susceptibilidad del tejido enfermo a la irradiación alfa generada y el grado al cual se combina de manera eficiente el torio, se mantiene y se distribuye por el complejo que selecciona la diana (que es la combinación del ligando y la porción que se une a diana, en este caso).

El complejo de torio se administra de manera deseable a una dosis de torio-227 de 18 a 400 kBq/kg de peso corporal, de manera preferente de 36 a 200 kBq/kg, (tal como de 50 a 200 kBq/kg) de manera más preferente de 75 a 170 kBq/kg, especialmente de 100 a 130 kBq/kg. De manera correspondiente, una unidad de dosis individual puede comprender alrededor de cualquiera de estos intervalos multiplicado por un peso corporal adecuado, tal como

de 30 a 150 Kg, de manera preferente de 40 a 100 Kg (por ejemplo un intervalo de 540 kBq a 4000 KBq por dosis, etc.). La dosis de torio, el agente complejante y la ruta de administración serán de manera más deseable tal que la dosis de radio-223 generada *in vivo* es menor de 300 kBq/kg, de manera más preferente menos de 200 kBq/kg, de manera aún más preferente menos de 150 kBq/kg, especialmente menos de 100 kBq/kg. Nuevamente, esto proporcionará una exposición a  $^{223}\text{Ra}$  indicadas al multiplicar estos intervalos por cualquiera de los pesos corporales indicados. Los niveles de dosis anteriores son preferentemente la dosis completamente retenida de  $^{227}\text{Th}$  pero puede ser la dosis administrada tomando en cuenta que se puede depurar algo de  $^{227}\text{Th}$  del cuerpo antes de que se descomponga.

Donde la vida media biológica del complejo  $^{227}\text{Th}$  sea corta en comparación con la vida media física (por ejemplo menos de 7 días, especialmente menos de 3 días) se pueden necesitar dosis administradas significativamente mayores para proporcionar la dosis retenida equivalente. De esta manera, por ejemplo, una dosis completamente retenida de 150 kBq/kg es equivalente a un complejo con una vida media de 5 días administrados a una dosis de 711 kBq/kg. La dosis equivalente administrada para cualquier dosis retenida apropiada se puede calcular de la velocidad de depuración biológica del complejo usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Puesto que la descomposición de un núcleo de  $^{227}\text{Th}$  proporciona un átomo de  $^{223}\text{Ra}$ , la retención y actividad terapéutica del  $^{227}\text{Th}$  estará directamente relacionada con la dosis de  $^{223}\text{Ra}$  soportada por el paciente. La cantidad de  $^{223}\text{Ra}$  generada en cualquier situación particular se puede calcular usando procedimientos bien conocidos.

Esta divulgación incluye un procedimiento para el tratamiento de enfermedad en un sujeto mamífero (como se describe en el presente documento), comprendiendo dicho procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado que comprende una porción dirigida a una diana de tejido, un ligando octadentado (especialmente cualquiera de aquellos descritos en el presente documento) y un isótopo radioactivo de torio (por ejemplo, torio-227).

Es deseable obviamente, reducir al mínimo la exposición de un sujeto al isótopo hijo de  $^{223}\text{Ra}$ , a menos que se empleen de forma útil las propiedades de este. En particular, la cantidad de radio-223 generada *in vivo* será típicamente mayor de 40 kBq/kg, por ejemplo mayor de 60 kBq/kg. En algunos casos, será necesario que el  $^{223}\text{Ra}$  generado *in vivo* sea más de 80 kBq/kg, por ejemplo mayor de 100 o 115 kBq/kg.

Los conjugados marcados con torio-227 en soluciones vehículos apropiadas se pueden administrar de manera intravenosa, de forma intracavitaria (por ejemplo intraperitonealmente), de forma subcutánea, oralmente o tópicamente, como una aplicación única o en un régimen de aplicación fraccionada. De manera preferente los complejos conjugados a la porción que se selecciona la diana se administraran como soluciones por una ruta parenteral (por ejemplo, transcutánea), especialmente de forma intravenosa o por una ruta intracavitaria. De manera preferente, las composiciones de la presente invención se formularán en solución estéril para administración parenteral.

Se puede usar torio-227 en los procedimientos y productos de la presente invención solos o en combinación con otras modalidades de tratamiento incluyendo cirugía, terapia de radiación de haz externo, quimioterapia, otros radionúclidos, o ajuste de temperatura de tejido, etc. Esto forma una realización adicional preferida del procedimiento de la invención y las formulaciones/medicamentos pueden comprender de manera correspondiente al menos un agente terapéuticamente activo, adicional, tal como otro agente radioactivo o un agente quimioterapéutico.

El sujeto también se somete a tratamiento con células madre y/u otra terapia de soporte para reducir los efectos de la mielotoxicidad inducida por radio-223.

De acuerdo con esta invención, el  $^{227}\text{Th}$  se puede volver complejo al dirigir a la diana los agentes complejantes. Típicamente, las porciones que seleccionan la diana tendrán un peso molecular de 100 g/mol a varios millones de g/mol (particularmente 100 g/mol a 1 millón de g/mol), y tendrán preferentemente afinidad para un receptor relacionado a enfermedad ya sea de forma directa, y/o comprenderán un aglutinante pre-administrado adecuado (por ejemplo biotina o avidina) unido a una molécula que se ha dirigido a diana en la enfermedad por adelantado para administrar  $^{227}\text{Th}$ . Las porciones adecuadas que se dirigen a diana incluyen poli- y oligopéptidos, proteínas, fragmentos de ADN y ARN, aptámeros etc., preferentemente una proteína, por ejemplo avidina, estreptavidina, un anticuerpo policlonal o monoclonal (incluyendo anticuerpos tipo IgG e IgM), o una mezcla de proteínas o fragmentos o construcciones de proteína. Son particularmente preferidos anticuerpos, construcciones de anticuerpo, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo fragmentos de FAB o cualquier fragmento que comprende al menos una región de unión a antígeno), construcciones de fragmentos (por ejemplo anticuerpos de cadena individual) o una mezcla de los mismos.

También adecuados para su uso son los conjugados terapéuticos de  $^{227}\text{Th}$  complejo con un péptido, aminoácido, hormona esteroidea o no esteroidea, folato, estrógeno, testosterona, biotina, u otros compuestos de unión específica con peso molecular típicamente por debajo de 10 000 g/mol.

En general, el ligando octadentado se conjuga directamente o de forma indirecta (por ejemplo mediante una porción ligadora) a la porción que selecciona la diana. Las construcciones generales de este tipo; es decir de metal activo

(por ejemplo terapéuticamente o diagnósticamente activo) - porción complejante - porción ligadora opcional - porción que selecciona diana, son bien conocidas en el campo de los radio farmacéuticos dirigidos a diana y agentes de formación de imágenes dirigidos a la diana. Sin embargo, está disponible poco o ningún trabajo que valore la adecuabilidad de varios ligandos para uso específico con iones de torio 4+. En este respecto, se puede tener referencia por ejemplo a "Handbook of Targeted Delivery of Imaging Agents", Ed. Torchilin, CRC Press, 1995.

Los quelantes previamente conocidos para torio incluyen los quelantes de poliaminopoliácido que comprenden una estructura de poliazaalcano cíclica o ramificada con grupos ácidos (por ejemplo carboxialquilo) unidos a los nitrógenos de la estructura. Los ejemplos de estos quelantes incluyen derivados de DOTA tal como de ácido p-isotiocianatobencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético (p-SCN-Bz-DOTA) y derivados de DTPA tal como ácido p-isotiocianatobencil-dietilentriaminapentaacético (p-SCN-Bz-DTPA), los primeros que son quelantes cíclicos, los últimos quelantes lineales.

Se han ejemplificado anteriormente derivados de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético, pero no se pueden usar fácilmente procedimientos normales para quelar torio con derivados de DOTA. El calentamiento del derivado de DOTA con el metal proporciona el quelado de forma efectiva, pero frecuentemente en bajos rendimientos. Hay una tendencia de que al menos una porción de ligando se desnaturalice en forma irreversible durante el procedimiento. Adicionalmente, debido a su relativamente alta susceptibilidad a desnaturalización irreversible, en general es necesario evitar la unión de la porción que selecciona diana hasta que se completen todos los pasos de calentamiento. Esto adiciona un paso químico adicional (con todo el trabajo y separación necesarios) que se debe llevar a cabo durante el tiempo de vida o descomposición del isótopo alfa-emisor de torio. Obviamente, se prefiere no manejar el material alfa-emisor de esta manera o generar el correspondiente desperdicio a un mayor grado que el necesario. Adicionalmente, todo el tiempo transcurrido al preparar el conjugado desperdicia una proporción del torio que se descompondrá durante este período preparatorio.

Se prefiere que los complejos de torio alfa- emisores y un ligando octadentado, en todos los aspectos de la presente invención, se formen o se puedan formar sin calentamiento por encima de 60 °C (por ejemplo sin calentar por encima de 50 °C), de manera preferente sin calentar por encima de 38 °C y de manera más preferente sin calentar por encima de 25 °C.

Adicionalmente, se prefiere que el conjugado de la porción de selección de diana y el ligando octadentado se preparen antes de la adición del isótopo alfa-emisor de torio (por ejemplo ion de  $^{227}\text{Th}^{4+}$ ). Los productos de la invención de esta manera se forman preferentemente o se pueden formar por formación de complejos del isótopo alfa-emisor de torio (por ejemplo ion de  $^{227}\text{Th}^{4+}$ ) por un conjugado de un ligando octadentado y una porción dirigida a una diana de tejido.

Los quelantes pueden ser moléculas distintas de fosfonato y en una realización de la presente invención, el  $^{227}\text{Th}$  no se unirá a ningún grupo fosfonato u otro que selecciona como diana el hueso no administrado con dichos materiales.

Los tipos de compuestos diana que se pueden enlazar a torio (por ejemplo, torio-227) mediante un quelante octadentado (que comprende una porción de acoplamiento como se describe en el presente documento). La porción diana se puede seleccionar de grupos diana conocidos, que incluyen anticuerpos monoclonales o policlonales, factores de crecimiento, péptidos, hormonas, y análogos de hormonas, folato y derivados de folato, biotina, avidina y estreptavidina o análogos de los mismos. Otros posibles vehículos pueden ser ARN, ADN, o fragmentos de los mismos, oligonucleótidos, carbohidratos, lípidos o compuestos producidos al combinar estos grupos con o sin proteínas, etc.

La porción diana de tejido puede excluir, en una realización, los buscadores óseos, los liposomas y los anticuerpos conjugados a folato o fragmentos de anticuerpo. De manera alternativa, se pueden incluir estas porciones.

Las moléculas marcadas con torio (por ejemplo torio-227) de la invención se pueden usar para el tratamiento de enfermedades cancerosas o no cancerosas al seleccionar como diana receptores relacionados a la enfermedad. Típicamente, este uso médico de  $^{227}\text{Th}$  será por radio inmunoterapia en base al enlace de  $^{227}\text{Th}$  por un quelante a un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o a una construcción de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo para el tratamiento de enfermedades cancerosas o no cancerosas. El uso de  $^{227}\text{Th}$  en procedimientos y productos farmacéuticos de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuado para el tratamiento de cualquier forma de cáncer incluyendo carcinomas, sarcomas, linfomas y leucemias, especialmente cáncer del pulmón, mama, próstata, vejiga, riñón, estómago, páncreas, esófago, cerebro, ovario, útero, cáncer oral, cáncer colorrectal, melanoma, mieloma múltiple y linfoma no de Hodgkin.

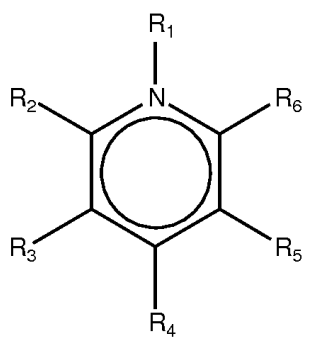
La cantidad de  $^{223}\text{Ra}$  liberada se puede disminuir si la molécula que tiene  $^{227}\text{Th}$  tiene una corta vida media de retención biológica *in vivo* debido a que el radionúclido se eliminara en su mayor parte antes de que una alta proporción del  $^{227}\text{Th}$  se ha descompuesto a  $^{223}\text{Ra}$ . Sin embargo, la cantidad de  $^{227}\text{Th}$  se necesitará aumentar a fin de permanecer terapéuticamente efectiva, de acuerdo con la presente invención. Si el agente complejante se selecciona para distribuir el  $^{227}\text{Th}$  en el interior de las células seleccionadas como diana, esto aumentará adicionalmente la citotoxicidad específica y reducirá el efecto toxico sistémico de los hijos radioactivos debido a la retención al menos parcial de isótopo hijo al sitio tumoral. Ambas de estas características amplían la ventana



terapéutica de  $^{227}\text{Th}$  y de esta manera forman realizaciones preferidas de la invención.

Se pueden tratar pacientes tanto con enfermedad esquelética como del tejido blando tanto por el  $^{227}\text{Th}$  como por el  $^{223}\text{Ra}$ , generados *in vivo* por el torio administrado. En este aspecto particularmente ventajoso, un componente terapéutico adicional al tratamiento deriva de la cantidad aceptablemente no mielotóxica de  $^{223}\text{Ra}$  por la selección como diana de la enfermedad esquelética. En este procedimiento terapéutico, se utiliza típicamente  $^{227}\text{Th}$  para tratar cáncer primario y/o metastásico al enlazarlo de forma adecuada al mismo y el  $^{223}\text{Ra}$  generado de la descomposición de  $^{227}\text{Th}$  se utiliza para tratar enfermedad esquelética relacionada en el mismo sujeto. Esta enfermedad esquelética puede ser metástasis al esqueleto que resulta de un cáncer primario de tejido blando, o puede ser enfermedad primaria donde el tratamiento de tejido blando va a contrarrestar un cáncer metastásico. Ocasionalmente, las enfermedades de tejido blando y esquelético pueden no estar relacionadas (por ejemplo, el tratamiento adicional de una enfermedad esquelética en un paciente con una enfermedad reumatológica de tejido blando).

Se desvela el uso de un ligando octadentado, particularmente un ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona. Dichos ligandos comprenderán típicamente al menos un grupo quelante de la siguiente estructura (I) de piridina sustituida:



en la que  $R_1$  es un grupo N-sustituyente opcional y de esta manera puede estar ausente o se puede seleccionar de grupos hidrocarbilo, OH, O-hidrocarbilo, SH y S-hidrocarbilo, donde cualquiera o cada porción hidrocarbilo se selecciona independientemente de grupos hidrocarbilos cortos tal como hidrocarbilo de C1 a C8, incluyendo grupos alquilo, alqueno o alquino C1 a C8, o puede ser un OH u O-hidrocarbilo.  $R_1$  también puede comprender una porción ligadora, como se indica más adelante y/o puede comprender una porción de acoplamiento también como se indica más adelante.

En la Fórmula I, los grupos  $R_2$  a  $R_6$  se pueden seleccionar cada uno independientemente de H, OH, =O, hidrocarbilo corto (como se describe en el presente documento), un resto ligador (como se describe en el presente documento) y/o un resto acoplador (como se describe en el presente documento). En general, al menos uno de los grupos  $R_1$  a  $R_6$  será OH. Generalmente, al menos uno de los grupos  $R_2$  a  $R_6$  será =O. Generalmente, al menos uno de los grupos  $R_1$  a  $R_6$  será un resto ligador (como se describe en el presente documento). De manera preferente, exactamente uno de los grupos  $R_2$  a  $R_6$  será =O. De manera preferente exactamente uno de los grupos  $R_1$  a  $R_6$  será OH. De manera preferente exactamente uno de los grupos  $R_1$  a  $R_6$  será una porción ligadora (como se describe en el presente documento). Los grupos restantes  $R_1$  a  $R_6$  pueden ser cualquiera de estas porciones indicadas en el presente documento, pero son de manera preferente H. Donde una porción ligadora o cualquier ligador opcional, grupo quelante o plantilla unida a una porción ligadora no comprenda una porción de acoplamiento entonces uno de los grupos  $R_1$  a  $R_6$  es preferentemente una porción de acoplamiento (como se describe en el presente documento).

Uno de los grupos  $R_1$  a  $R_6$  será OH y uno de  $R_2$  a  $R_6$  será =O y los grupos OH y =O estarán en átomos vecinos del anillo. Preferentemente, OH y =O pueden estar en los átomos 1,2; 2,3; 3,2; 3,4; o 4,3 respectivamente (numeración desde el nitrógeno como se esperaba). Los ligandos octadentados que tienen al menos una porción quelante donde están presentes grupos OH y =O en las posiciones 3 y 2, respectivamente, son altamente preferidos. Los ligandos octadentados pueden tener 2, 3 o 4 de estos grupos quelantes, donde es altamente preferido 2 o 4 de estos grupos.

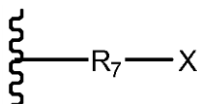
Las porciones quelantes adecuadas se pueden formar por procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen los procedimientos descritos en el documento US 5.624.901 (por ejemplo, ejemplos 1 y 2) y el documento W02008/063721. Como se usa en el presente documento, la expresión "resto conector" ( $R_L$  en la fórmula II) se usa para indicar una entidad química que sirve para unir al menos dos grupos quelantes en los ligandos octadentados, que forman un componente clave en diversos aspectos de la invención. Típicamente, cada grupo quelante (por ejemplo aquellos de la fórmula I anterior y/o fórmula II posterior) serán bi-dentados y de este modo cuatro grupos quelantes, de los cuales al menos uno es de la fórmula I, estarán típicamente presentes en el ligando. Estos grupos quelantes se unen entre sí por medio de sus porciones ligadoras. De esta manera, una porción ligadora (por ejemplo grupo  $R_L$  posterior) se puede compartir entre más de un grupo quelante de la fórmula I y/o II. Las porciones ligadoras también pueden servir como el punto de unión entre el agente complejante del ligando octadentado y la porción dirigida a diana. En este caso, al menos una porción ligadora se unirá a una porción de acoplamiento ( $R_c$ ). Las porciones ligadoras adecuadas incluyen grupos hidrocarbilo cortos, tal como hidrocarbilo C1 a C12, incluyendo

grupo alquilo, alqueniilo o alquinilo C1 a C12, incluyendo grupos metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y/o hexilo de todas las topologías.

Las porciones ligadoras también pueden ser o comprender cualquier otro enlace químico adecuadamente fuerte que incluyen grupos ésteres, éteres, amina y/o amida. El número total de átomos que se unen a las dos porciones quelantes (contando por la ruta más corta si existe más de una ruta) se limitarán en general, para restringir las porciones ligadoras en un arreglo adecuado para formación de complejo. De esta manera, las porciones ligadoras se elegirán típicamente para proporcionar no más de 15 átomos entre las porciones ligadoras, de manera preferente, 1 a 12 átomos, y de manera más preferente 1 a 10 átomos entre las porciones ligadoras. Donde una porción ligadora se une a dos porciones quelantes directamente, el ligador será típicamente de 1 a 12 átomos de longitud, de manera preferente de 2 a 10 (tal como de etilo, propilo, n-butilo etc.). Donde la porción ligadora se une a una plantilla central (ver más adelante) entonces cada ligador puede ser más corto con dos ligadores separados que unen las porciones quelantes. Una longitud del ligador de 1 a 8 átomos, de manera preferente de 1 a 6 átomos se puede preferir en este caso (metilo, etilo y propilo que son adecuados, como son grupos tal como aquellos que tienen un enlace éster, éter, o amida en un extremo o ambos).

Además de la porción ligadora, que sirve principalmente para enlazar los varios grupos quelantes de ligando octadentado entre si y/o a una plantilla central, el octadentado comprende además de manera preferente una "porción de acoplamiento" ( $R_c$ ). La función de la porción de acoplamiento es enlazar el ligando octadentado a la porción dirigida a diana. Esto se puede lograr ya sea por unión covalente o no covalente (por ejemplo por un par específico de unión tal como biotina/avidina (estreptavidina). De manera preferente, las porciones de acoplamiento se enlazarán covalentemente a los grupos quelantes, ya sea por unión covalente directa a uno de los grupos quelantes o más típicamente por unión a una porción ligadora o plantilla. Si se usan dos o más porciones de acoplamiento, cada una se puede unir a cualquiera de los sitios disponibles tal como cualquier plantilla, ligador o grupo quelante.

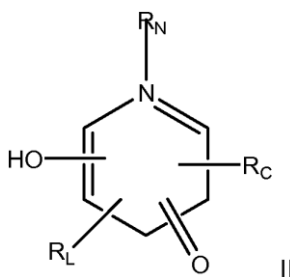
En una realización, la porción de acoplamiento puede tener la estructura:



en la que  $R_7$  es una porción de formación de puente, que es un miembro seleccionado de alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido; y X es una porción de selección diana o un grupo funcional reactivo. Las porciones preferidas de formación de puente incluyen todos aquellos grupos indicados en el presente documento como porciones ligadoras adecuadas. Las porciones preferidas de selección diana incluyen todas aquellas descritas en el presente documento y los grupos X reactivo preferidos incluyen cualquier grupo capaz de formar un enlace covalente una porción de selección diana, que incluye, por ejemplo, grupos COOH, OH, SH, NHR y COH, donde el R de NHR puede ser H o cualquiera de los grupos hidrocarbilo cortos descritos en el presente documento. Los grupos altamente preferidos para unión sobre la porción de selección diana incluyen épsilon-aminas de residuos de lisina y grupos tiol de residuos de cisteína. Los ejemplos no limitantes de grupos X reactivos adecuados, incluyen N- hidroxisuccimidilésteres, imidoésteres, acilhaluros, N-maleimidias, alfa-halo-acetilo e isotiocianatos, donde los tres últimos son adecuados para reacción con un grupo tiol.

La porción de acoplamiento se une de manera preferente, de modo que el ligando octadentado acoplado resultante será capaz de sufrir formación de complejos estables de iones metálicos. La porción de acoplamiento de esta manera se enlazarán de manera preferente al ligador, plantilla, o porción quelante en un sitio que no interfiera de forma significativa con la formación de complejos. Este sitio estará preferentemente en el ligador o plantilla, de manera más preferente en una posición distante de la superficie que se une a la diana.

Los grupos quelantes preferidos incluyen aquellos de la fórmula II a continuación:



En la fórmula II anterior, la porción =O representa un grupo ceto unido a cualquier carbono del anillo de piridina, el -OH representa una porción hidroxilo unido a cualquier carbono del anillo de piridina y el  $-R_L$  representa una porción ligadora que se une a la porción de hidroxipiridinona a otras porciones complejantes para formar el ligando

octadentado completo. Cualquier porción ligadora descrita en el presente documento es adecuada como  $R_L$  incluyendo grupos hidrocarbilo cortos, tal como hidrocarbilo de 1 a 8 átomos de carbono, incluyendo grupo alquilo, alqueno o alquino C1 a C8, incluyendo grupos metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y/o hexilo de todas las topologías.  $R_L$  pueden unirse al anillo de la fórmula II en cualquier átomo del anillo de piridina, tal como átomo de

5 carbono o nitrógeno. Los grupos  $R_L$  entonces pueden unirse a su vez directamente a otra porción quelante, a otro grupo ligador y/o a un átomo o grupo central, tal como un anillo u otra plantilla (como se describe en el presente documento). Los ligadores, grupos quelantes y porciones de plantilla opcionales se seleccionan para formar un ligando octadentado apropiado.

10 En una realización preferida, las porciones -OH y =O de fórmula II residen en los átomos vecinos del anillo de piridina, tal que 1,2-; 2,3-, 3,2-; 4,3-; y 3,4-hidroxipiridinona son todos altamente adecuados. En un aspecto de la divulgación, donde el grupo OH o la porción ligadora  $R_L$  residen en el nitrógeno del anillo de piridina, en general está ausente el grupo  $R_N$ . De acuerdo con la invención,  $R_N$  está presente y se selecciona de grupos hidrocarbilo sustituidos o no sustituidos, particularmente los grupos hidrocarbilo cortos indicados en el presente documento.

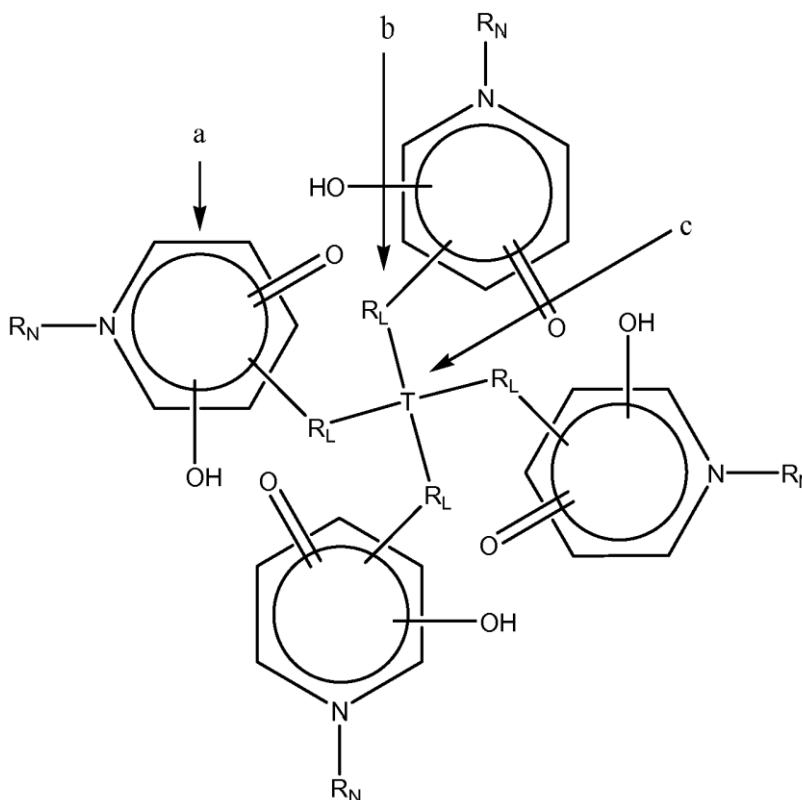
15 En una realización preferida, al menos una porción de 3,2-hidroxipiridinona está presente en la estructura del ligando octadentado. Esta se puede sustituir evidentemente por cualquiera de las diversas porciones sustituyentes indicadas en el presente documento.

20 Puesto que cada una de las porciones de la fórmula II tiene dos oxígenos potencialmente complejantes, una realización de la presente invención proporciona un ligando octadentado que comprende al menos 2, de manera preferente al menos 3 y de manera mucho más preferente 4 porciones independientemente elegidas de la fórmula I. Cada porción de fórmula II puede tener un patrón de sustitución independiente, pero en una realización preferida, al menos una porción es una porción de 3,2-hidroxipiridinona. El ligando puede incluir 2, 3 o 4 porciones de 3,2-hidroxipiridinona (sustituidas como se apropiado, como se describe en el presente documento).

25 Cada porción de fórmula I o II en el ligando octadentado se puede unir al resto del ligando por cualquier grupo ligador apropiado tal como se analiza en el presente documento y en cualquier topología apropiada. Por ejemplo, se pueden unir cuatro grupos de fórmula I por sus grupos ligadores a una estructura para formar un ligando lineal, o se pueden poner en puente por grupos ligadores para formar una estructura tipo "oligómero", que puede ser lineal o cíclica. De manera alternativa, las porciones de ligando de fórmulas I y/o II se pueden unir en una topografía de "cruz" o "estrella" a un grupo o átomo central, cada uno por un ligador (por ejemplo, porción " $R_L$ "). Las porciones ligadoras ( $R_L$ ) pueden unirse únicamente a través de enlaces carbono-carbono, o puede unirse entre sí, a otros

30 grupos quelantes, a una estructura, plantilla, porción de acoplamiento u otro ligador por cualquier funcionalidad apropiadamente fuerte incluyendo un enlace de amina, amida, éster, éter, tio-éter o disulfuro.

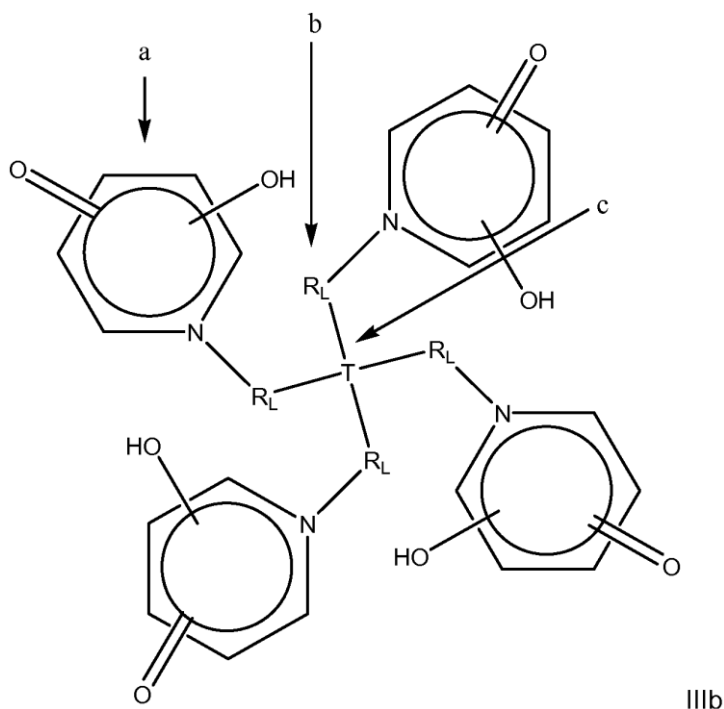
Una disposición "estelar" de acuerdo con la presente invención se indica en la fórmula III a continuación:



III

En la que todos los grupos y posiciones son como se indican en las reivindicaciones. "T" es un grupo plantilla, tal como un átomo de carbono, cadena de hidrocarburo (tal como cualquiera de aquellos descritos anteriormente en el presente documento), anillo alifático o aromático (incluyendo anillos heterocíclicos) o sistema de anillo fusionado. La plantilla más básica será un carbono individual, que entonces se unirá a cada de las porciones quelantes por sus grupos de enlace. Las cadenas más largas, tal como etilo o propilo son igualmente viables con dos porciones quelantes que se unen a cada extremo de la plantilla. De forma evidente, cualquier enlace adecuadamente fuerte se puede usar al unir la plantilla y porciones ligadoras incluyendo enlaces carbono-carbono, enlaces de éster, éter, amina, amida, tio-éter o disulfuro.

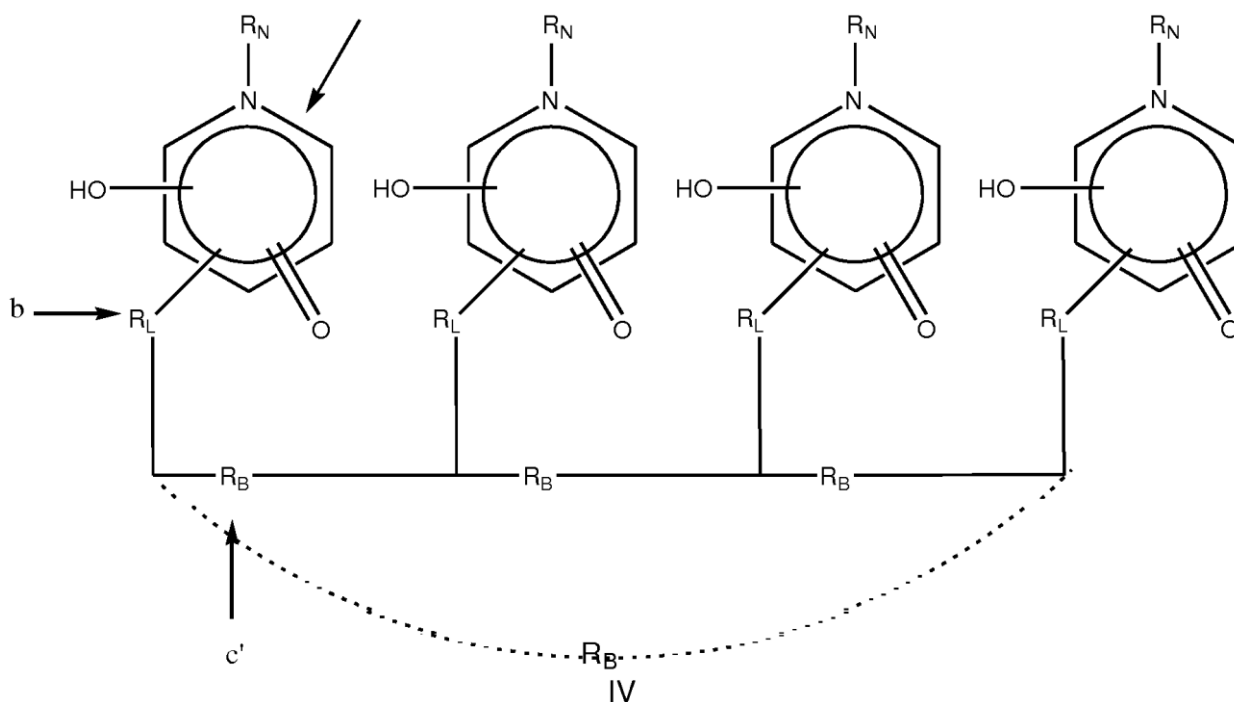
En la estructura de fórmula III, los grupos  $R_N$  y  $R_L$  pueden ser los mismos tal que las porciones quelantes se unan a la plantilla T a través del átomo de nitrógeno del anillo de piridina. Esto proporciona estructuras del tipo IIIb a continuación:



Evidentemente, en las estructuras de fórmula II, III, IIIb, IV e IVb, estas posiciones del anillo o anillos de piridina que de otro modo no están sustituidas (por ejemplo, por una porción ligadora o de acoplamiento) pueden tener sustituyentes descritos para  $R_1$  a  $R_5$  en la fórmula I, como sea apropiado. En particular, pueden estar presentes pequeños sustituyentes de alquilo, tal como grupos metilo, etilo o propilo en cualquier posición.

El ligando octadentado comprenderá adicionalmente al menos una porción de acoplamiento como se describe anteriormente. Esta puede ser cualquier estructura adecuada, incluyendo cualquiera de aquellas indicadas en el presente documento y terminara con la porción diana, un aglutinante específico o un grupo funcional capaz de enlazar esta porción diana o aglutinante específico. La porción de acoplamiento puede unirse a cualquier punto adecuado del ligador, plantilla o porción quelante, tal como los puntos a), b) y/o c) como se indica en la fórmula III. La unión de la porción de acoplamiento puede ser por cualquier enlace adecuadamente fuerte tal como enlaces carbono-carbono, enlaces de éster, éter, amina, amida, tio-éter o disulfuro. De manera similar, los grupos capaces de formar cualquier de estos enlaces a la porción de selección a diana son adecuados para el extremo funcional de la porción de acoplamiento y esa porción terminaran con estos grupos cuando se una a la porción de selección a diana.

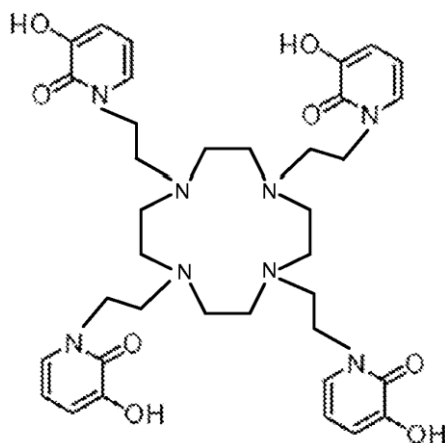
Una estructura alternativa tipo "cadena principal" de acuerdo con la presente invención se indica a continuación en la Fórmula IV



En donde todos los grupos y posiciones son como se indican en las reivindicaciones y "R<sub>B</sub>" es adicionalmente una porción de cadena principal, que típicamente será de estructura similar y función similar a cualquiera de las porciones ligadoras indicadas en el presente documento, y de esta manera, cualquier definición de una porción ligadora puede tomarse para aplicarse a la porción y cadena principal donde lo permita el contexto. Las porciones de estructura elemental adecuadas formaran un núcleo molecular en el cual se unen las porciones quelantes por medio de sus grupos ligadores. Habitualmente, se requieren tres o cuatro porciones de cadena principal. Típicamente, esto será tres para una cadena principal lineal o cuatro si la cadena principal está ciclada. Las porciones de cadena principal particularmente preferidas incluyen cadenas de hidrocarburos cortos (tal como aquellas descritas en el presente documento) que tienen opcionalmente un heteroátomo o porción funcional en uno o ambos extremos. Los grupos amina y amida son particularmente adecuados a este respecto. La porción de acoplamiento puede unirse a cualquier punto adecuado del ligador, cadena principal o porción quelante, tal como en los puntos a), b) y/o c') como se indica en la fórmula IV. La unión de la porción de acoplamiento puede ser por cualquier enlace adecuadamente fuerte tal como enlaces carbono-carbono, enlaces de éster, éter, amina, amida, tio-éter o disulfuro. De manera similar, los grupos capaces de formar cualquier de estos parte de selección a diana.

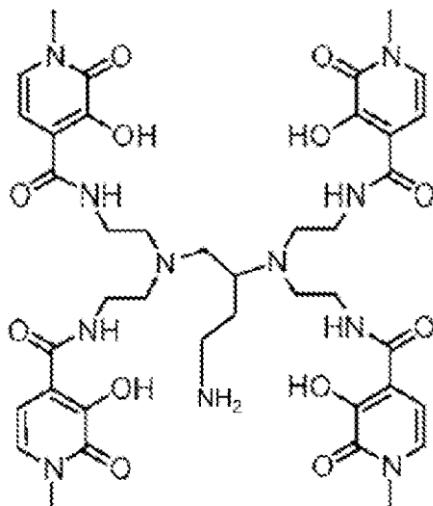
Como con la Fórmula III, en la estructura de fórmula IV los grupos R<sub>N</sub> y R<sub>L</sub> pueden ser los mismos tal que las porciones quelantes se unen a la cadena principal R<sub>B</sub> a través del átomo de nitrógeno del anillo de piridina. Esto proporciona estructuras del tipo IVb a continuación:





VIII

Como se indica anteriormente, el ligando octadentado incluirá típicamente una porción de acoplamiento que pueden unirse al resto del ligando en cualquier punto. Un compuesto de ejemplo con una porción funcionalizada que termine en la porción de acoplamiento, de acuerdo con esta realización, es la estructura IX a continuación:



IX

5

Se hace referencia adicional a Gordon AEV y col, Rational design of sequestering agents for plutonium and other actinides. Chem. Rev. 2003, 103, 4207- 4282, Solicitud de Patente PCT WO 2008/063721 A2 y T.N. Lambert y col., Tetrahedron Letters 43 (2002) 7379-7383.

La invención se ilustra adicionalmente por las figuras anexas, en las que:

- 10 La Figura 1 - muestra el cromatograma de la mezcla de reacción de  $^{232}\text{Th}^{4+}$  ( $\text{HNO}_3$ ) y 1 mg/ml ALG-DD-NCS en DMSO (relación teórica 2:3) después de 15 minutos a temperatura ambiente. Hay cantidades significativas del complejo  $^{232}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS ( $t_R = 5,74$  min;  $m/z$  1328,5) y ninguna traza del ligando libre ALG-DD-NCS ( $t_R = 5,36$ ).
- La Figura 2 - muestra el espectro másico del complejo  $^{232}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS ( $m/z$  1328,3949).
- 15 La Figura 3 - muestra el cromatograma de la mezcla de reacción de  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{HNO}_3$ ) y 1 mg/ml ALG-DD-NCS en DMSO (relación teórica 2:3) después de 15 minutos a temperatura ambiente. Hay cantidades significativas del complejo Fe-ALG-DD-NCS ( $t_R = 5,81$  min;  $m/z$  1153,51), y ninguna traza del ligando libre ALG-DD-NCS ( $t_R = 5,36$  min).
- La Figura 4 - muestra el espectro másico del complejo Fe-ALG-DD-NCS ( $m/z$  1153,3002).
- 20 La Figura 5 - muestra el cromatograma de la mezcla de reacción de  $\text{In}^{3+}$  ( $\text{HCl}$ ) y 1 mg/ml ALG-DD-NCS en DMSO (relación teórica 2:3) después de 15 minutos a temperatura ambiente. Hay cantidades significativas del complejo In-ALG-DD-NCS ( $t_R = 5,95$  min;  $m/z$  1212,5), ninguna traza de ligando libre ALG-DD-NCS ( $t_R = 5,36$  min).
- La Figura 6: - muestra el espectro de masa del complejo In-ALG-DD-NCS ( $m/z$  1212,2666).

- La Figura 7 - muestra el cromatograma de la mezcla de reacción de  $^{232}\text{Th}^{4+}$  ( $\text{HNO}_3$ ) y 1 mg/ml ALG1005-38 en tampón de acetato, pH 5,5, después de 10 minutos a temperatura ambiente (relación teórica 1:3). Hay cantidades significativas del complejo  $^{232}\text{Th}$ -ALG-1005-1038 ( $t_R = 3,56$ ; m/z 1184,51) y residuos del ligando libre ALG1005-38 ( $t_R = 3,20$ ).
- 5 La Figura 8 - muestra el espectro de masa del complejo  $^{232}\text{Th}$ -ALG1005-38 (m/z 1184,4662).
- La Figura 9 - muestra el cromatograma de la mezcla de reacción de  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{HNO}_3$ ) y 1 mg/ml ALG1005-38 en tampón de acetato, pH 5,5, después de 10 minutos a temperatura ambiente (relación teórica 1:3). Hay cantidades significativas del complejo Fe-ALG1005-38 ( $t_R = 3,70$ ; m/z 1009,5) y residuos de ligando libre ALG1005-38 ( $t_R = 3,22$ ).
- 10 La Figura 10 - muestra el espectro de masa del complejo Fe-ALG1005-38 (m/z 1009,3727).
- La Figura 11 - muestra el cromatograma de la mezcla de reacción de  $\text{In}^{3+}$  ( $\text{HCl}$ ) y 1 mg/ml ALG1005-38 en tampón de acetato, pH 5,5, después de 10 minutos a temperatura ambiente (relación teórica 1:3). Hay cantidades significativas del complejo In-ALG1005-38 ( $t_R = 3,72$ ; m/z 1068,5) y solo trazas del ligando libre ALG1005-38 ( $t_R = 3,21$ ).
- 15 La Figura 12 - muestra el espectro másico del complejo In-ALG1005-38 (m/z 1068,3485).
- La Figura 13 - muestra el cromatograma de la mezcla de reacción de  $\text{Ga}^{3+}$  ( $\text{HCl}$ ) y 1 mg/ml ALG1005-38 en tampón de acetato, pH 5,5, después de 10 minutos a temperatura ambiente (relación teórica 1:3). Cantidades significativas del complejo Ga-ALG1005-1038 ( $t_R = 3,65$ ; m/z 1022,5) y residuos del ligando libre ALG1005-38 ( $t_R = 3,21$ ).
- 20 La Figura 14 - muestra el espectro másico del complejo Ga-ALG1005-1038 (m/z 1022,3571).
- La Figura 15 - muestra el cromatograma de la mezcla de reacción de  $^{232}\text{Th}^{4+}$  ( $\text{HCl}$ ) y 1 mg/ml Bb-1-HOPO-1-DEBN (relación teórica 2:3) después de 15 minutos a temperatura ambiente. Hay cantidades significativas del complejo  $^{232}\text{Th}$ -Bb-1-HOPO-1-DEBN ( $t_R = 3,52$ ). Trazo superior: Cromatograma de Masa de m/z 1222,5. Trazo inferior: UV a 330 nm.
- 25 La Figura 16 - muestra el espectro másico del complejo  $^{232}\text{Th}$ -Bb-1-HOPO-1-DEBN (m/z 1222,5).
- La Figura 17 - muestra la cantidad calculada de  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab y  $^{227}\text{Th}$  libre unido a sedimentos de células SK-OV-3 en el día 0-7, mostrada como la descomposición corregida para la actividad de  $^{227}\text{Th}$  (cpm).
- 30 La Figura 18 - muestra los valores normalizados de luminiscencia para células SK-OV-3 tratadas con (1) medio regular (control); (2) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de trastuzumab; (3) 20 kBq/ml  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab (10166 Bq/ $\mu\text{g}$ ); y (4) 20 kBq/ml de  $^{227}\text{Th}$  libre.
- La Figura 19 - muestra un ensayo clonogénico de 1000 células SK-OV-3 individuales tratadas con (1) medio regular (control); trastuzumab (2), (3)  $^{227}\text{Th}$  libre, y (4)  $\text{Th}^{227}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab (10166 Bq/ $\mu\text{g}$ ). (Media  $\pm$  SD, n =3).
- 35 La Figura 20 - muestra un ensayo clonogénico de 3000 células individuales SK-OV-3 tratadas con (1) medio regular (control), (2) trastuzumab, (3)  $^{227}\text{Th}$  libre, y (4)  $\text{Th}^{227}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab (10166 Bq/ $\mu\text{g}$ ). (Media  $\pm$  SD, n =3).
- 40 La Figura 21 - muestra la distribución en órgano del  $\text{Th}^{227}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab (2700 Bq/ $\mu\text{g}$ ) en ratones desnudos Balb/c con xenoinjertos SK-OV-3, después de la biodistribución durante 24 horas y 4 días. (Media  $\pm$  SD, n = 5).

La invención ahora se ilustrará por los siguientes Ejemplos. Todos los compuestos ejemplificados en los ejemplos (excepto los ejemplos 12, 13 y 15) forman realizaciones preferidas de la invención (incluyendo intermedios y precursores preferidos) y pueden usarse de manera individual o en cualquier combinación en cualquier aspecto donde los permita el contexto. De esta manera, por ejemplo, cada uno y todos los compuestos 2 a 4 del Ejemplo 2, compuesto 10 del Ejemplo 3 y compuesto 7 del Ejemplo 4 forman realizaciones preferidas de sus diversos tipos.

#### Ejemplo 1- Aislamiento de torio-227 Puro

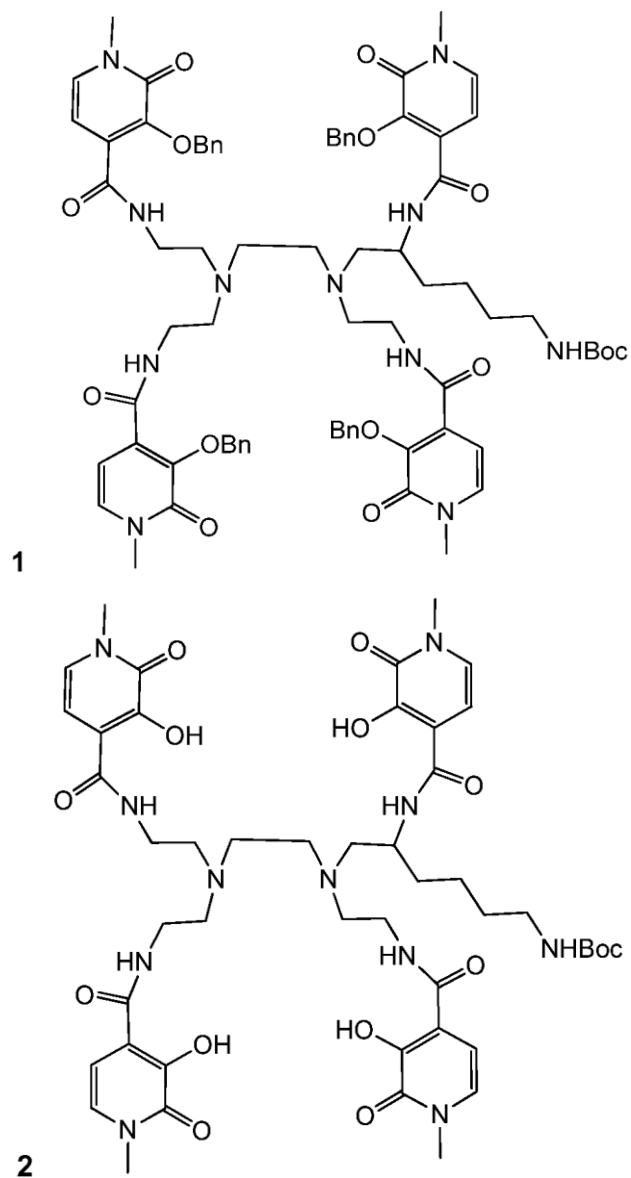
- Se aísla Torio-227 a partir de fuente de actinio- 227. Se produjo actinio-227 a través de irradiación de neutrones térmicos de radio-226 seguido por la descomposición de Radio-227 ( $t_{1/2} = 42,2$  m) a actinio-227. Se retuvo selectivamente el Torio-227 de una mezcla de composición de actinio-227 en solución 8 M de  $\text{HNO}_3$  por cromatografía de intercambio aniónico. Se usa una columna de 2 mm de diámetro interno,
- 50

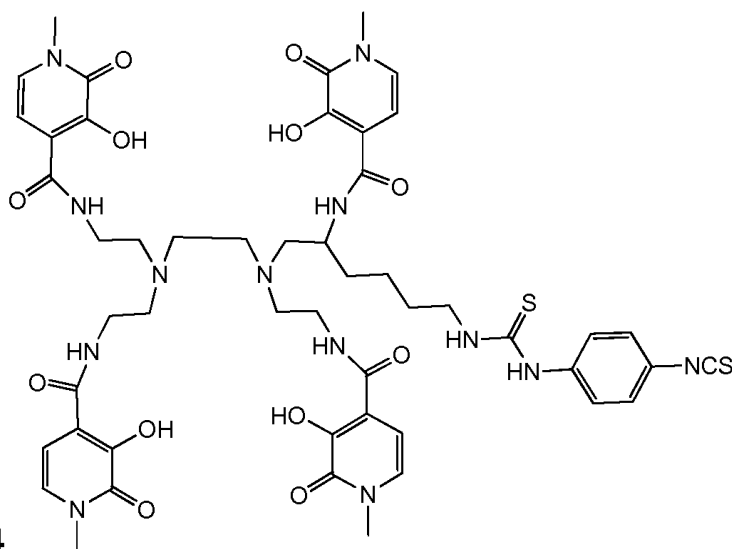
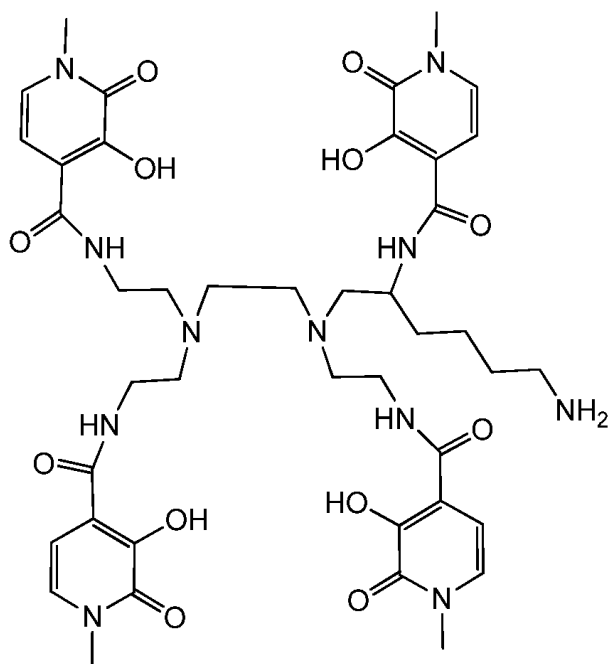


30 mm de longitud, que contiene 70 mg de resina AG® 1-X8 (malla 200-400, forma de nitrato). Después del actinio-227, el radio-223 e hijos se eluyeron de la columna, se extrajo el torio-227 de la columna con HCl 12 M. El producto eluído que contiene

Torio-227 se evaporó a sequedad y el residuo se suspendió en HCl 0,01 M.

## 5 Ejemplo 2 - Síntesis de ALG-DD-NCS





Se añadieron 3-benciloxi-1-metil-4-(2-tioxotiazolidin-1-il)carbonil-2(1*H*)-piridinona (sintetizado de acuerdo con Raymond, K.; Xu, J., US 5.624.901) (2,22 mmol, 0,8 g), trietilamina (0,31 ml, 2,22 mmol) y DMAP (5 mg) a una solución de éster terc-butílico del ácido [5-amino-6-((2-amino-etil)-{2-[bis-(2-amino-etil)-amino]etil}-amino)-hexil]-carbámico (BocLys-H(2,2)amina) (sintetizada de acuerdo con Raymond, K.; Corneillie, T.M.; Xu, J. documento WO 2008/063721 A2) (0,204 g, 0,505 mmol) en diclorometano (80 ml). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se cargó sobre una columna instantánea de gel de sílice y se eluyó con un gradiente de metanol al 2-8 % en diclorometano. Las fracciones apropiadas se recolectaron y evaporaron a sequedad para dar **ALG-001 (1)** (-0,4 g) como un aceite espeso color beige pálido.

MS (ESI, pos)  $m/z$  1369 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  1391 [M+Na]<sup>+</sup>

Se disolvió ALG-001 (1) (280 mg, 0,205 mmol) en ácido acético glacial (20 ml), se añadió Pd(OH)<sub>2</sub> al 20 % y catalizador en carbón (60 mg), y la mezcla se hidrogenó a 2,81-3,16 kg/cm<sup>2</sup> a temperatura ambiente durante la noche. La filtración se siguió de evaporación giratoria para dar **ALG-DEBN (2)** (-260 mg, con trazas de ácido acético) como aceite espeso color rojo vino.

MS (ESI, pos):  $m/z$  1007 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  1029 [M+Na]<sup>+</sup>

Se disolvió ALG-DEBN (2) (70 mg) en MeOH/diclorometano 2:1 (15 ml) a temperatura ambiente. Después se añadieron 0,5 g de resina Amberlyst-15 limpiada y la mezcla se agitó suavemente durante la noche. La resina

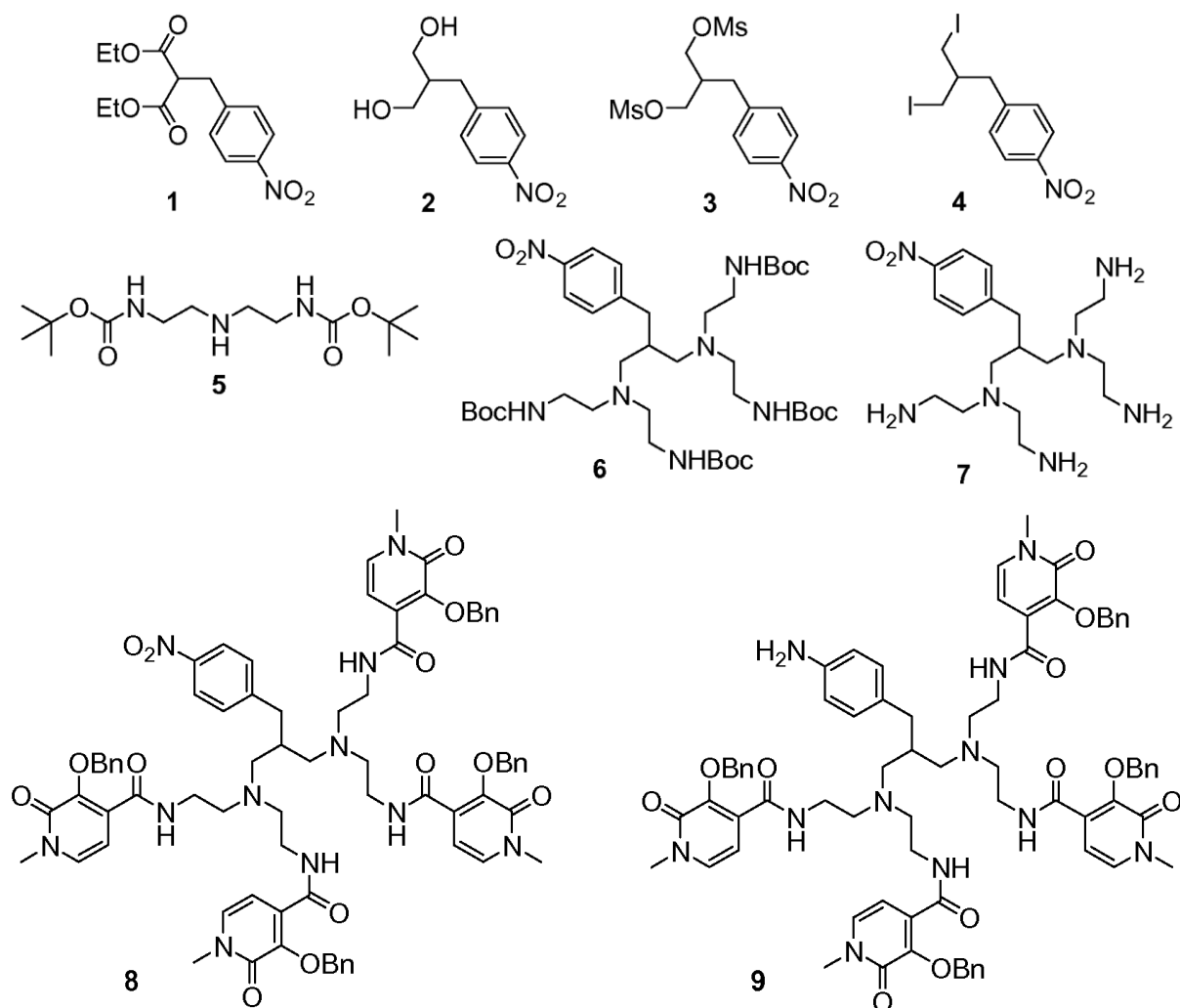
después se separó por filtración y se lavó con hexano (10 ml), tetrahidrofurano (10 ml) y metanol (10 ml), sucesivamente. Esta resina unida a amina se transfirió a solución metanólica de amoníaco 4 M (20 ml) y se agitó suavemente durante 50 minutos. Se añadió tetrahidrofurano (10 ml), para disolver todo el producto desprotegido. La resina se retiró después por filtración, y la solución se evaporó, produciendo **ALG-DEBN-DEBOC (3)** (37 mg).

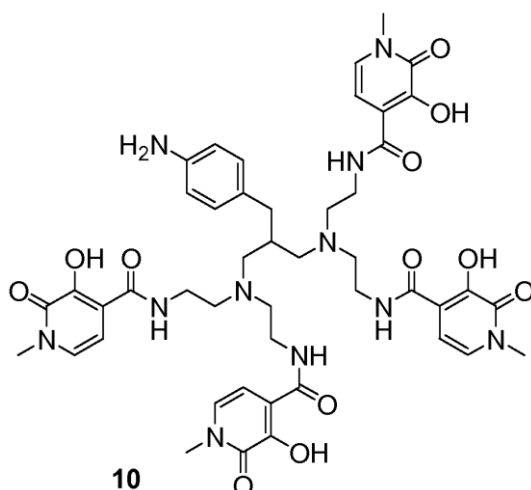
5 MS (ESI, pos):  $m/z$  909  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  931  $[M+Na]^+$

Una suspensión de 40 mg de ALG-DEBN-DEBOC (3) en isopropanol-agua 6:1 (v/v, 7 ml) se hizo reaccionar con una solución de 1,4-fenilendiisocianato (4,1 equiv.) en cloroformo (2,5 ml). Los reactivos se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se retiró una muestra para análisis por MS. Se observaron picos que corresponden a la masa esperada (1100). Se aislaron aproximadamente 95 mg de un sólido marrón claro después de la retirada de los volátiles al vacío. El sólido marrón claro se suspendió en acetonitrilo, y la mezcla se calentó a reflujo durante 15 min. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, seguido de aislamiento de 26 mg de ALG-DD-NCS (**4**) como sólido marrón por filtración.

10

### Ejemplo 3 - Síntesis de Quelante que Contiene 3,2-HOPO Simétrico.





Se cargó hidruro de sodio (60,1 g, como dispersión al 60 % en aceite mineral, 1,5 mol, 5 eq.) en un matraz y se añadió tetrahidrofurano (1 l). Se añadió gota a gota dimetil-malonato (172 ml, 1,5 mol, 5 eq) durante 1,5 h, la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de + 10 °C. La mezcla de reacción se diluyó después con tetrahidrofurano (400 ml). Una solución de bromuro de 4-nitrobencilo (65,0 g, 0,3 mol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (170 ml) se añadió lentamente durante 30 minutos a la mezcla preparada anteriormente bajo agitación vigorosa. Después de 30 minutos de agitación a 0 °C, la mezcla de reacción se vertió en salmuera (solución saturada de NaCl de 1 l) y se dejó agitando durante la noche a temperatura ambiente, produciendo un precipitado blanco. La mezcla entonces se diluyó con éter terc-butílico de metilo, y el precipitado se filtró y disolvió en etanol caliente. La mezcla etanólica se filtró, y el filtrado se concentró a un volumen pequeño, del cual precipitaron 24,8 g (31 %) de (4-nitrobencil)propanodioato de dimetilo (1) como un sólido cristalino blanco.

Pureza por LC: > 90 % (254 nm)

MS (APCI pos)  $m/z$  285,1  $[M+NH_4]^+$

El compuesto 1 (24,8 g, 92,7 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (230 ml) y se añadió el complejo de borano-sulfuro de dimetilo (28,5 ml, 301 mmol, 3,3 eq.). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 24 h, y luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió metanol (250 ml) a 0 °C, se vertió en salmuera (600 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre  $Na_2SO_4$  y se concentraron al vacío. El residuo se co-evaporó con metanol. El producto bruto se purificó por cromatografía instantánea, dando 14,5 g (74 %) de 2-(4-nitrobencil)propano-1,3-diolo (2) como un aceite amarillo.

Pureza por LC:>92 % (254 nm)

El compuesto 2 (10,0 g, 47,3 mmol) se disolvió en diclorometano (100 ml) y se añadió trietilamina (14,5 ml, 104 mmol, 2 eq.). La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió cloruro de metansulfonilo en porciones (8,0 ml, 104 mmol, 2 eq.). La mezcla final se dejó alcanzar a temperatura ambiente durante la noche. Entonces se añadieron trietilamina adicional (1,5 ml) y cloruro de metansulfonilo (0,8 ml), y la agitación se continuó durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano, y el precipitado formado se filtró completamente. El filtrado de diclorometano se lavó con solución acuosa saturada de  $NaHCO_3$ , HCl acuoso 0,5 M y salmuera, se secó sobre  $Na_2SO_4$  y se concentró al vacío, dando 14,5 g (83 %) de 2-(4-nitrobencil)propano-1,3-diolo dimetansulfonato (3) como un aceite naranja, que se usó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Pureza por LC:>87 % (254 nm)

MS (APCI pos)  $m/z$  385,3  $[M+NH_4]^+$

El compuesto 3 (14,5 g, 39,5 mmol) se disolvió en metil-etil-cetona (100 ml), se añadió yoduro de sodio (16,0 g, 107 mmol, 2,7 eq.); y la mezcla se calentó a 95 °C durante 1 h. El precipitado blanco resultante se filtró completamente y se lavó con metil-etil-cetona, y el filtrado se concentró al vacío. El producto bruto se trituró a partir de éter ter-butílico de metilo y se purificó por cromatografía instantánea, dando 10,6 g (63 %) de 1-[3-yodo-2-(yodometil)-propil]-4-nitrobenceno (4) como un sólido amarillo.

Pureza por LC:>90 % (254 nm)

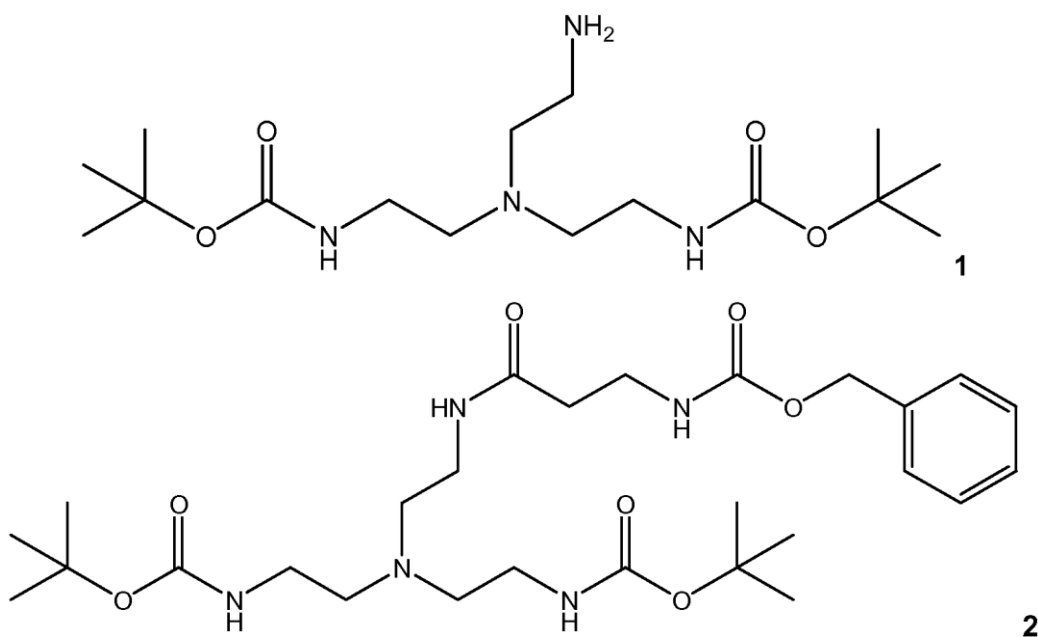
MS (APCI pos)  $m/z$  4310,1  $[M+H]^+$

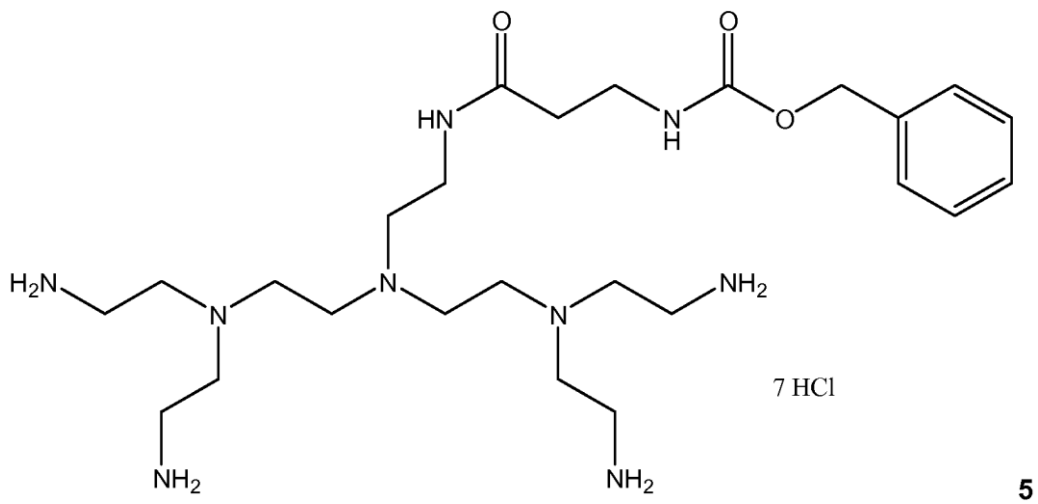
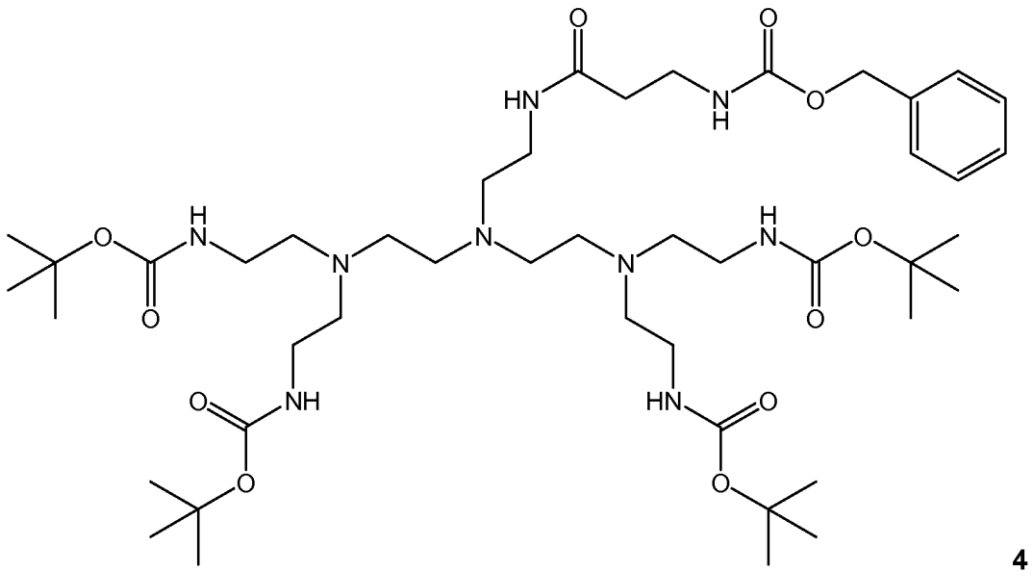
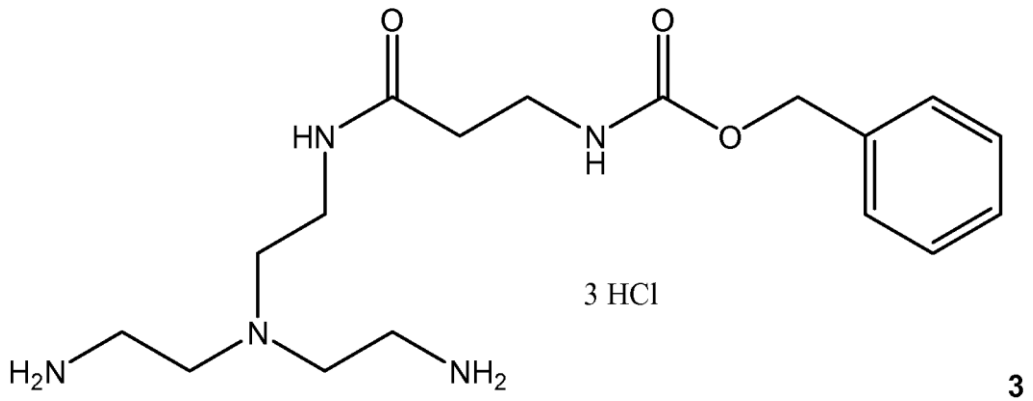
Se disolvieron dietileno-triamina (10,8 ml, 100 25 mmol) y trietilamina (42 ml, 300 mmol, 3 eq.) en tetrahidrofurano (500 ml) y se enfrió en baño de hielo. Entonces se añadió una solución de Boc-ON (49,5 g, 200 mmol, 2 eq.) en tetrahidrofurano (190 ml) gota a gota durante 2,5 h. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 hora adicional, antes de que se dejara alcanzar a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción entonces se concentró al vacío. El residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con NaOH acuoso 1 M. La fase orgánica se secó sobre  $Na_2SO_4$  y se concentró al vacío. El material bruto se purificó por cromatografía instantánea, dando 20,0 g (66 %) de (iminodietano-2,1-diilo)biscarbamato de di-ter-butilo (5) como un aceite viscoso amarillo.

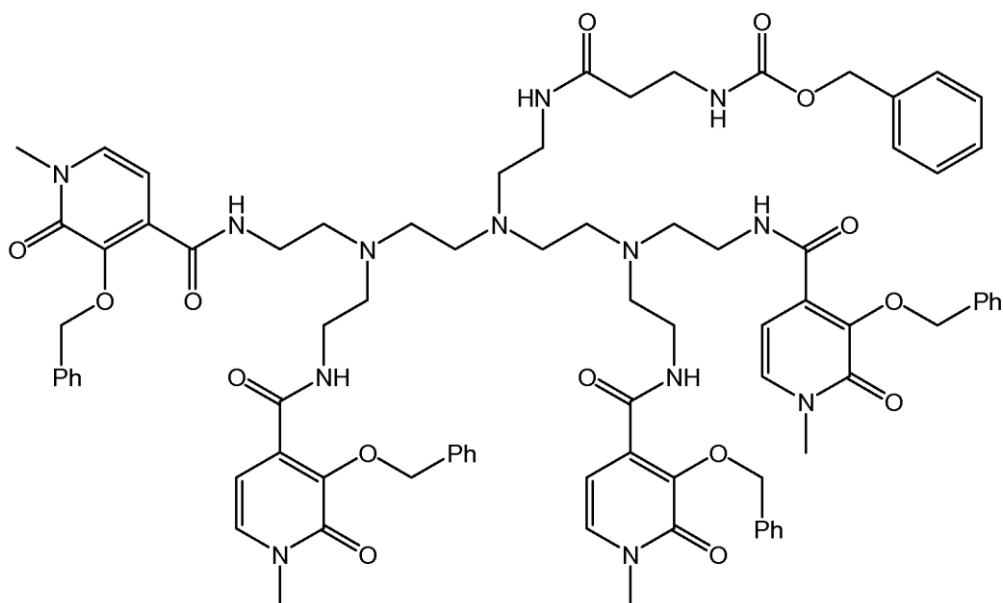
MS (APCI pos)  $m/z$  304,3  $[M+H]^+$

- Se disolvió el compuesto **5** (26,0 g, 86 mmol, 4 eq.) en tolueno seco (40 ml) y se añadió N-etil-morfolina (5,4 ml, 42 mmol, 2 eq.). El compuesto **4** (9,2 g, 21 mmol) se disolvió en tolueno seco (35 ml) y se añadió a la mezcla de reacción. La mezcla se incubó en un reactor a presión a 105 °C durante 5 días. La mezcla de reacción entonces se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>.
- 5 Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía instantánea, dando 11,4 g (70 %) del compuesto **6** como una espuma amarilla sólida.  
Pureza por LC:>96 % (210 nm)  
MS (APCI pos) *m/z* 782,8, [M+H]<sup>+</sup>; 682,7 [M+H-Boc]<sup>+</sup>; 582,6 [M+H-2Boc]<sup>+</sup>; 382,1 [M+H-4BOC]<sup>+</sup>
- 10 El compuesto **6** (2,0 g, 2,6 mmol) se disolvió en dioxano (16 ml), y se añadió una solución 9 M de HCl en dioxano (22 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentró a sequedad al vacío, dando 1,9 g de la sal de HCl del compuesto **7** como un sólido beige.  
MS (APCI pos) *m/z* 382,5 [M+H]<sup>+</sup>
- 15 Se añadió el compuesto **7** (1,9 g, 2,6 mmol) a DMPU (1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona) (9,5 ml) y 3-(benciloxi)-l-metil-4[(2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il)carbonil]piridina-2-(1H)-ona (3,7 g, 10,3 mmol, 4 eq.). Una solución de DBU (2,3 ml, 15,5 mmol, 6 eq.) en DMPU (4,7 ml) entonces se añadió lentamente durante 40 minutos. Se continuó la agitación durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera semi-saturada, luego se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía instantánea para obtener 4,0 g del compuesto **8** como aceite amarillo que se usó en el siguiente paso sin purificación adicional. MS (APCI pos) *m/z* 1347,7 [M+H]<sup>+</sup>
- 20 El compuesto **8** (4,0 g, 2,6 mmol) se disolvió en ácido acético (200 ml) y se añadió Pd(OH)<sub>2</sub> (20 % p/p en C, 50 % humectado) (800 mg, 10 % p/p). La mezcla de reacción se agitó en un reactor a presión Parr a 30 bar de presión de hidrógeno a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción entonces se filtró a través de una almohadilla de Celite®, y el filtrado se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía instantánea, dando el compuesto **9** como un sólido espumoso beige.
- 25 El compuesto **9** (996 mg) se disolvió en ácido acético (5,5 ml), seguido de la adición de HCl 6 M acuoso (2,5 ml) y Pd/C al 5 % (99 mg, 10 % p/p). La mezcla de reacción se agitó en un reactor a presión a 8 bar de presión de hidrógeno durante la noche, y luego se filtró a través de una almohadilla de Celite®. El precipitado se concentró al vacío y se co-evaporó con tolueno y metanol. El residuo se disolvió en metanol y se precipitó por la adición de éter dietílico. El precipitado beige formado se filtró y secó al vacío durante la noche, produciendo 700 mg de la sal de HCl del compuesto **10**, ALG1005-38.  
MS (APCI pos) *m/z* 956,7 [M+H]<sup>+</sup>
- 30

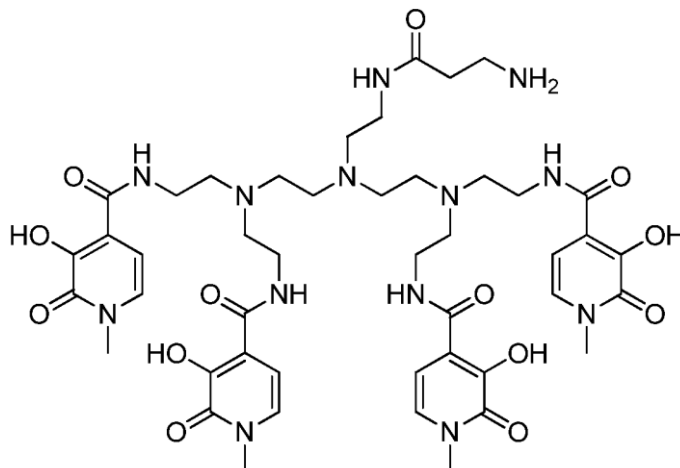
#### Ejemplo 4 - Síntesis de un Quelante que Contiene 3,2-HOPO Simétrico Alternativo.







6



7

5 Se añadió anhídrido de Boc (24,4 g, 119 mmol) en porciones a una solución de imidazol (8,0 g, 117 mmol) en 50 ml de diclorometano a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante una hora. La mezcla de reacción se lavó dos veces con agua 50 ml, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y redujo al vacío. El residuo se disolvió en 20 ml de tolueno y se añadió tris(2-aminoetil)amina (8,19 g, 56 mmol). La mezcla de reacción se agito durante 2 horas a 60 °C y se redujo al vacío. El residuo se disolvió en 125 ml de diclorometano y se lavó con agua (4 veces con 50 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se redujo al vacío. La cromatografía instantánea seca (metanol al 0-15 % en diclorometano con trietilamina al 1 %) produjo (((2-aminoetil)azanediil)bis(etano-2,1-diil))dicarbamato de di-ter-butilo (1) (13,51 g, 39,0 mmol, 70 %) como un aceite incoloro espeso.

10 Los datos espectroscópicos fueron de acuerdo con los datos informados por Frullano y col. (Chem. Eur. J. 2004, 10, 5205-17).

15 Se disolvieron N-Cbz-β-alanina (8,04 g, 36 mmol), 4-(dimetilamino)piridina (4,40g, 36 mmol) y EDC-HC1 (6,90g, 36 mmol) en 25ml de tetrahidrofurano y se agitaron durante 10 minutos antes de que se añadiera el Compuesto 1 (10,4 g, 30 mmol) disuelto en 75ml de tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se agito durante 4 horas y se redujo al vacío. La purificación por cromatografía instantánea seca (tetrahidrofurano al 0 - 40% en diclorometano) produjo (((2-(3-(Cbz-amino)propanamido)etil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil))dicarbamato di-terc-butilo (2) (15,11 g, 27,4 mmol, 91 %) como un aceite ligeramente amarillo muy viscoso.

20 RMN-<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,43 (s, 18H) , 2,42-2,56 (m,8H), 3,04-3,17 (m, 4H), 3,19-3,32 (m, 2H), 3,41-3,57 (m, 2H), 5,08 (s, 2H), 5,22 (bs, 2H) , 5,83 (bs, 1 H) , 7,23 (bs, 1 H) , 7,26-7,43 (m, 5H)

MS (ESI, pos): m/z 574,3[M+Na]<sup>+</sup>

Se disolvió (((2-(3-(Cbz-amino)propanamido)-etil)azanediil)bis(etano-2,1-diil))dicarbamato de di-terc-butilo (10,30 g, 18,7 mmol) en 100 ml de metanol y se añadió gota a gota cloruro de acetilo (25 ml, 0,35 mol). La mezcla de reacción

se agitó durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se redujo a aproximadamente  $\frac{1}{3}$  de volumen al vacío antes de que se añadieron 100 ml de éter, conduciendo a precipitación de un sólido incoloro. Los sólidos se filtraron, se lavaron con éter y se secaron al vacío, dando tri-clorhidrato de (3-((2-(bis(2-aminoetil)amino)etil)amino)-3-oxopropil)carbamato de bencilo (**3**) (8,70 g, 18,7 mmol, ~100 %) como un sólido incoloro.

RMN-<sup>1</sup>H (300MHz, MeOD): 3,19-3,28 (m, 2H), 3,38-3,62 (m, 14H), 5,10 (s, 2H), 7,26-7,39 (m, 5H)  
MS (ESI, pos): m/z 352,2[M+H]<sup>+</sup>

Se añadió trietilamina (6,75ml, 48,4 mmol) a una suspensión del Compuesto **3** (10,56 g, 11,4 mmol) en 320 ml de tetrahidrofurano y 320 ml de N,N-dimetilformamida a temperatura ambiente. Se añadió *N*-boc-2-aminoacetaldehído (16,0 g, 100,5 mmol) y triacetoxiborohidruro de sodio (32,00 g, 151 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 20 horas. Se añadieron 200 ml de salmuera y 500 ml de cloroformo, las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con 3 x 100 ml de cloroformo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con 100 ml de salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y redujeron al vacío. La cromatografía instantánea (metanol al 0 – 10 % en diclorometano) produjo (((2-3-Cbz-aminopropanamido)etil)-azanodiil)bis(etano-2,1- diil)bis(azanetriil)tetrakis(etano-2,1-diil)tetracarbamato de tetra-terc-butilo (**4**) (3,40 g, 3,7 mmol, 32 %) como un sólido amarillo.

MS (ESI, pos): m/z 946,7[M+Na]<sup>+</sup>

El Compuesto **4** (3,40 g, 3,7 mmol) se disolvió en 60 ml de metanol y se añadió gota a gota cloruro de acetilo (12 ml, 0,17 mol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla se redujo a aproximadamente 10 ml al vacío y se añadieron 50 ml de acetonitrilo, conduciendo a precipitación. El sólido se filtró, se lavó con acetonitrilo y se secó al vacío, dando hepta-clorhidrato de (3-((2-(bis(2-aminoetil)amino)-etil)amino)etil)amino)-3-oxopropil)carbamato de bencilo (**5**) (2,88 g, 3,7 mmol, ~100 %) como un sólido incoloro.

RMN-<sup>1</sup>H (300MHz, MeOD): 2,44-2,61 (m, 2H), 2,68- 3,00(m, 4H), 3,08-3,40(m, 16H), 3,44-3,52(m, 4H), 3,54-3,77(m, 6H), 5,12(s, 2H), 7,30-7,47(m, 5H)  
MS (ESI, pos): m/z 524,5[M+H]<sup>+</sup>

Se añadieron trietilamina (2,52 ml, 18,1 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (12 mg, cat.) a una suspensión del Compuesto **5** (0,81 g, 1,04 mmol) y 3-(benciloxi)-l-metil-4-(2- tioxothiazolidina-3-carbonil)piridina-2(1H)-ona (1,50g, 4,16 mmol) en 180ml de Diclorometano. La mezcla de reacción se agito durante la noche y se redujo al vacío. La cromatografía instantánea (metanol al 0 - 10 % en diclorometano) produjo (1- (3-(benciloxi)-l-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-4-il)-5-(2- (3-(benciloxi)-l-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridina-4- carboxamido)etil)-8-(2-(bis(2-(3-(benciloxi)-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridina-4-carboxamido)etil)amino)etil)-1,12-dioxo-2,5,8,11-tetraazatetradecan-14-il)carbamato de bencilo (**6**) (673 mg, 0,45 mmol, 43 %) como un sólido marrón claro.

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDC<sub>3</sub>): 2,10-2,40(m, 20H), 3,02-3,21 (m, 10H), 3,32-3,46(m,2H), 3,50(s, 12H), 4,99(s, 2H), 5,25(s, 8H) , 5,95 (bs, 1 H) , 6,62(d, 7,17Hz, 4H) , 7,01 (d, 7,17Hz, 4H), 7,15-7,40(m, 25H), 7,89(bs, 4H)  
RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDC<sub>3</sub>): 11,48, 35,71, 37,18, 37,35, 37,50, 37,66, 46,18, 51,55, 52,15, 52,82, 53,28, 66,34, 74,64, 74,75, 77,43, 104,63, 127,90, 127,94, 128,40, 128,65, 128,75, 128,94, 130,81, 132,32, 136,27, 136,76, 146,19, 156,45, 159,51, 163,30, 171,31  
MS (ESI, pos): m/z 766,9 [M+2Na]<sup>2+</sup>

El Compuesto **6** se disolvió y se desbenciló esencialmente como se describe en el **Ejemplo 2**, produciendo Bb-1-HOPO-1-DEBN (7).

### Ejemplo 5 - Experimentos de quelación con ALG-DD-NCS

Se preparó una solución de reacción al disolver ALG-DD-NCS sólido (**4** en el **Ejemplo 2**) en DMSO (Biotech grado solvente 99,8%) a 1 mg/ml.

Se llevaron a cabo reacciones de **quelación** con diferentes metales al mezclar la solución de reacción de 1 mg/ml con soluciones seleccionadas de metales, usando una relación de ligando a metal de 3:2. Los iones metálicos para prueba que vienen de lo siguiente: solución de <sup>232</sup>Th en HNO<sub>3</sub> al 2% (Perkin Elmer Pure Plus) , solución de Fe<sup>3+</sup> en HNO<sub>3</sub> al 2 % (Perkin Elmer Pure Plus), e InCl<sub>3</sub> (polvo anhidro 99,999+ %, Aldrich) se disolvieron en HCl 0,01 M. Los reactivos se dejaron reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente, antes de inyectar 5 l de la mezcla de reacción en un CL-EM para análisis.

Los resultados mostraron que los complejos de metal-ALG-DD-NCS se formaron de manera cuantitativa para los metales <sup>232</sup>Th<sup>4+</sup>, Fe<sup>3+</sup> y In<sup>3+</sup>. Los cromatogramas de CL-EM y los espectros de los complejos <sup>232</sup>Th-ALG-DD-NCS, Fe-ALG-DD-NCS y In-ALG-DD-NCS se muestran en las Figuras 1-6,

Las condiciones de CL-EM fueron como sigue: se realizó la separación en una columna Acquity UPLC BEH C18 columna de 1,7 μm, de 2,1 x 50 mm, a 50 °C, usando ácido fórmico al 0,05 % en H<sub>2</sub>O como fase móvil A y ácido fórmico al 0,05 % en acetonitrilo como fase móvil B. La composición gradiente y el flujo se muestran en la Tabla 3.



Tabla 3.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% A	% B
0,0	0,6	95	5
2,0	0,6	95	5
9,0	0,8	40	60
9,1	0,8	10	90
10,0	0,8	10	90
10,1	0,8	95	5
11,4	0,8	95	5
11,5	0,6	95	5
12,0	0,6	95	5

Se realizó el análisis espectrocópico de masa en un instrumento Xevo.ToF-1, usando un intervalo másico de adquisición de ~450-1950 Da, una molaridad ES+, una capilaridad de 3,0 kV, explorando sobre 1,000 segundos con un voltaje de cono de 20 V.

#### Ejemplo 6 - Experimentos de quelación con ALG1005-38

Se preparó una solución concentrada al disolver ALG 1005-38 (10 en Ejemplo 3) en MeOH (grado LC-MS) a 10 mg/ml. La solución concentrada a 10 mg/ml se diluyó con MeOH y tampón de NaOAc 0,5 M (pH 5,5) en proporciones de 1:8:1, para obtener 1 mg/ml de solución de reacción de ALG 1005-38. Se llevaron a cabo reacciones de quelación con diferentes metales al mezclar la solución de reacción de 1 mg/ml con los metales seleccionados, como se especifica en el Ejemplo 5 y además GaCl<sub>3</sub> (cuentas anhidras 99,99%, Aldrich) disuelto en HCl 0,01 M, dando relaciones del ligando a metal de 3:1 a 1:2. Los reactivos se dejaron reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla de reacción se diluyó 10 veces con ácido fórmico (0,1%) antes de inyectar 5 µl en un LC-MS para análisis. El análisis de separación por LC-MS se realizó como se describe en el Ejemplo 5, excepto que el voltaje de cono fue de 35 V.

Los resultados mostraron que los complejos metal- ALG 1005-38 se formaron en cantidades significativas para metales tal como <sup>232</sup>Th<sup>4+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, In<sup>3+</sup> y Ga<sup>3+</sup>. Los espectros y cromatogramas LC-MS de los complejos <sup>232</sup>Th-ALG 1005-38, Fe-ALG 1005-38, In-ALG 1005-38 y Ga-ALG 1005-38 se muestran en las Figuras 7-14.

#### Ejemplo 7 - Experimento de quelación con Bb-1-HOPO-1-DEBN

Se preparó una solución madre al disolver Bb-1-HOPO-1-DEBN (producido en el Ejemplo 4) en DMSO (Biotech grado solvente 99,8%) a 1 mg/ml. Se llevó a cabo un experimento de quelación al mezclar la solución a 1 mg/ml con <sup>232</sup>Th en HCl 0,01 M (Perkin Elmer) como se especifica en el Ejemplo 5. El análisis de separación por CL-EM se realizó como se describe en el Ejemplo 6. Los resultados mostraron que el complejo <sup>232</sup>Th-Bb-1-HOPO-1-DEBN esperado se formó rápidamente, Figuras 15 y 16.

#### Ejemplo 8 - Conjugación de ALG-DD-NCS a trastuzumab, marcación del conjugado con torio-227 y confirmación de unión retenida a diana

##### Conjugación

Se usó un grado farmacéutico del anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin<sup>MR</sup>, Roche). El anticuerpo se intercambió con un tampón en NaCl al 0,9 % a una concentración de 6,3 mg/ml. Se preparó una solución concentrada de ALG-DD-NCS en DMSO, que contiene 1 mg/ml (sin tomar en cuenta las impurezas). La solución concentrada de DMSO se añadió a la solución anticuerpo que corresponde a una relación molar de quelante a anticuerpo de 6,5:1, o menos. Se añadió una solución de bórax 0,07 M a la solución de reacción para dar pH 9 después de la incubación a 37 °C durante la noche. El conjugado resultante se purificó e intercambio con tampón en una unidad filtros centrifuga Amicon Ultra-4 (30k MWCO). Las alícuotas de 1 mg en 100 de NaCl al 0,9 % se congelaron y almacenaron a -18 °C hasta el uso.

##### Marcación

Se añadieron 100 µl de tampón de NaOAc 0,5 M (pH 5,5) a un frasco de 1 mg de conjugado de ALG-DD-NCS-trastuzumab para obtener un pH adecuado para la marcación. Esta solución se mezcló con 4,2-16,4 MBq <sup>227</sup>Th en HCl 0,01 M, y el pH se verificó con papel pH. La tapa del tubo Eppendorf se envolvió en una hoja de aluminio y el tubo se colocó en un termomezclador a temperatura ambiente durante 15 minutos con mezclado suave.

El tubo se incubó adicionalmente a temperatura ambiente durante 5 minutos después de añadir 10 µl de DTPA saturado en MF-H<sub>2</sub>O, se propuso capturar el torio-227 libre restante. El resultado se purificó en una columna NAP-45 usando PBS para eluir el conjugado de ALG-DD-NCS-trastuzumab marcado, dejando la mayoría de radionúclidos libres (torio- 227 y núclidos hijo) y quelato de DTPA-torio en la columna.

- 5 La columna y las fracciones eluidas se midieron en un detector HPGe GEM(15) para determinar los rendimientos de reacción y la actividad específica del compuesto. La fracción del producto se filtró estéril y se almacenó a 4 °C durante la noche.

Antes del uso se realizó una segunda purificación en columna NAP-5 de la fracción del producto.

Determinación de la fracción inmunorreactiva

- 10 Se cultivaron células SK-OV-3 (ATCC) en condiciones normales. Se prepararon células SK-OV-3 fijas y se examinaron por Citometría de flujo antes del uso para confirmar la presencia de HER2 en la superficie (datos no mostrados). Se preparó medio regular con medio McCoy's 5A (GIBCO) adicionado con FBS al 10 % (PAA) y Pen/Strep (BioChrom). Se realizó la incubación de las células en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % usando matraces celulares T25 (25 cm<sup>2</sup>) y T75 (75 cm<sup>2</sup>).

- 15 Se realizó cada experimento por duplicado. Células SK-OV-3 fijas se suspendieron en PBS y se transfirieron a tubos Eppendorf (10 millones de células/tubo). Se añadió trastuzumab no conjugado (Herceptina<sup>MR</sup>, 10 µl de la solución concentrada) a los dos tubos de referencia, y la reacción de bloqueo se llevó a cabo a 37 °C durante 30 minutos. Se añadieron cantidades iguales de <sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-trastuzumab (ca 500 cpm) a cada tubo, seguido por incubación a 37 °C durante 2,5 horas. Las muestras se diluyeron con PBS, seguido por centrifugación y transferencia de la mitad del sobrenadante a nuevos tubos Eppendorf. Todos los tubos se midieron durante 5 minutos en un contador gamma Wizard y la cantidad de torio-227 se determinó al aplicar un protocolo para <sup>227</sup>Th.

- 20 La unión en % se calculó como: 100\* [(P+MS) (MS)]/[(P+MS) + (MS)], donde P y S son las actividades medidas en el sedimento celular y en el sobrenadante, respectivamente. El cálculo se realizó en las muestras no bloqueadas para obtener la unión total (%) y las muestras bloqueadas para obtener la unión no específica (%), y se calcula el IRF como: IRF (%) = unión total (%) - unión no específica (%).

25 Los datos de este control de calidad, resumidos en la Tabla 4, muestran que <sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-trastuzumab se une a las células diana o diana.

**Tabla 4: Resultados para control de calidad realizados en lotes A y B de Th-ALG-DD-NCS-trastuzumab, posteriormente usados en Ejemplos 9 y 10 respectivamente**

	Rendimiento (%) <sup>i</sup>	Recuperación (%) <sup>ii</sup>	Actividad específica (Bq/µg) <sup>iii</sup>	IRE promedio (%) <sup>iv</sup>	Unión Total promedio (%) <sup>iv</sup>	Unión no específica promedio (%) <sup>iv</sup>
Lote A	60	95	10 166	65	84	20
Lote B	64	92	2700	60	74	15

i. Rendimiento (%) se calcula después de la purificación de NAP-5 de la mezcla de reacción.  
 ii. la recuperación (%) se calcula después de una nueva purificación de NAP-5 de la fracción de producto.  
 iii. Se calcula la actividad específica (Bq/µg) usando la cantidad de <sup>227</sup>Th (Bq) encontrada en la fracción de producto dividida por la cantidad de ALG-DD-NCS-trastuzumab (µg) usada en la mezcla de reacción.  
 iv. IRF se estima de acuerdo con procedimientos

30

**Ejemplo 9 - Estudios de Estabilidad y eficiencia in vitro de ALG-DD-NCS-trastuzumab marcado con torio-227**

Valoración de unión con el paso del tiempo

- 35 Se evaluó la estabilidad de la unión a células SK- OV-3 para la construcción <sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-trastuzumab al medir la cantidad de actividad de <sup>227</sup>Th asociada a sedimentos de células SK-OV-3 durante 7 días. Los resultados se compararon a datos obtenidos después de la incubación con <sup>227</sup>Th libre.

- 40 Se cultivaron células SK-OV-3 como se describe en el Ejemplo 8 y se trataron inicialmente con 700 kBq de <sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-trastuzumab o 700 kBq de <sup>227</sup>Th libre, dando por resultado respectivamente 77 kBq (11%) y 7 kBq (1%) de actividad <sup>227</sup>Th en el sedimento celular después de 1 hora de incubación (HPGe-detector GEM(50)). La actividad de <sup>227</sup>Th en células SK-OV-3 se midió diariamente usando el contador gamma Wizard (protocolo para <sup>227</sup>Th). La radioactividad medida se corrigió para descomposición. Los resultados presentados en la Figura 17 muestran que solo el 20% de la actividad que permanece con el sedimento después de 1 hora se pierde durante los siguientes 7 días. En contraste, las células tratadas con <sup>227</sup>Th libre señalado solo a una pequeña fracción de la actividad adicionada, y se perdió la mayoría de esta (aproximadamente 95%) durante las siguientes 24 horas. De esta manera, no hay unión específica de <sup>227</sup>Th libre a células SK-OV-3, en tanto que se retuvo de manera eficiente <sup>227</sup>Th-ALG- DD-NCS-trastuzumab.

45

Valoración de citotoxicidad

Se investigó el efecto en el crecimiento de células tumorales en dos ensayos complementarios. El primer experimento, se midió la actividad metabólica en células usando un reactivo luminiscente que se une a moléculas de ATP. De esta manera, una señal disminuida de luminiscencia indica pérdida de actividad metabólica. En el segundo experimento, se contó el número de colonias formadas.

Se midió la luminiscencia diariamente durante 9 días, y los resultados de la exposición a  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab se compararon a la luminiscencia de células SK- OV-3 expuestas a trastuzumab y  $^{227}\text{Th}$  libre, respectivamente. Se usaron como control células SK-OV-3 que crecen en medio regular.

En el día 0, se transfirieron 35 ml de 500 000 células SK-OV-3/ml en medio regular a 4 matraces celulares T75, Estos matraces celulares se usaron para preparar las siguientes soluciones de muestra: (1) Medio regular, (2) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de trastuzumab, (3) 20 kBq/ml de  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS- trastuzumab (10166 Bq/ $\mu\text{g}$ ), (4) 20 kBq/ml de  $^{227}\text{Th}$  libre. Los matraces se incubaron en una incubadora de  $\text{CO}_2$  durante 1 hora. Los sobrenadantes se descartaron, y las células se tripsinizaron con solución de Tripsina-EDTA al 0,25 %, se lavaron con medio regular y se centrifugaron. Los sedimentos celulares se suspendieron en medio regular fresco y se midieron en un contador gamma Wizard (protocolo para  $^{227}\text{Th}$ ). Cada solución de incubación se distribuyó en 7 nuevos matraces celulares T25, y se incubó en una incubadora de  $\text{CO}_2$ .

En los días 1 y 2 se descartaron los sobrenadantes de un matraz de cada una de las cuatro soluciones de muestra. Los sedimentos celulares se prepararon como en el día 0 y se midió la radioactividad en un contador gamma Wizard (protocolo para  $^{227}\text{Th}$ ) y un detector HPGe GEM (50). Todas las muestras se diluyeron 4 veces en medio regular, y 5 x 100  $\mu\text{l}$  de cada suspensión celular se transfirieron a 5 concavidades de un placa View 96, Se añadieron cinco concavidades con 100  $\mu\text{l}$  de medio regular (sin células) para mediciones de luminiscencia de fondo. Finalmente, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de reactivo Cell Titer-Glo a cada concavidad, y las soluciones se mezclaron en un agitador orbital para inducir lisis. La señal de luminiscencia se dejó estabilizar a temperatura ambiente durante 10 minutos, entonces se midió la luminiscencia tres veces en un lector de placa múltiple Envision, usando el programa LUM-individual.

En el día 3, se prepararon las células y se hicieron mediciones en un contador gamma Wizard y lector de placa múltiple Envision, como se describe para el día 1-2, Entonces, cada suspensión celular se diluyó debido al crecimiento celular denso; se transfirieron % de suspensión celular a un nuevo matraz de células T75, se añadió medio regular y se incubó en una incubadora de  $\text{CO}_2$  durante la noche.

En cada uno de los días 4-9 los cuatro matraces celulares T75 se tripsinizaron con solución de Tripsina-EDTA al 0,25%, se lavaron con medio regular y se centrifugaron. Los sedimentos celulares se diluyeron 4 veces en medio regular, y se tomaron porciones de 100  $\mu\text{l}$  y se realizaron las mediciones como antes. Entonces, se diluyeron tres de las cuatro de las suspensiones celulares en medio regular, se transfirieron a nuevos matraces celulares T75 y se incubaron en una incubadora de  $\text{CO}_2$  durante la noche.

La Figura 18 muestra las mediciones de luminiscencia en células SK-OV-3 tratadas con  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD- NCS-trastuzumab (10166 Bq/ $\mu\text{g}$ ), trastuzumab y  $^{227}\text{Th}$  libre, normalizadas a valores de luminiscencia obtenidos para células SK-OV-3 que crecen en medio regular (control). Las señales de luminiscencia para células SK-OV-3 tratadas con  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab disminuyeron gradualmente del día 1 al día 9, en tanto que los otros tratamientos mostraron señales de luminiscencia casi constante y crecimiento durante este periodo. La actividad metabólica de las células SK-OV-3 tratadas con  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab disminuyó con el tiempo, y el día nueve casi todas las células estuvieron muertas. Este resultado indica un efecto citotóxico significativo sostenido de  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS- trastuzumab.

Se realizó un ensayo clonogénico para evaluar el crecimiento de colonias celulares después de la exposición de células individuales en condiciones potencialmente citotóxicas. Se incubaron células SK-OV-3 en diferentes concentraciones de  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab, trastuzumab o  $^{227}\text{Th}$  libre durante 1 hora, seguido de incubación durante 12 días para inducir el crecimiento de la colonia.

Se realizó la preparación de células como antes, y en cada muestra se transfirieron 12000 células en 5 ml de medio regular a un matraz de T25. El efecto de 3 cantidades de cada reactivo se investigó para  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab y  $^{227}\text{Th}$ , 5, 10 y 20 kBq/ml, y para trastuzumab 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , (concentraciones finales) respectivamente. Se preparó un matraz de control. Los 10 matraces celulares T25 se incubaron en una incubadora de  $\text{CO}_2$  durante 1 hora. Los sobrenadantes se descartaron, y las células se lavaron en medio regular, se tripsinizaron con solución de Tripsina-EDTA al 0,25 %, se lavaron con medio regular y se centrifugaron. Los sedimentos celulares se suspendieron en medio regular, y cada una de las diez suspensiones celulares se dividió en 6 nuevos matraces celulares T25; 3 matraces celulares a 1000 células y 3 matraces celulares a 3000 células. Los 60 matraces celulares T25 resultantes se incubaron en una incubadora de  $\text{CO}_2$  hasta que las colonias alcanzaron un tamaño visible (aproximadamente 50 células/colonia). Después de la incubación durante 12 días, se retiró el medio. Las células se lavaron con PBS, se fijaron con etanol, se tiñeron con Azul de Tripano al 0,25 % en PBS, se lavaron con agua de grifo y finalmente se secaron a 45 °C durante la noche. Las colonias se contaron manualmente, y el número promedio de colonias en cada solución de incubación se representó gráficamente.

Los resultados mostrados en las Figuras. 19 y 20 muestran que la incubación de 1 hora con  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab aniquiló de forma eficiente células SK-OV-3, La incubación con  $^{227}\text{Th}$  libre puede tener algún efecto de muerte celular, no aparente en el primer ensayo de citotoxicidad donde se usó un gran número de células. La incubación con trastuzumab no tiene efecto negativo en el crecimiento celular.

#### 5 Ejemplo 10 - Selección de diana tumoral *in vivo* de ALG-DD- NCS-trastuzumab marcado con torio-227

Se inyectaron 100  $\mu\text{l}$  (15 kBq) de  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS- trastuzumab filtrado estéril (2700 Bq/ $\mu\text{g}$ ) en la vena de cola lateral de diez ratones desnudos Balb/c que tienen xenoinjertos SdK-OV-3, Se sacrificaron cinco ratones después de 24 horas y los otros cinco después de 4 días, y se cortaron y pesaron los órganos de interés. Todas las muestras y 3 soluciones normales que contienen ID al 10 %/g se midieron durante 5 minutos en un contador gamma Wizard (protocolo para  $^{227}\text{Th}$ ). Los resultados se expresaron como % de dosis inyectadas por tramo de tejido (% de ID/g).

Los resultados mostrados en la Figura 21 soportan que  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab se une específicamente al tumor. Los valores de captación fueron moderados, pero se aumentaron algo entre la captación de 24 horas y 4 días (de 8,7 % de ID/g a 11,3 % de ID/g), en tanto que la concentración en sangre disminuyó aproximadamente 1 % de ID/g.

La captación en el cráneo y fémur también se aumentó algo entre 24 horas y 4 días, pero estos valores en general fueron bajos (2,8-3,2 %, 24 h), indicando muy poco  $^{227}\text{Th}$  libre que circula en el sistema, y sugiriendo de este modo un alto grado de estabilidad del complejo  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab. El soporte adicional para esta conclusión se presta por la alta probabilidad que una fracción de la actividad medida en el cráneo y fémur se provoca por captación del núclido hijo  $^{223}\text{Ra}$ . Algo de este  $^{223}\text{Ra}$  se puede detectar dentro de la ventana cerrada especificada para mediciones de  $^{227}\text{Th}$  en un contador gamma Wizard, por lo tanto, los valores calculados de % de ID/g para cráneo y fémur pueden sobreestimados de la cantidad de  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS- trastuzumab acumulada en estos tejidos.

#### Ejemplo 11 - Preparación de una porción quelante

Preparación de 3-benciloxi-1-metil-4-(2-tioxotiazolidin-1- il)carbonil-2(1H)-piridinona (Estructura A).

25 Etapa 1) - 1-Metil-3-hidroxi-2(1H)-piridinona:

Se colocaron 3-hidroxi-2(1H)-piridinona (34,44 g, 0,31 mol) y yodometano (75 g, 0,53 mol) en un recipiente de teflón con tapa de 80 ml, y se calentaron a 150 °C durante aproximadamente 48-60 horas en una bomba Parr. La bomba enfriada se abrió y se decantó el exceso de yodometano. El aceite oscuro espeso resultante se mezcló con sulfito de sodio (64 g, 0,5 moles) y se disolvió en 300 ml de agua para formar una solución marrón pálido. La solución se neutralizó a pH 7-8 y se filtró para remover las impurezas insolubles. El filtrado entonces se extrajo con cloruro de metileno (4x100 15 ml). Los extractos combinados entonces se secaron, se aplicaron a un tapón de gel de sílice instantáneo (6cm.x 8 cm) y se eluyeron con metanol al 4 % en cloruro de metileno. El solvente se retiró para dar el compuesto del título (24,3 g, 62,6 %) como cristales incoloros.

Etapa 2- 4-Carboxi-1-metil-3-hidroxi-2(1H)-piridinona

35 Se mezcló 1-metil-3-hidroxi-2(1H)-piridinona (1) (6,25 g, 50 mmol) con carbonato de potasio anhidro (36 g, 0,26 mol) y se secó al vacío. La mezcla entonces se calentó a 175-185 °C durante 3 días en una bomba Parr bajo gas de dióxido de carbono seco (850 libras/pul<sup>2</sup> (59,76 kg/cm<sup>2</sup>)). La bomba enfriada se abrió y el sólido amarillo pálido resultante se disolvió en agua con hielo y se acidificó con HC1 6N para producir un producto cristalino beige.

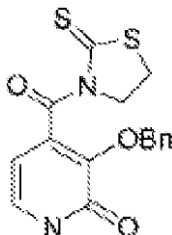
Etapa 3 - 3-Benciloxi-4-carboxi-1-metil-2(1H)-piridinona

40 Se mezcla 4-Carboxi-1-metil-3-hidroxi-2(1H)- piridinona (6,8 g, 0,04 mol) con cloruro de bencilo (12,1 g, 0,088 mol) y carbonato de potasio anhidro (13,8 g, 0,1 mol) en dimetil-formamida anhidra (DMF) (120 ml). La mezcla se calienta en la oscuridad bajo nitrógeno a 75- 80 °C durante 16 horas. La mezcla resultante entonces se filtra y el solvente se evapora para producir un aceite oscuro. El aceite se purifica por aplicación a un tapón de gel de sílice (6 cm.x 8 cm) y elución con metanol al 4 % en cloruro de metileno que da por resultado 3-benciloxi-4- benciloxicarbonil-1-metil-2(1H)-piridinona como un aceite espeso amarillo pálido. Esto se toma en metanol (50 ml) y solución de NaOH 6M (10 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, seguido por evaporación a sequedad. El residuo se disolvió en agua (100 ml), y se acidificó con solución de HC1 6M a pH 2 para dar el compuesto del título (9,3 g 88,7 %), como un producto cristalino blanco.

Etapa 4 - 3-benciloxi-1-metil-4-(2-tioxotiazolidin-1-il) carbonil-2(1 H)-piridinona

50 A una solución de 3-benciloxi-4-carboxi-1-metil-2(1H)-piridinona (1,05 g, 4 mmol), 2- mercaptotiazolina (0,50 g, 4,2 mmol) y una cantidad catalíticas de 4- dimetilaminopiridina (DMAP) en diclorometano seco (50 ml), se adiciona N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,86 g, 4,2 mmol). Después de la agitación durante 4 horas, los sólidos de diciclohexilurea (DCU) se retiran por filtración. El filtrado amarillo entonces se evapora de forma giratoria para proporcionar un sólido amarillo. La cristalización de isopropanol-cloruro de metileno da el compuesto del título

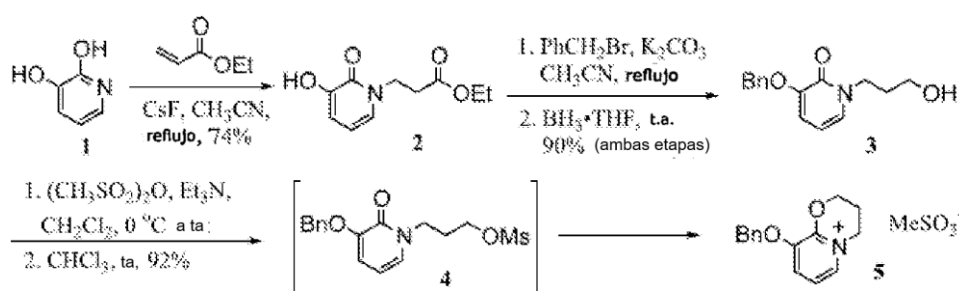
(Estructura A, 1,16 g, 80,4%) como placas cristalinas amarillas brillosas.



Estructura A

### Ejemplo 12 - Preparación de precursor de 3,2-HOPO para fórmula VIII (referencia)

5 La preparación de la sal cíclica (Estructura 5) se hace de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



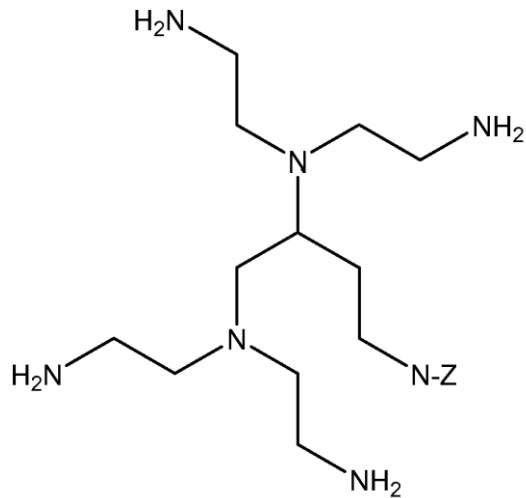
10 La reacción de Michael asistida con fluoruro de cesio (10 % en mol) de 2,3-dihidropiridina (2,3-DHP) **1** con acrilato de etilo en acetonitrilo a reflujo da el éster **2** correspondiente en buenos rendimientos. La O-bencilación posterior de **2** usando condiciones normales  $K_2CO_3$ /acetonitrilo/reflujo seguido de reducción de la porción de éster ( $BH_3 \cdot HF$ , temperatura ambiente) da el alcohol **3** en 90 % de rendimiento después de la cromatografía. El tratamiento del alcohol **3** con anhídrido metansulfónico en diclorometano en la presencia de trietilamina conduce directamente a la formación de la sal cíclica deseada **5** (~ 85-90 %) junto con algo del mesilato intermedio **4** (~ 10-15 %), como se determina por análisis espectral de  $RMN-^1H$ . Se puede lograr la conversión completa a la sal cíclica **5** al agitar la mezcla de producto bruto de la mesilación en cloroformo a temperatura ambiente. Después de la trituración con acetato de etilo caliente, se aisló la sal **5** como un sólido blanco pálido en 92 % de rendimiento en alta pureza.

### Ejemplo 13 - Preparación de compuesto de fórmula VIII (referencia)

20 Se adiciona la sal **5** (0,2 g) a 1,2 equivalentes de cicleno (1,4,7,10-tetraazaciclododecano) en presencia de trietilamina en acetonitrilo (3 ml) y se calentó a 60 °C durante 2 días en nitrógeno. La reacción entonces se diluyó con diclorometano (50 ml) y se lavó con  $NaHCO_3$  saturado (50 ml). La capa acuosa se extrajo una vez más con diclorometano (25 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron con sulfato de sodio, el solvente se retiró al vacío y se retiró el exceso de N-metilbencilamina mediante destilación al vacío para dar VIII.

### Ejemplo 14 - Preparación del compuesto de fórmula IX

25 A una solución de 3-benciloxi-1-metil-4-(2-tioxotiazolidin-1-il)carbonil-2(1H)-piridinona en cloruro de metileno, se añadió la correspondiente N,N,N',N'-tetrakis(2-aminoetil)etilenediamina Funcionalizada (Estructura B, siendo Z un grupo protector). Después de la agitación durante cuatro horas, la mezcla se filtró y se llevó a sequedad.



Estructura B

5 El producto precursor protegido con bencilo apropiado se aislara de la mezcla de reacción en una columna de sílice instantánea con propanol en cloruro de metileno. El producto final con la estructura IX estará disponible después de la desprotección acida de los grupos hidroxilo.

#### Ejemplo 15

10 La estructura VIII (referencia) se conjugará a una molécula dirigida a diana usando procedimientos normales para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, se preparará el éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y se conjugara a proteínas y péptidos usando condiciones normales y la proteína conjugada resultante se aislará usando filtración en gel.

#### Ejemplo 16

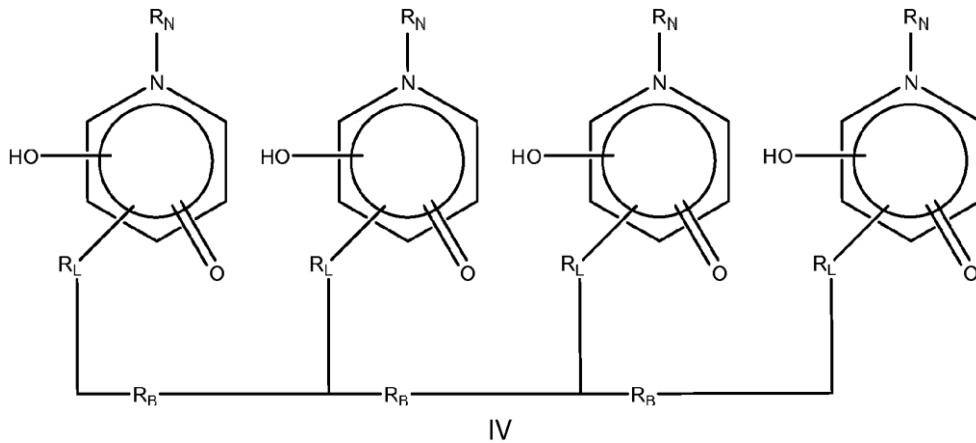
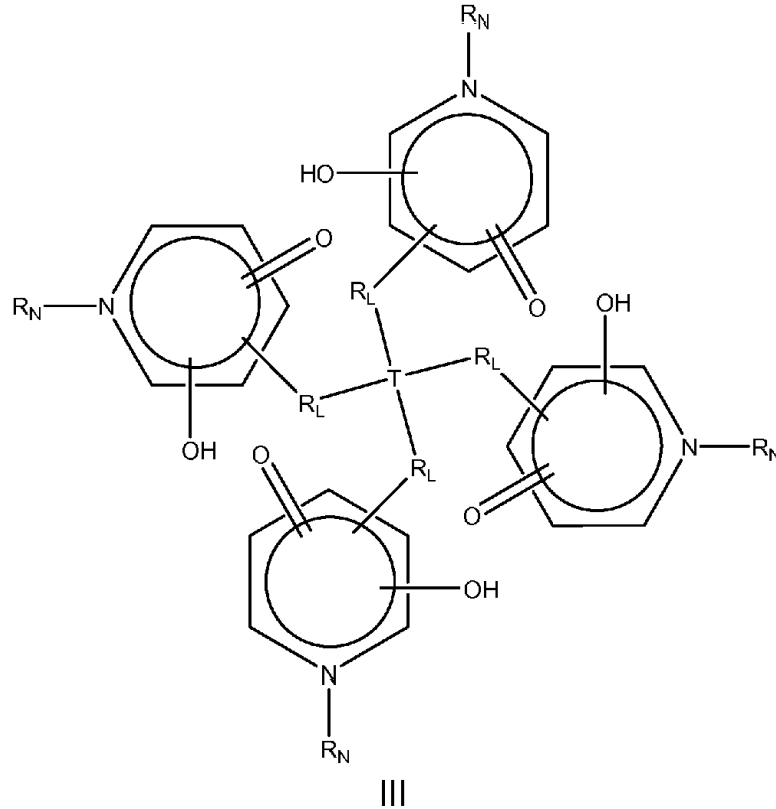
Marcación con Torio-227 de la proteína conjugada

15 Una solución de 10 mg/ml de la proteína conjugada (que tiene un ligando octadentado unido por medio de una porción de acoplamiento) se producirá en una solución tampón adecuada, por ejemplo, tampón de NaOAc 0,5 M (pH 5,5), y se marca con torio-227 purificado a 25 °C durante 1 hora seguido de una etapa de purificación en una columna de filtración en gel.

REIVINDICACIONES

1. Un complejo dirigido a diana de tejido que comprende

- una porción dirigida a diana de tejido seleccionada de anticuerpos, construcciones de anticuerpo, fragmentos de anticuerpos, construcciones de fragmentos o una mezcla de los mismos, péptido, aminoácido, hormona esteroidea o no esteroidea, folato, estrógeno, testosterona o biotina,
- un ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona de fórmula III o IV

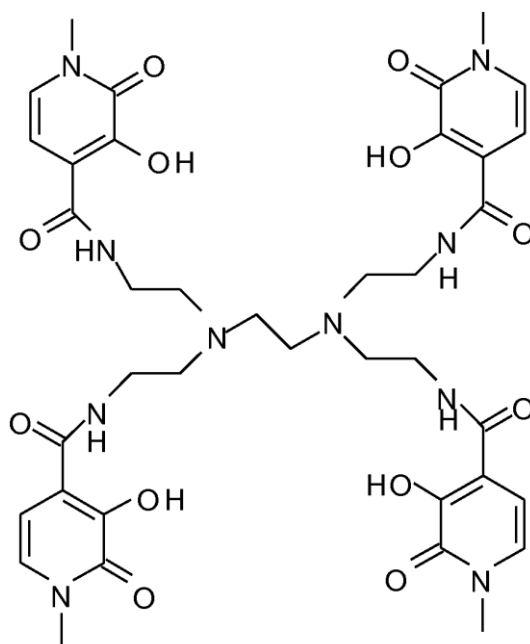


en las que  $R_N$  es un grupo hidrocarburo sustituido o no sustituido;

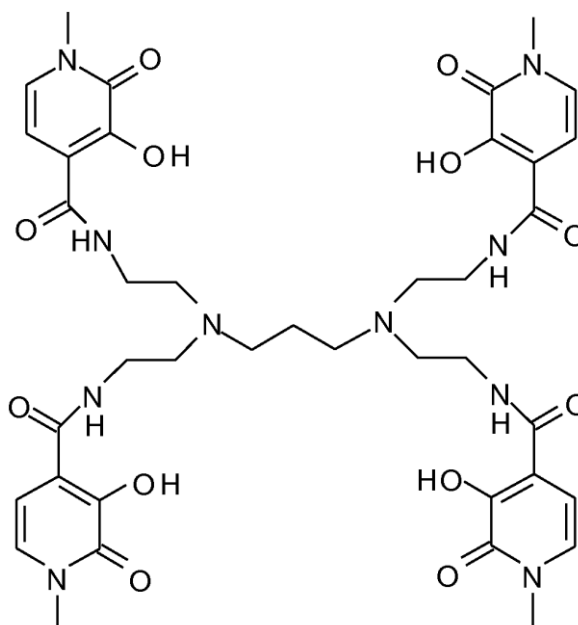
en las que  $R_L$  es una fracción enlazadora,  $R_B$  es una fracción de cadena principal y T es un grupo de plantilla que une cada uno de los cuatro restos de hidroxipiridinona quelantes mediante sus grupos enlazadores,

- una fracción de acoplamiento que une el ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona al resto que marca como diana y
- el ion 4+ del radionúclido alfa-emisor de torio-227.

2. El complejo como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona se selecciona de las fórmulas VI y VII:



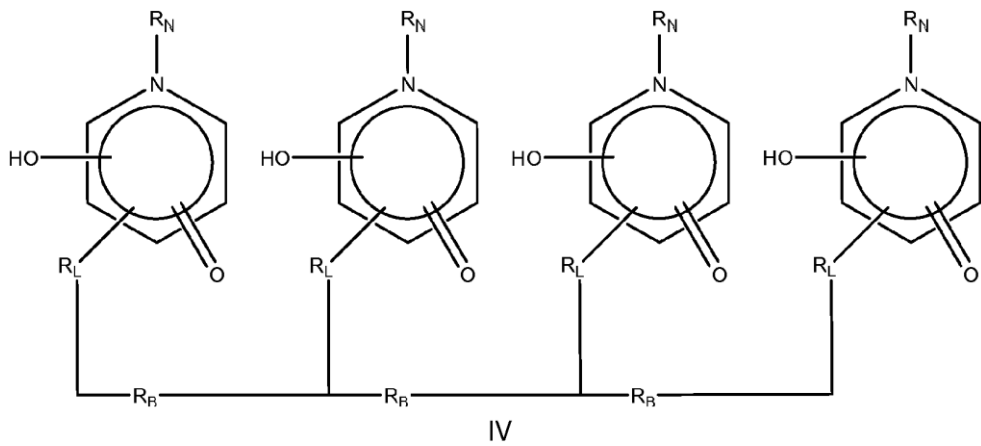
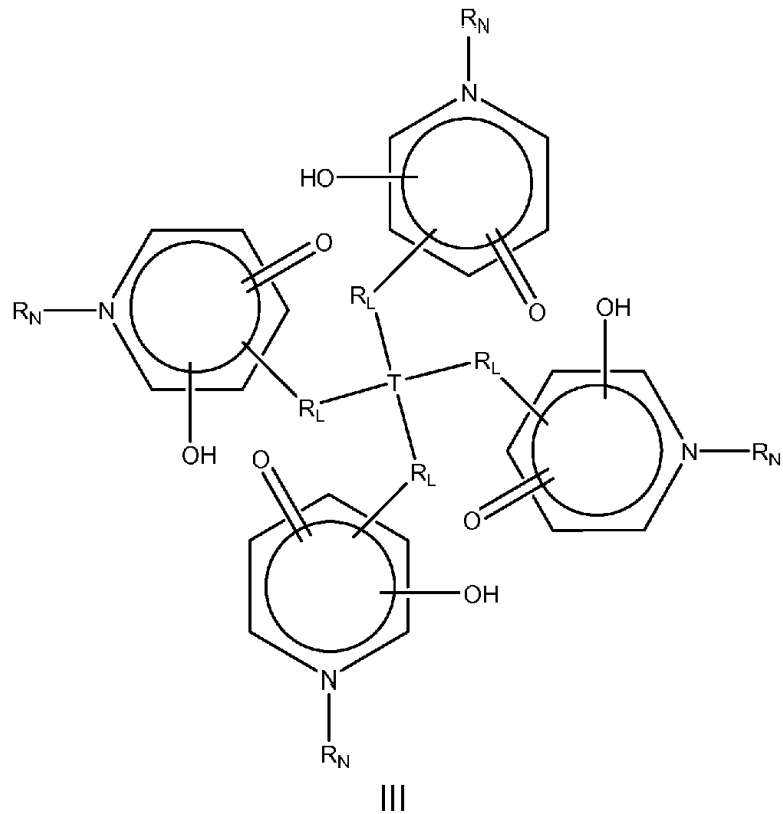
VI



VII

3. Uso de un complejo dirigido a diana de tejido como se define en la reivindicación 1 o 2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad hiperplásica o neoplásica.
- 5 4. Uso como se reivindica en la reivindicación 3 en el que dicha enfermedad es un carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia, linfoma o cáncer tipo mixto.
5. Una composición farmacéutica que comprende un complejo dirigido a diana de tejido como se define en la reivindicación 1 o 2 junto con al menos un vehículo o excipiente farmacéutico.
- 10 6. Un kit que comprende una porción dirigida a diana de tejido seleccionada de anticuerpos, construcciones de anticuerpo, fragmentos de anticuerpos, contracciones de fragmentos o una mezcla de los mismos, péptido, aminoácido, hormona esteroidea o no esteroidea, folato, estrógeno, testosterona o biotina, conjugada a través de una fracción de acoplamiento a un ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona de fórmula III o IV





5 en las que  $R_N$  es un grupo hidrocarburo sustituido o no sustituido;  
 en las que  $R_L$  es una fracción enlazadora,  $R_B$  es una fracción de cadena principal y T es un grupo de plantilla que une cada uno de los cuatro restos de hidroxipiridinona quelantes mediante sus grupos enlazadores y que incluye un ion  $4+$  del radionúclido alfa-emisor de torio-227.

7. El complejo dirigido a una diana de tejido como se define en cualquier reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de enfermedad hiperplásica o neoplásica.

10 8. El complejo dirigido a una diana de tejido para su uso como se reivindica en la reivindicación 7 en el que dicha enfermedad es un carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia, linfoma o cáncer tipo mixto.

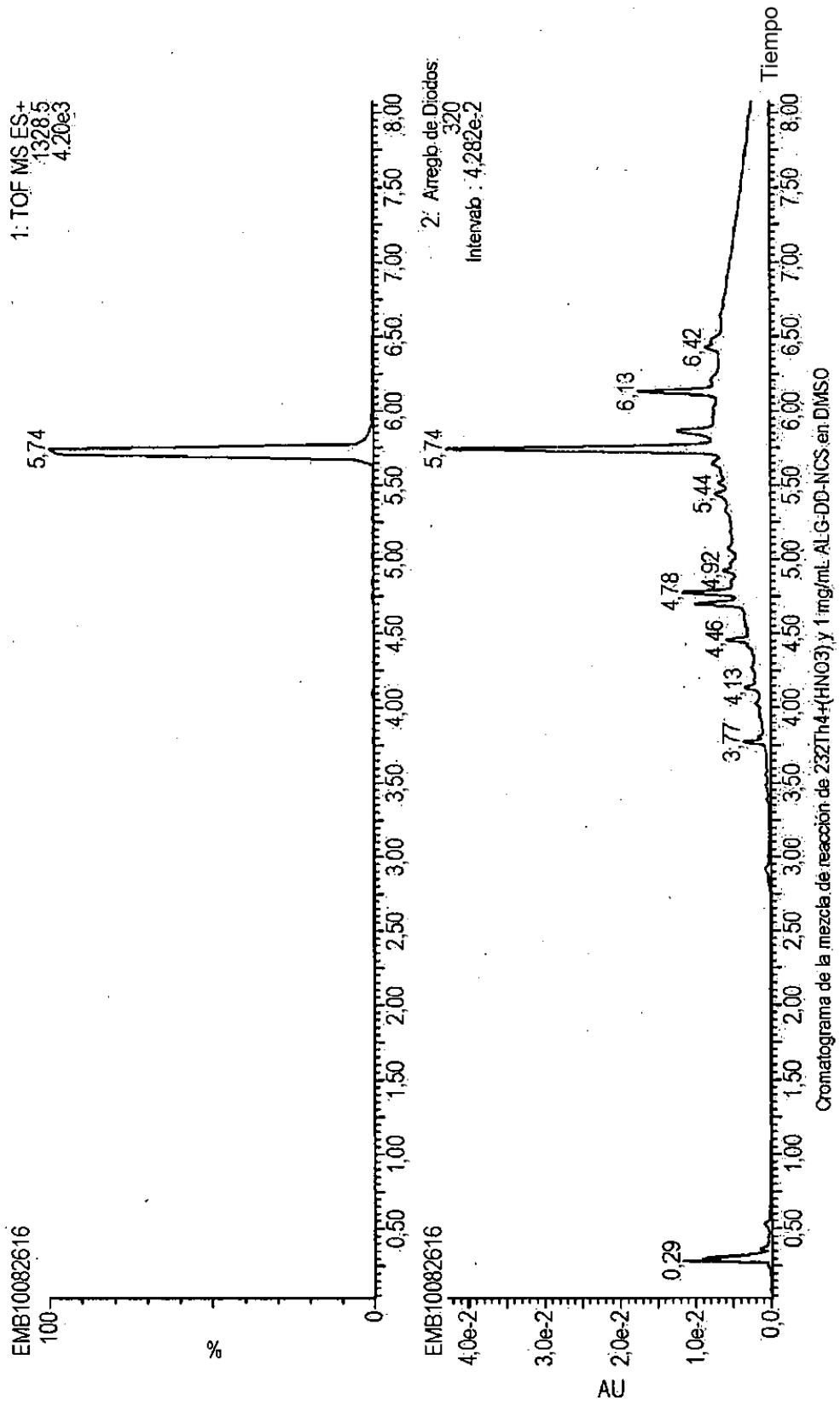


FIG. 1

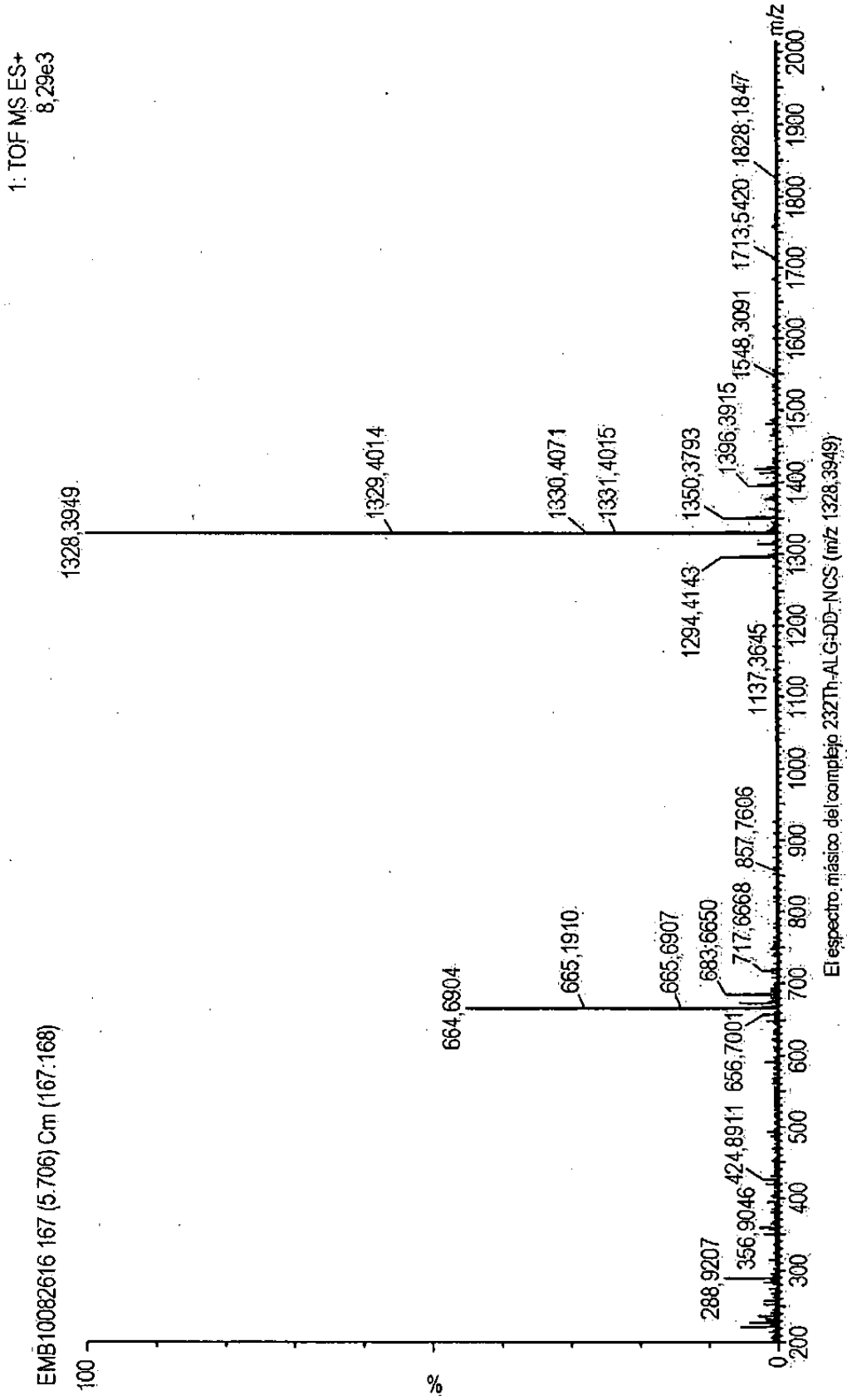
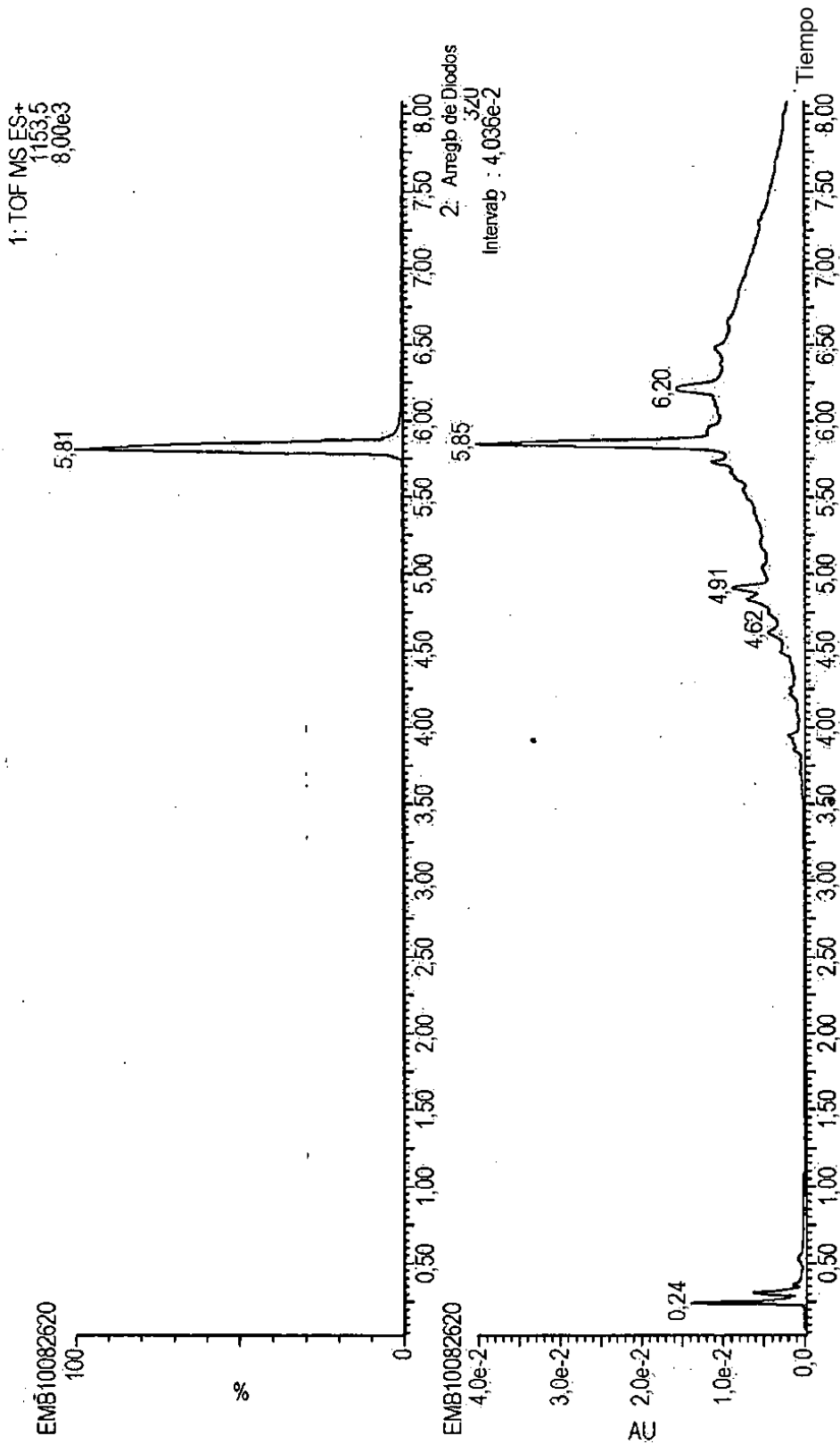


FIG. 2



Cromatograma de la mezcla de reacción de Fe3+(HNO3) y 1 mg/mL ALG-DD-NCS en DMSO

FIG. 3

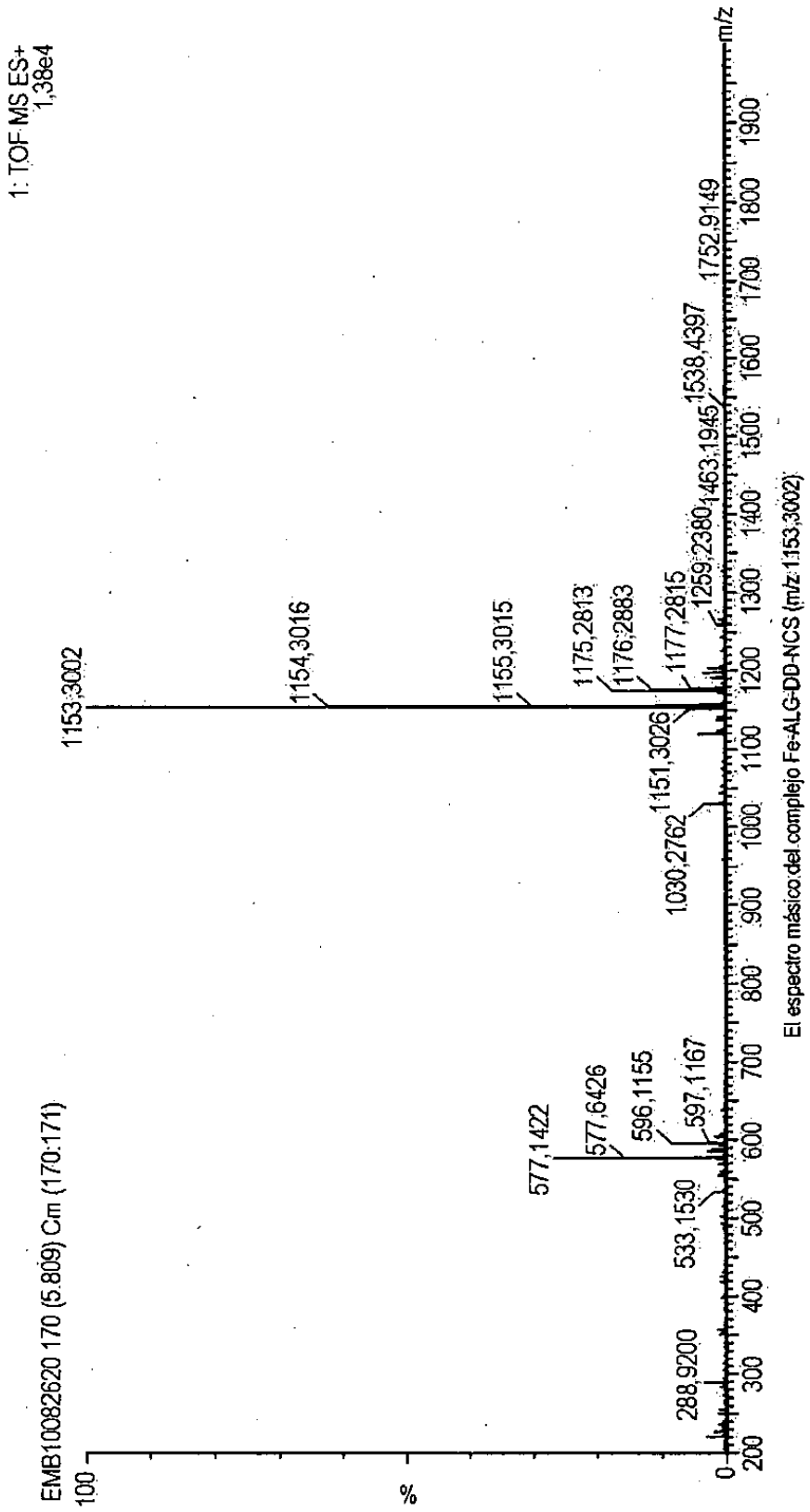
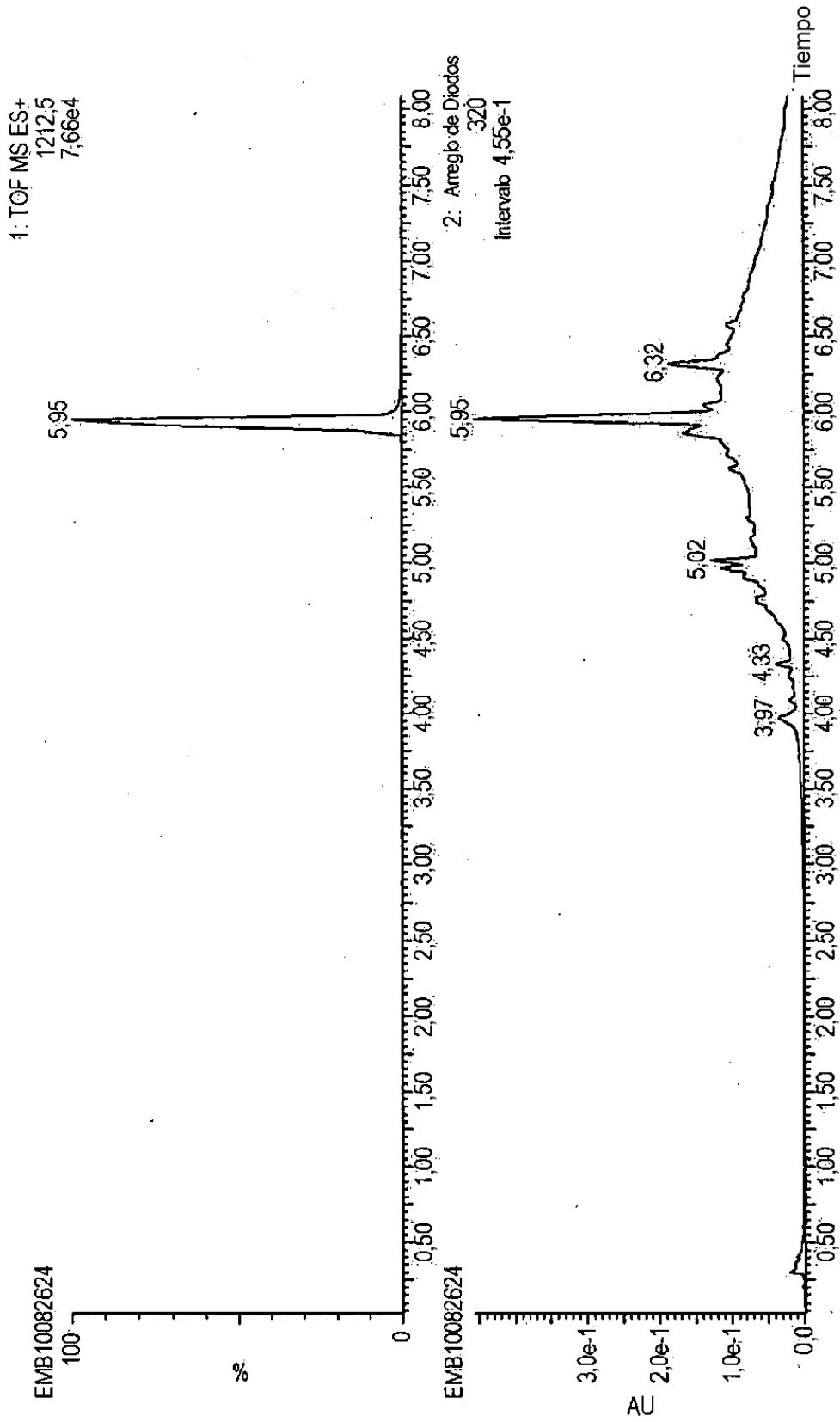


FIG. 4



Cromatograma de la mezcla de reacción de In3+(HCl) y 1 mg/mL ALG-DP-NCS en DMSO.

FIG. 5

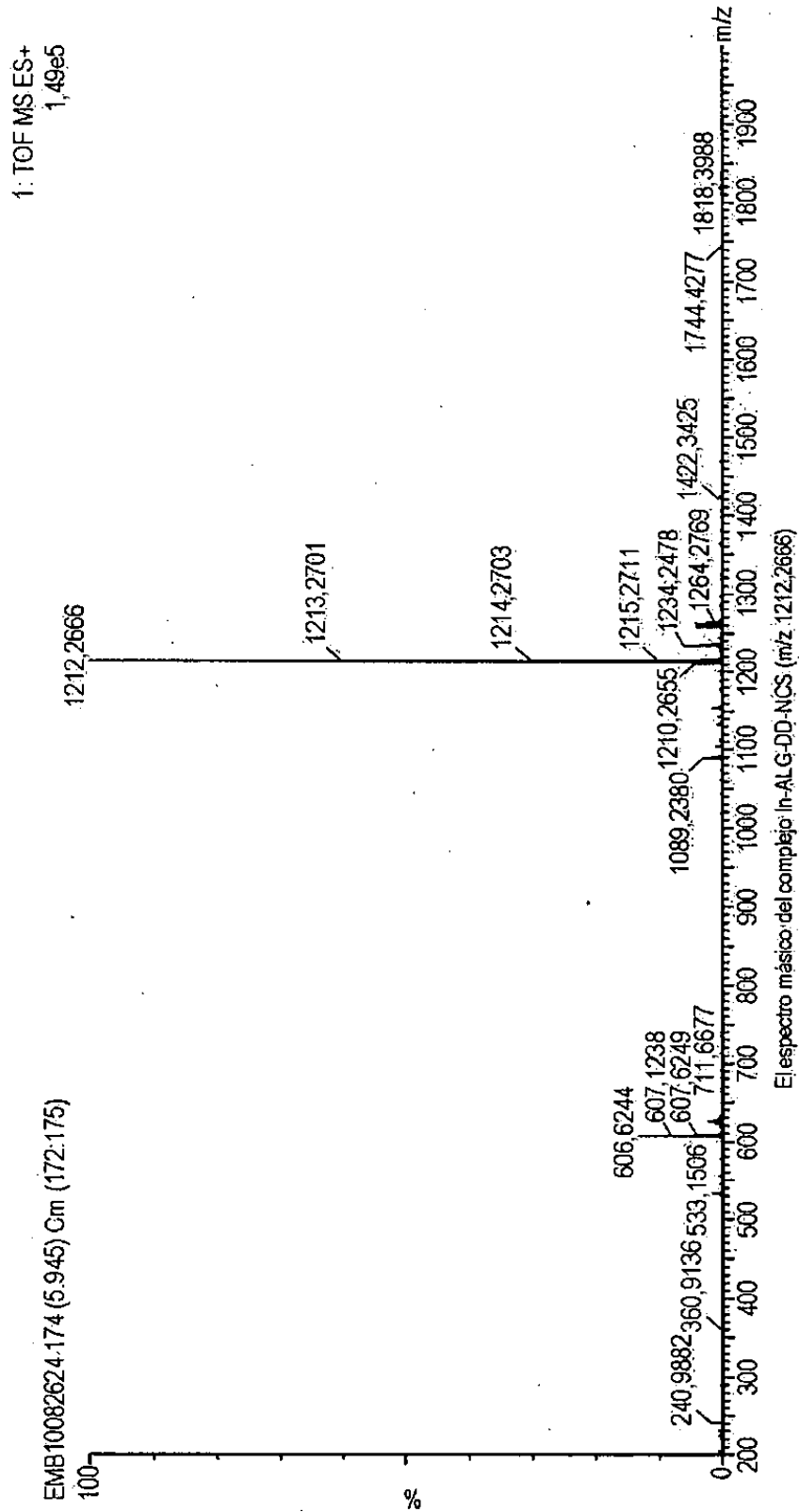
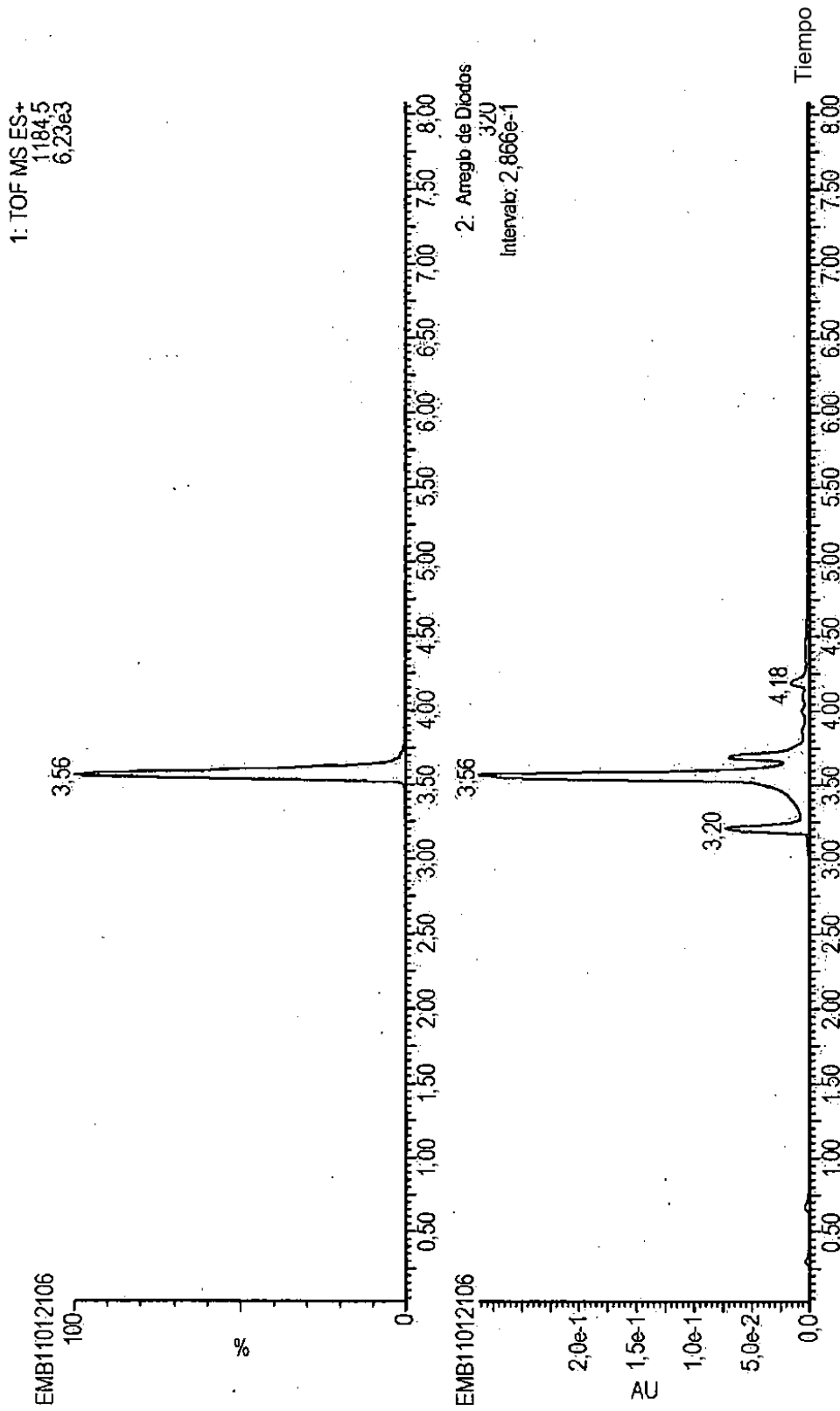


FIG. 6



Cromatograma de la mezcla de reaccion de  $^{232}\text{Tl}^{4+}$ -( $\text{HNO}_3$ ) y 1 mg/mL ALG1005:38 en amortiguador de acetato

FIG. 7



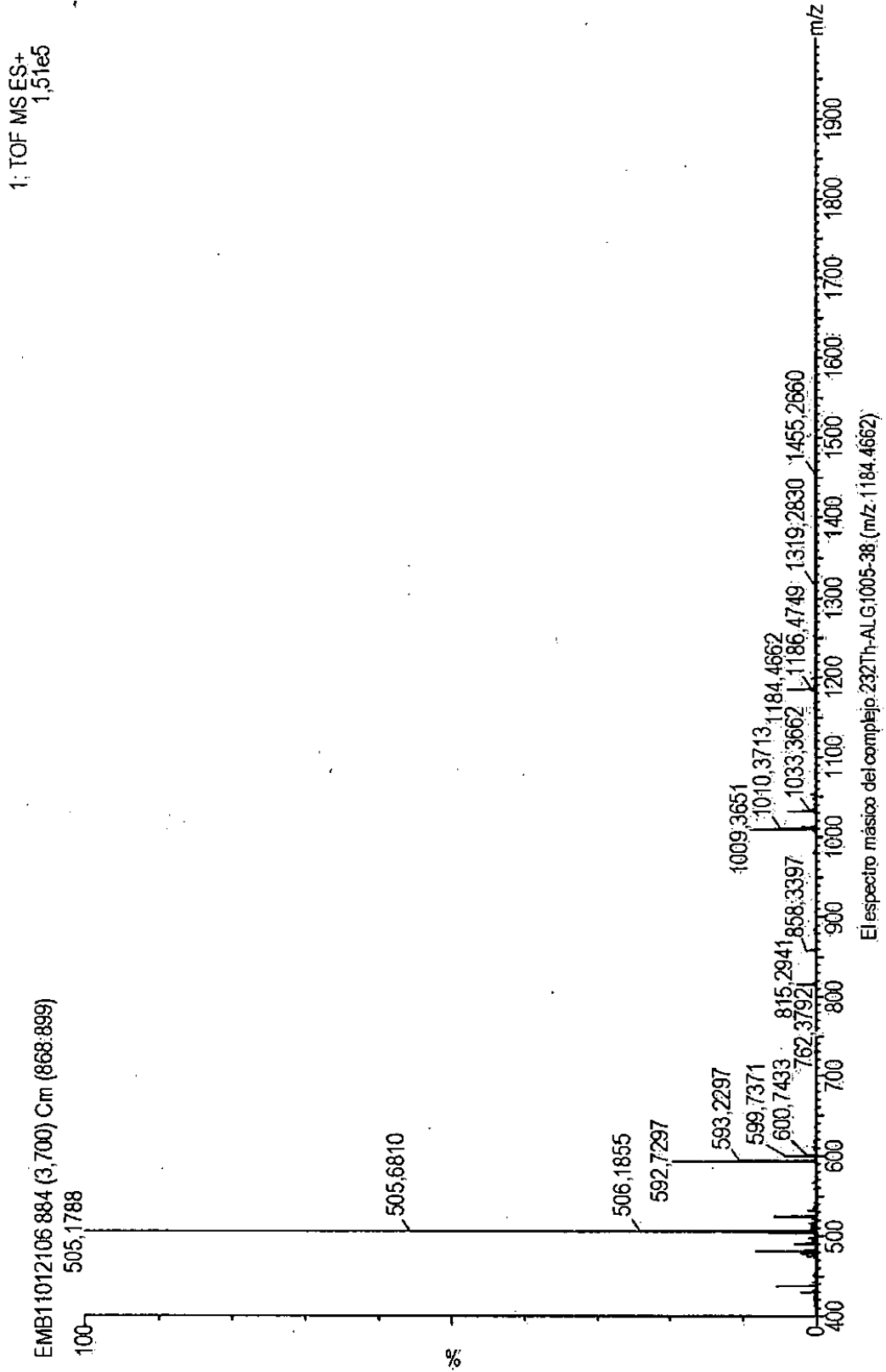


FIG. 8

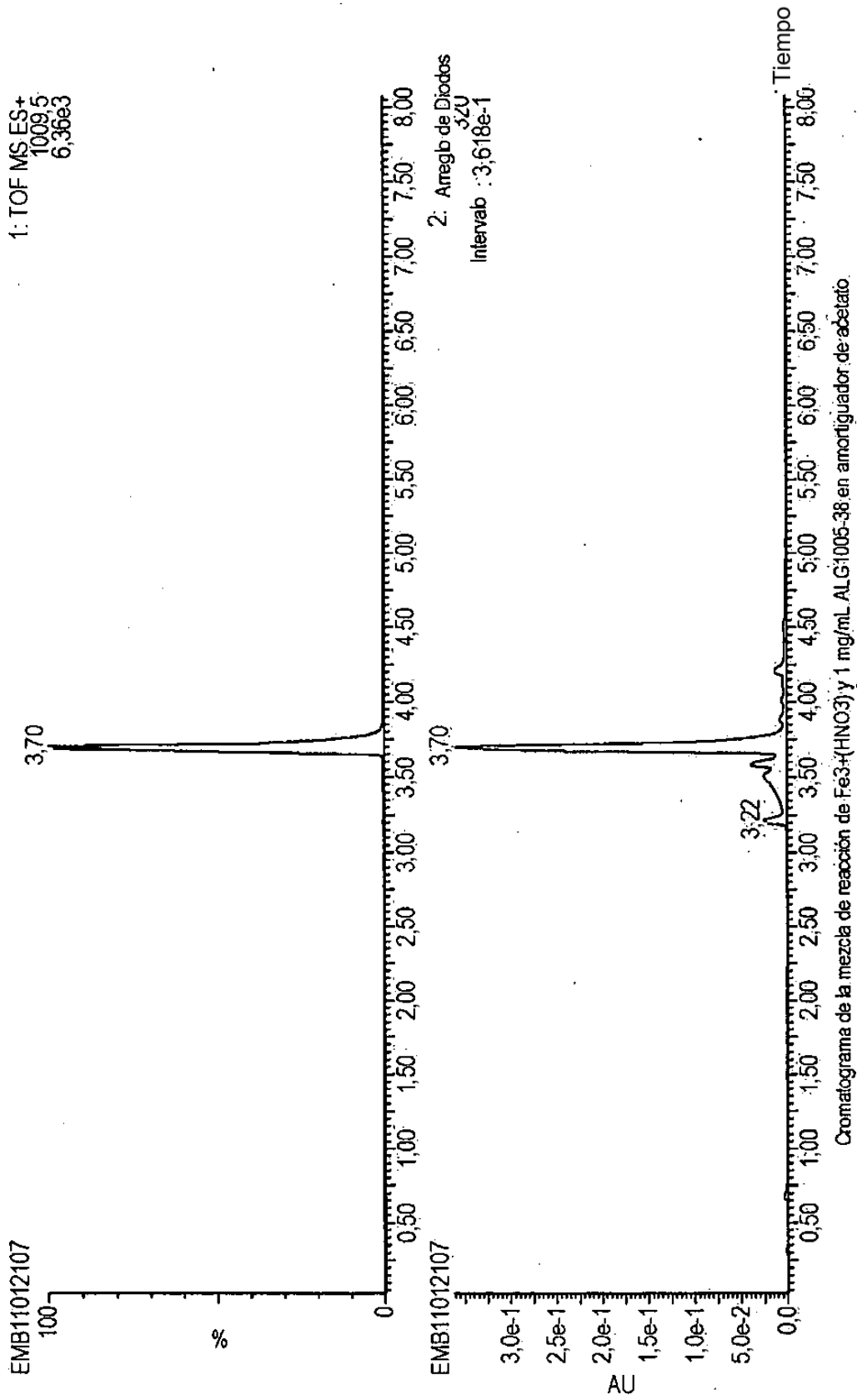


FIG. 9

1: TOF MS ES+  
6,17e5

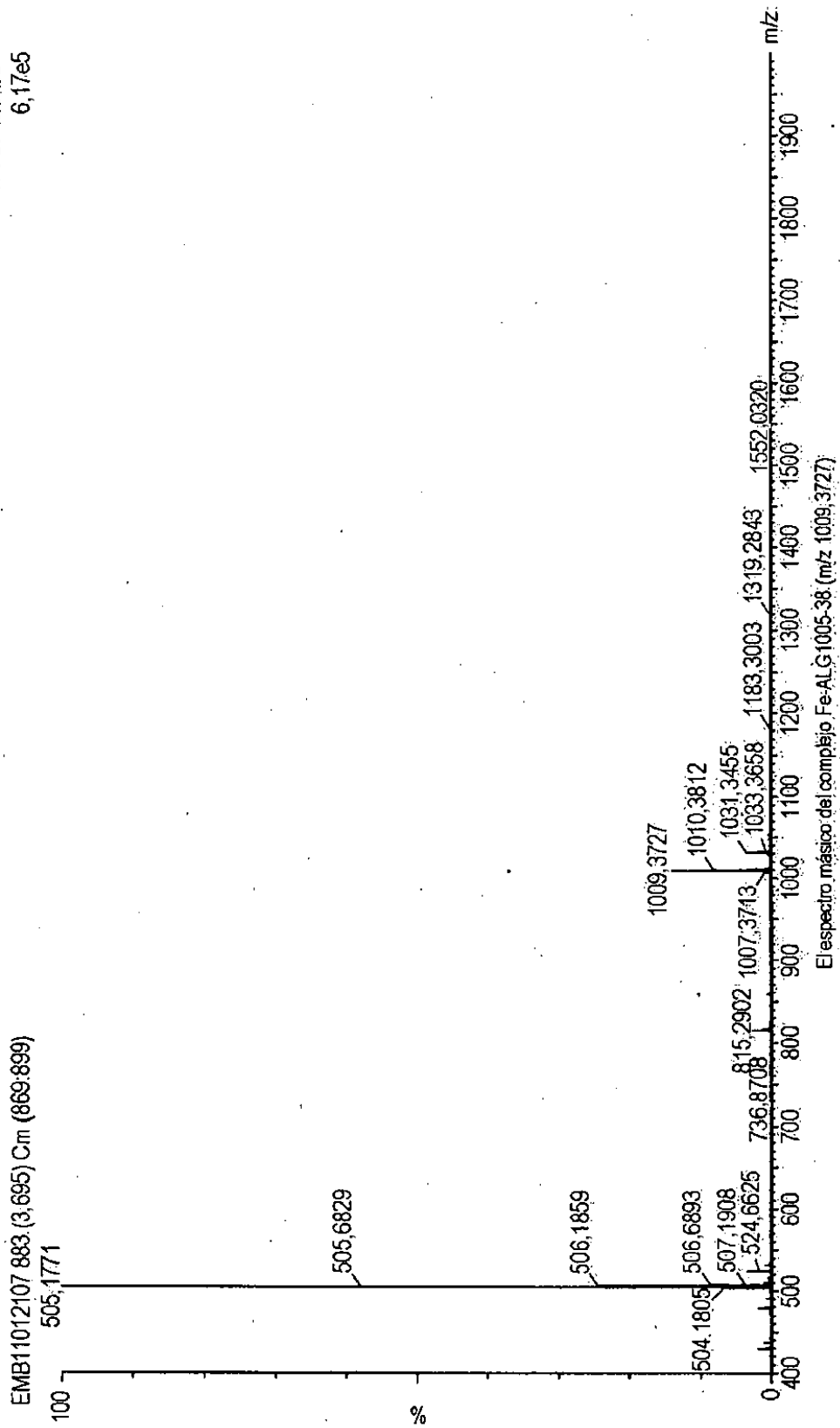
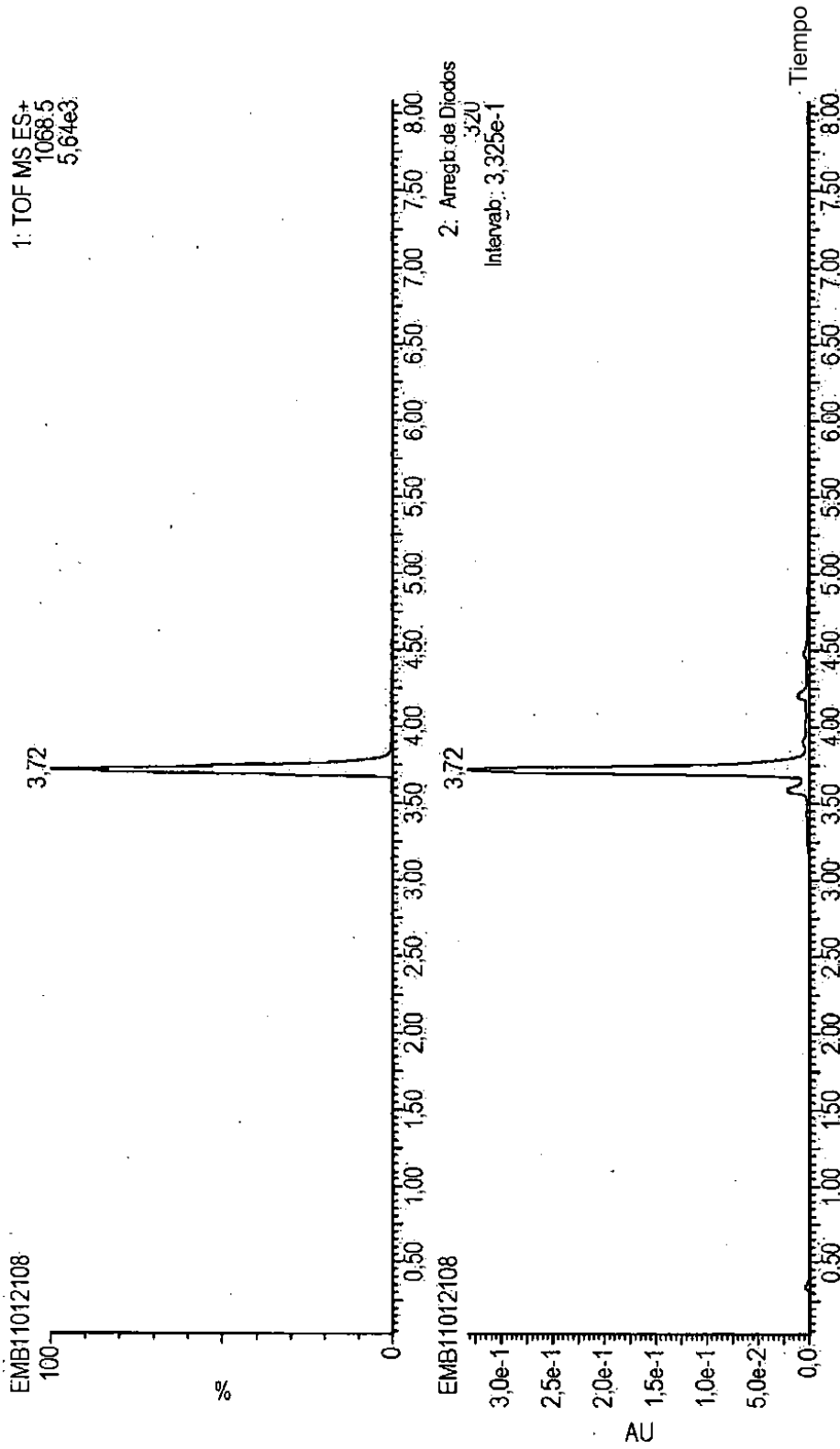


FIG. 10



Cromatograma de la mezcla de reacción de In3+(HCl) y 1 mg/mL ALG1005-38 en amortiguador de acetato

FIG. 11

1: TOF MS ES+  
5,66e5

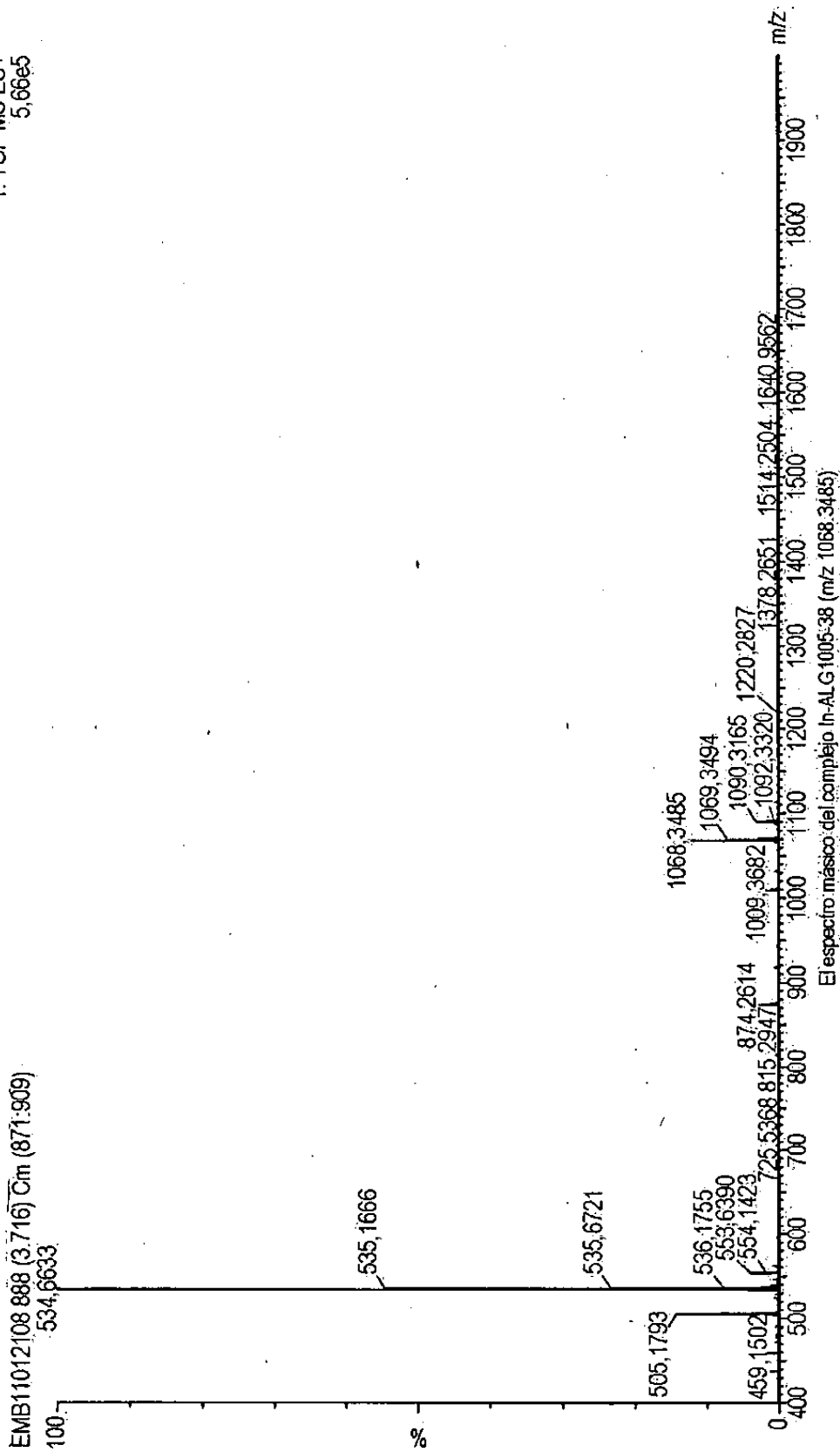


FIG. 12

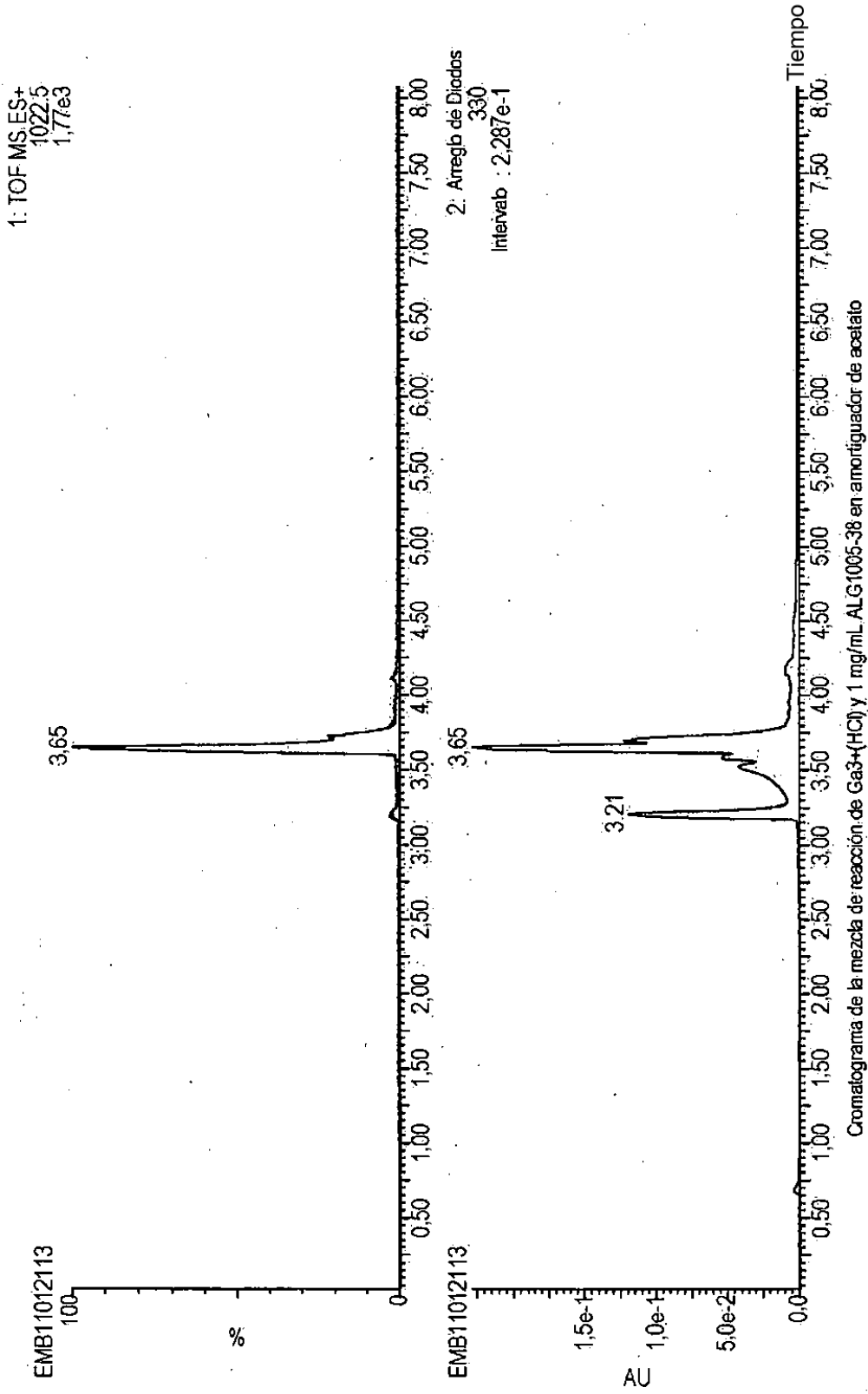


FIG. 13

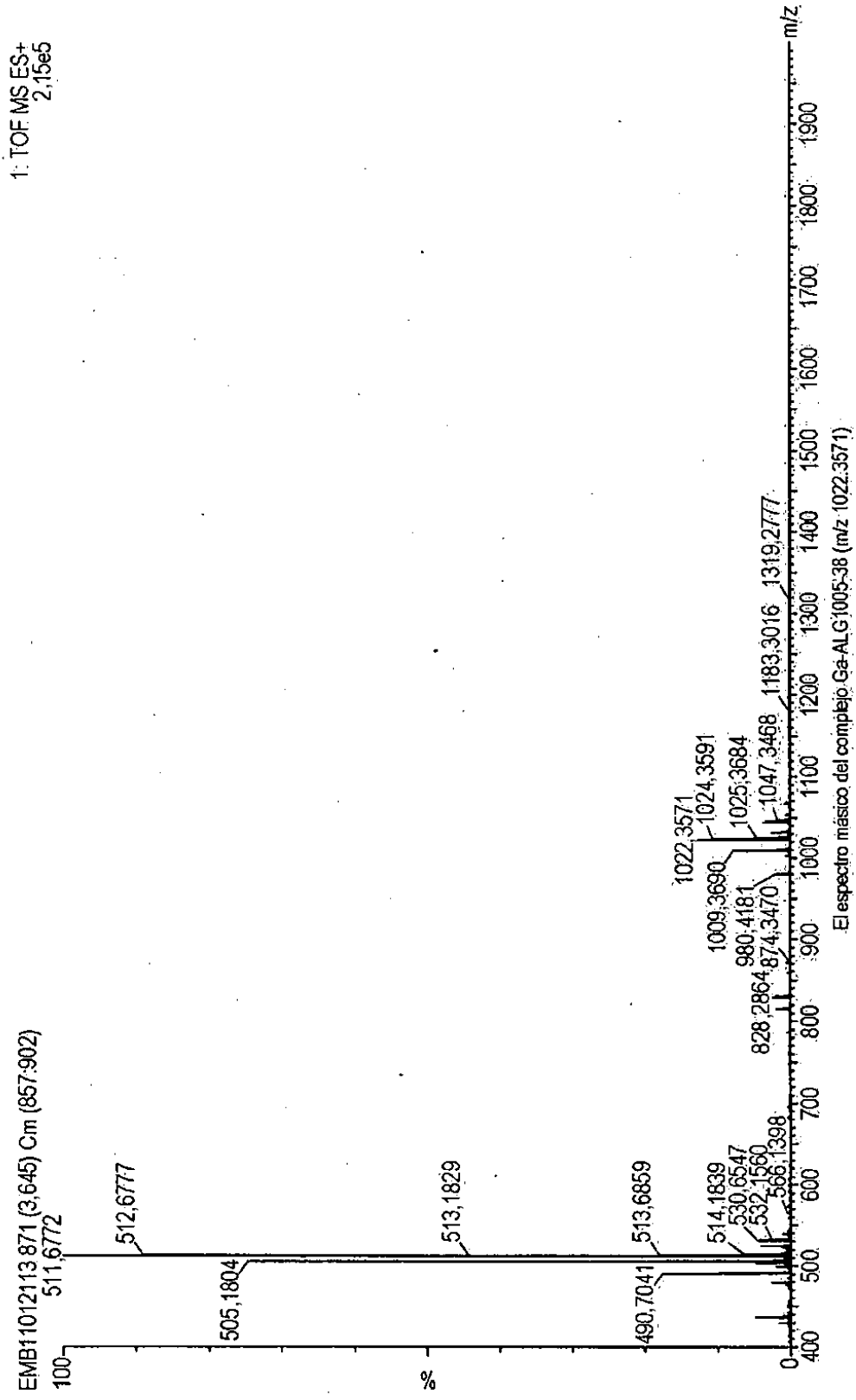


FIG. 14

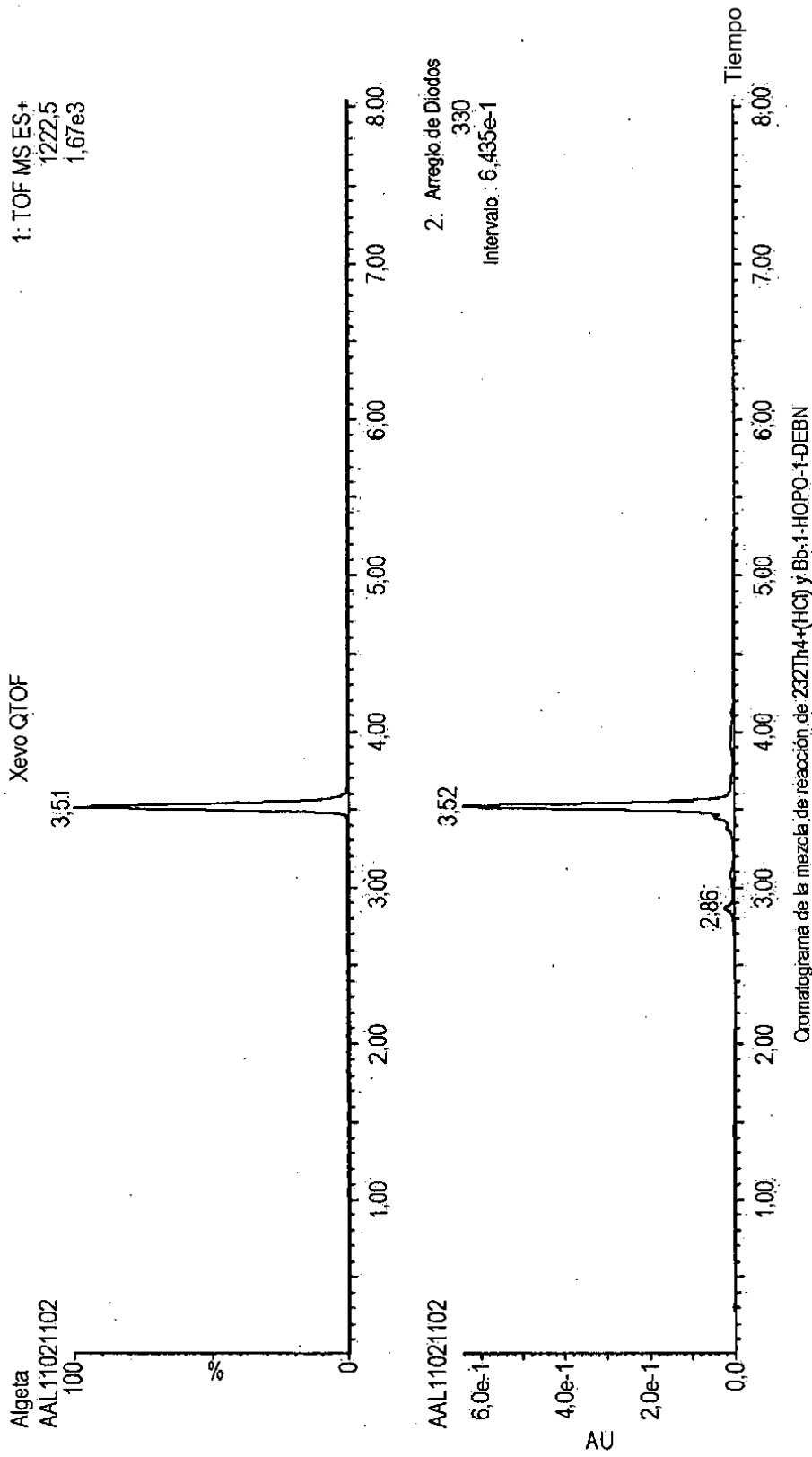
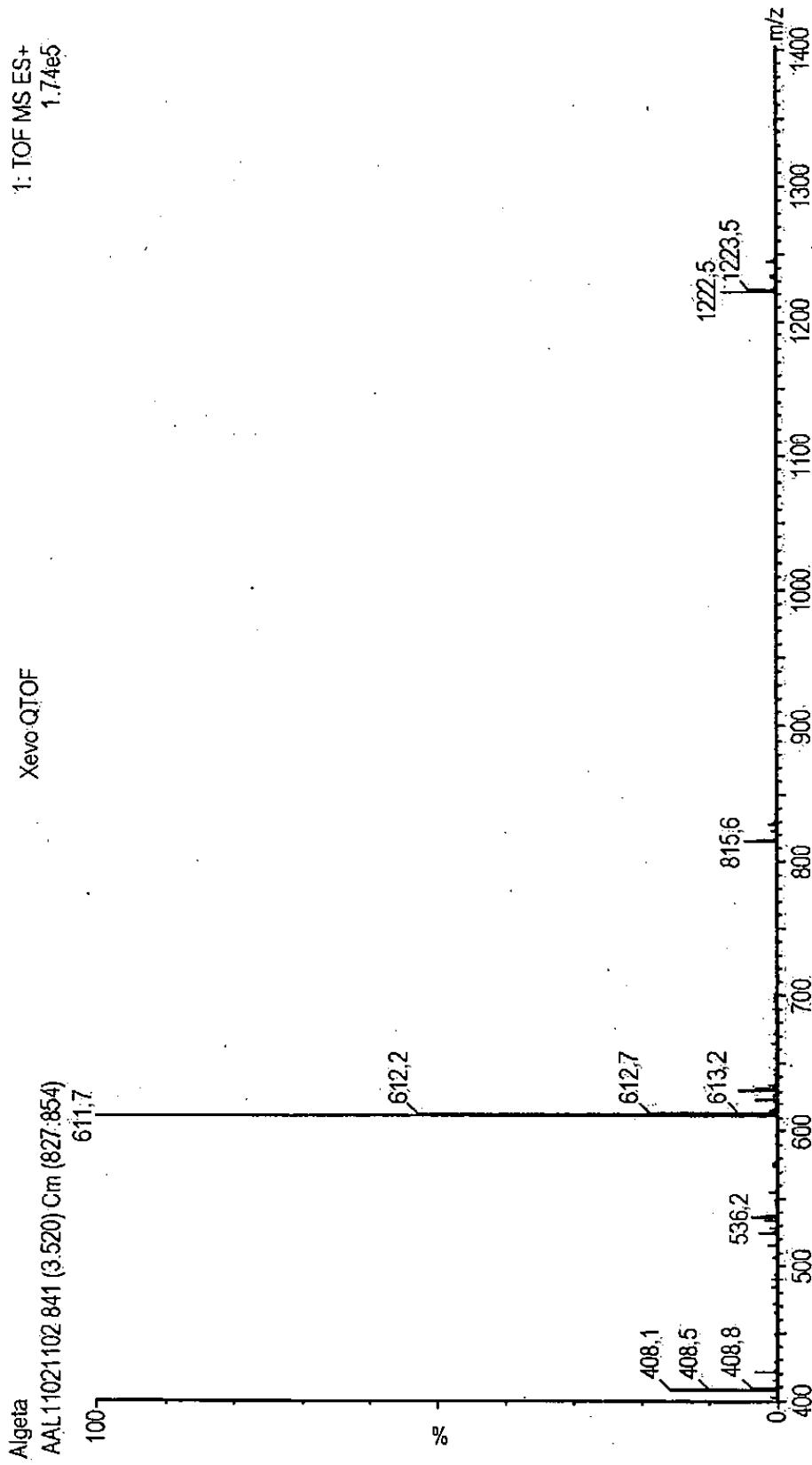


FIG. 15





El espectro másico del complejo 232Th-Bb-1-HOPO-1-DEBN (m/z: 1222.5)

**FIG. 16**

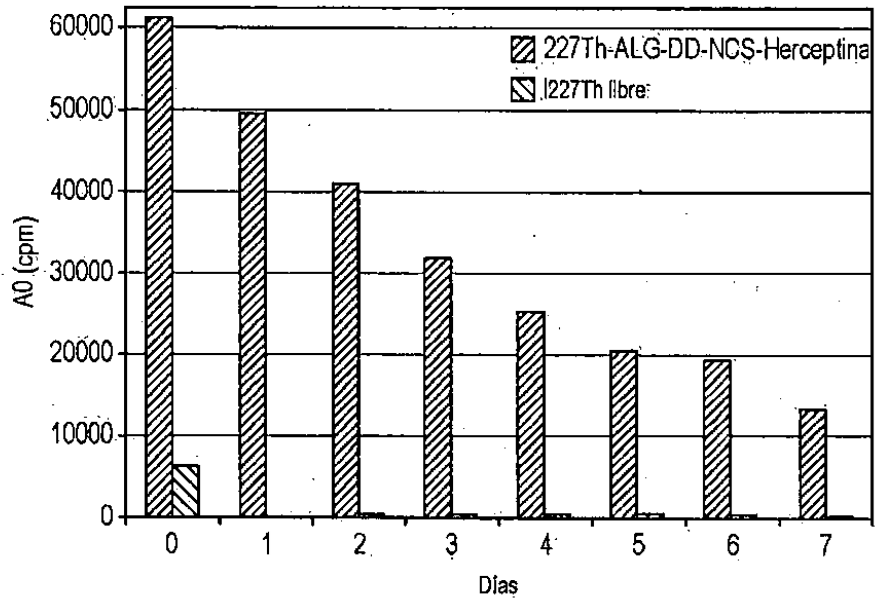
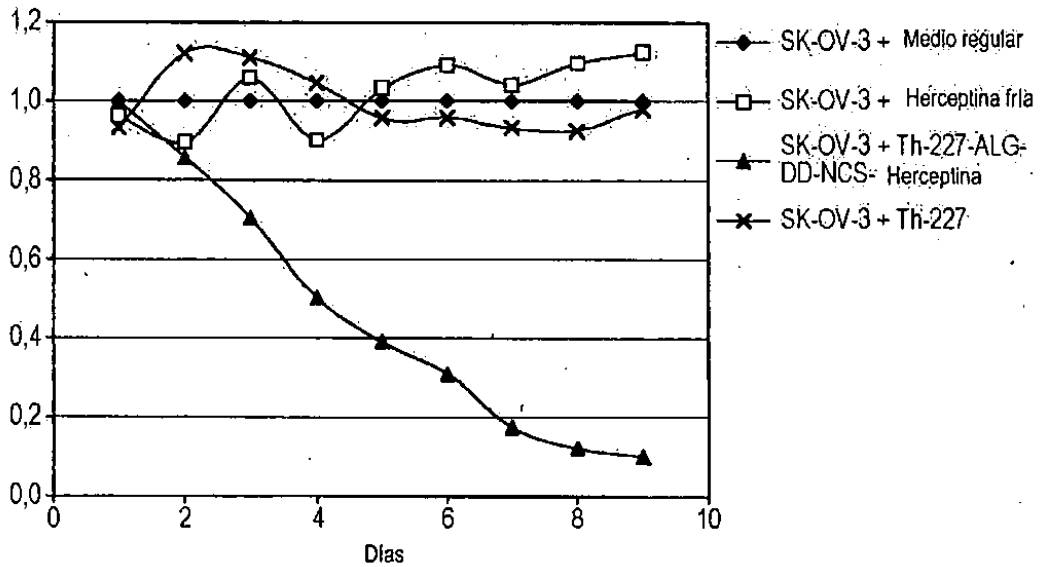
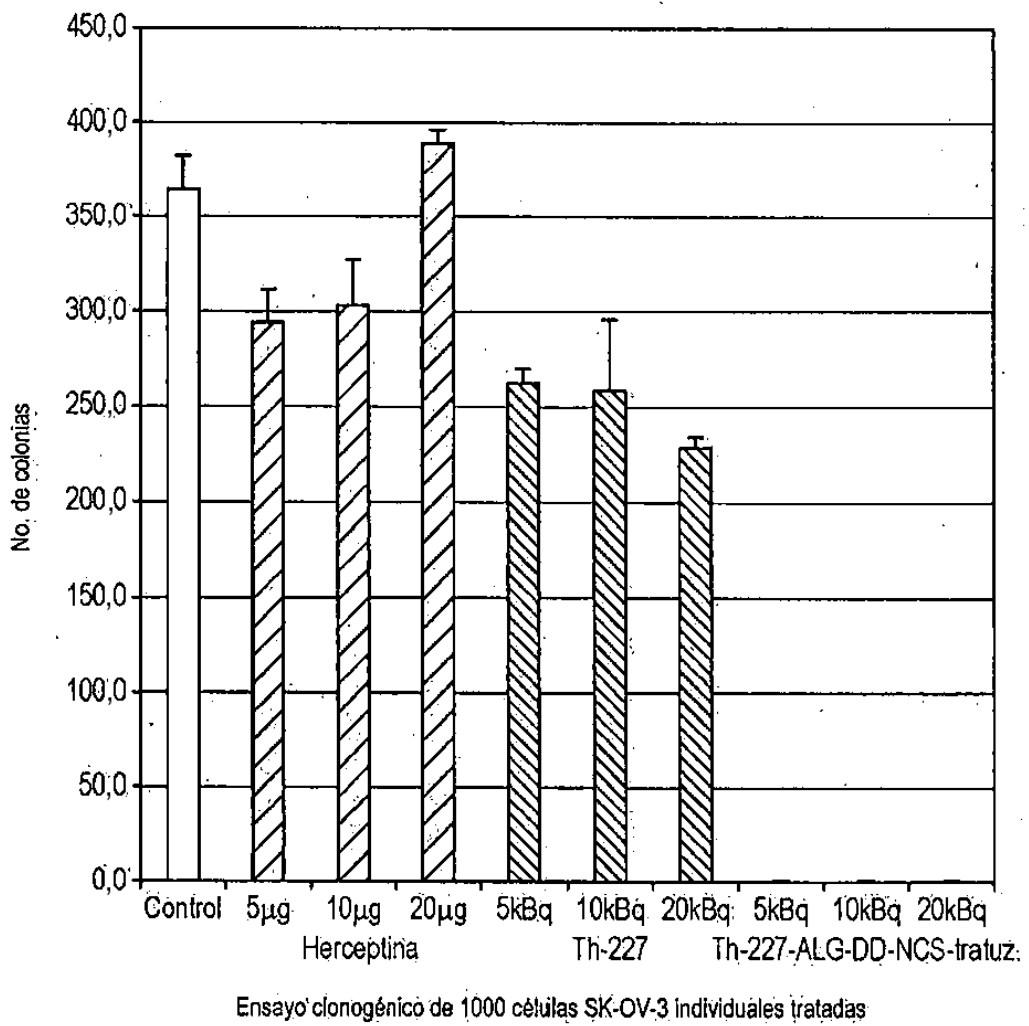


FIG. 17



Valores de luminiscencia para células SK-OV-3 tratadas

FIG. 18



**FIG. 19**

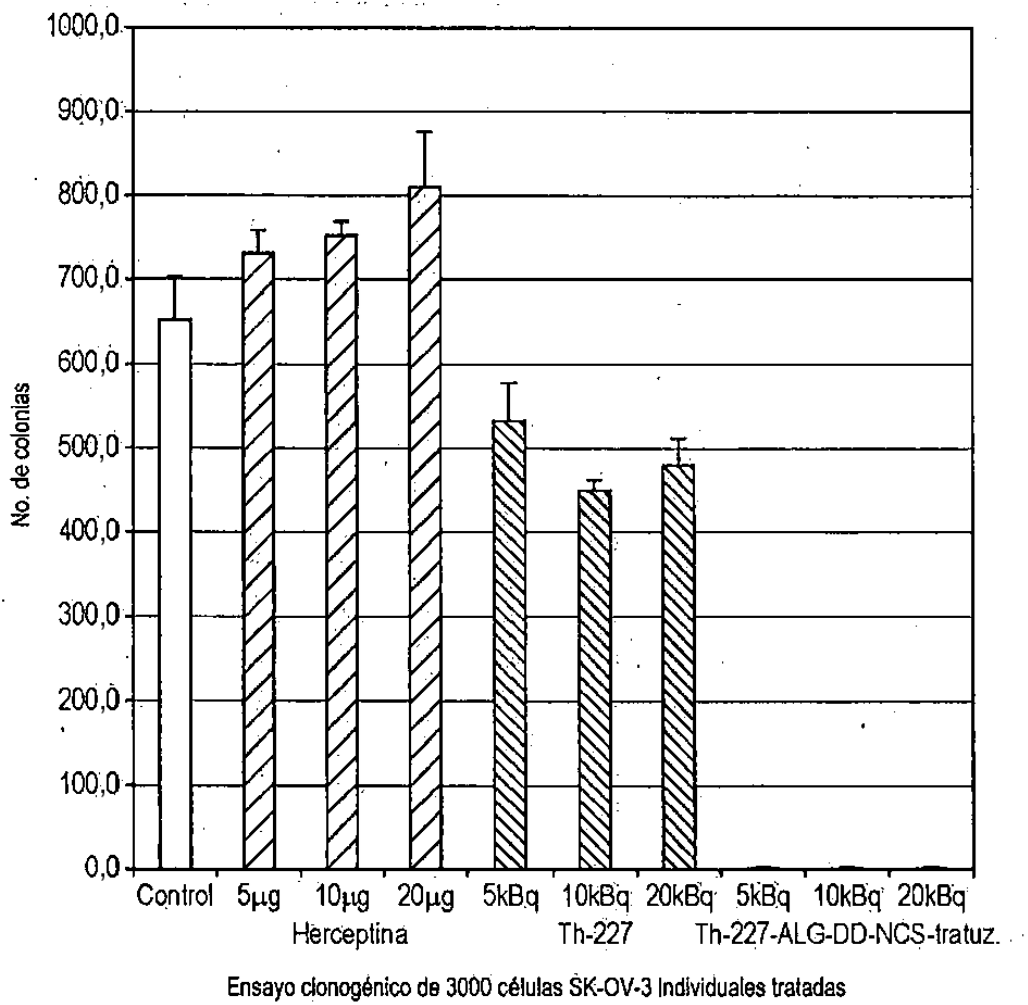
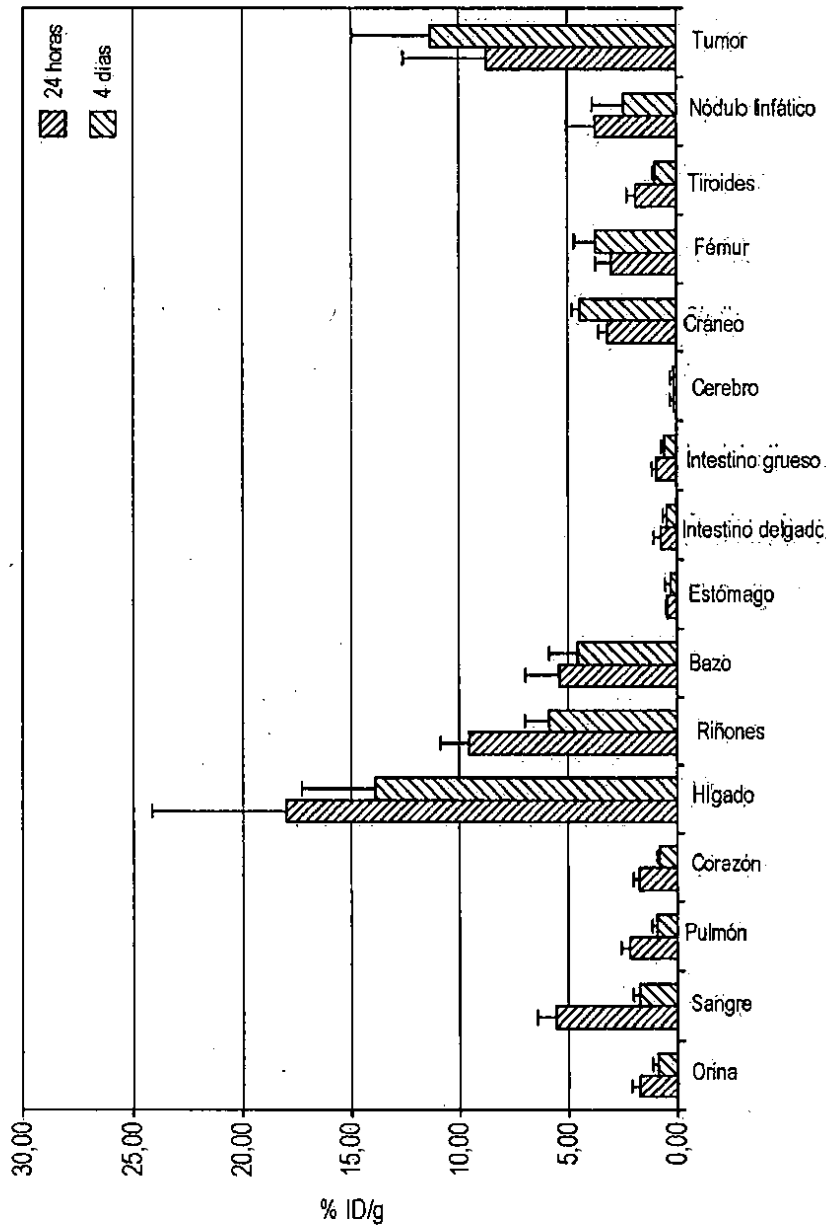


FIG. 20



Distribución en órganos de  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-trastuzumab (2700 Bq/ $\mu\text{g}$ ) en ratones desnudos Balb/c con xenoinjertos SK-OV-3

**FIG. 21**