

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 073**

51 Int. Cl.:

C07C 235/80 (2006.01)

C07C 247/14 (2006.01)

C07C 261/02 (2006.01)

C07K 17/06 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

A61K 103/20 (2006.01)

A61K 103/30 (2006.01)

A61K 103/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2015** **E 19173387 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024** **EP 3543226**

54 Título: **Composición novedosa de diagnóstico por imágenes y usos de la misma**

30 Prioridad:

16.10.2014 AU 2014904138

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

27.09.2024

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (100.0%)
Victoria 3010, AU**

72 Inventor/es:

**DONNELLY, PAUL STEPHEN;
RUDD, STACEY ERIN y
WILLIAMS, SPENCER JOHN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 980 073 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

Composición novedosa de diagnóstico por imágenes y usos de la misma

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a conjugados como se definen en la reivindicación 1. La descripción también se refiere a compuestos a base de ácido hidroxámico que son útiles como agentes de diagnóstico por imágenes cuando se unen a un centro metálico apropiado, particularmente para el diagnóstico por imágenes de tumores. La presente descripción también se refiere a composiciones que incluyen los compuestos, y a los métodos de diagnóstico por imágenes de pacientes que usan los compuestos.

Antecedentes de la invención

10 El circonio-89 (^{89}Zr) es un radionucleido emisor de positrones que se usa en aplicaciones de diagnóstico por imágenes en medicina. En particular, se usa en tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) para la detección de cáncer y el diagnóstico por imágenes. Tiene una vida media más larga ($t_{1/2} = 79,3$ horas) que otros radionucleidos usados en el diagnóstico por imágenes en medicina, tal como el ^{18}F . Por ejemplo, el ^{18}F tiene una $t_{1/2}$ de 110 minutos, lo que significa que su uso requiere de una proximidad cercana a una instalación de ciclotrón y de técnicas de síntesis rápidas y de alto rendimiento para la preparación de los agentes a los que se incorpora. El ^{89}Zr no está afectado por estos mismos problemas, lo que hace del ^{89}Zr particularmente atractivo para su uso en aplicaciones de diagnóstico por imágenes en medicina.

20 La deferoxamina (DFO) es un sideróforo bacteriano que se ha usado desde finales de la década de 1960 para tratar el exceso de hierro. Los tres grupos ácido hidroxámico en la DFO forman enlaces de coordinación con los iones Fe^{3+} , lo que esencialmente hace que la DFO sea un ligando hexadentado que quelata los iones Fe^{3+} . Debido a la geometría de coordinación del ^{89}Zr , la DFO también se ha usado como agente quelante para el ^{89}Zr en aplicaciones de diagnóstico por imágenes mediante PET (por sus siglas en inglés) (Holland, J. P. et al (2012) Nature 10: 1586).

25 También se han preparado otros agentes quelantes de radioisótopos a base de DFO para su uso en aplicaciones de diagnóstico por imágenes por PET. Estos incluyen el *N*-succinil-deferoxamina-tetrafluorofenol éster (*N*-suc-DFO-TFP éster), la *p*-isotiocianatobencil-deferoxamina (DFO-Bz-NCS, también conocido como DFO-Ph-NCS) y la deferoxamina-maleimida (DFO-maleimida). Todos estos agentes quelantes se pueden conjugar con anticuerpos o con fragmentos de anticuerpos para proporcionar un medio de focalización del agente de diagnóstico por imágenes hacia el tumor que se va a visualizar.

30 Sin embargo, estos agentes quelantes tienen una serie de desventajas. La síntesis del *N*-suc-DFO-TFP éster implica la adición de Fe^{3+} , para prevenir la reacción del tetrafluorofenol éster con uno de los grupos hidroxamato de la deferoxamina (DFO). Una vez completada la síntesis (que incluye la etapa de acoplar el *N*-suc-DFO-TFP éster a un anticuerpo), luego se debe eliminar el Fe^{3+} . Esto se logra usando un exceso molar de 100 veces de EDTA a un pH de 4,2-4,5. Estas condiciones pueden ser perjudiciales para anticuerpos sensibles al pH.

35 Con respecto al DFO-Bz-NCS, si este compuesto se añade a una disolución de anticuerpo demasiado rápido sin agitarlo o sin mezclarlo adecuadamente, el DFO-Bz-NCS causa la formación de agregados de anticuerpos. Además, la estabilidad de los agentes quelantes radiomarcados y conjugados con anticuerpos es una preocupación cuando se almacenan por períodos prolongados de tiempo, y se debe evitar la necesidad de tampones que contengan iones cloruro, ya que dan como resultado el desprendimiento del radionucleido del complejo.

40 La DFO-maleimida se conjuga a los anticuerpos a través de la adición de Michael a los grupos tiol. Hay dos problemas principales con esto. El primero es que las adiciones de Michael a los tioles pueden conducir a mezclas de isómeros. Esto es una desventaja porque los isómeros pueden interactuar de diferentes maneras con los sistemas biológicos. El segundo problema es que la adición de Michael a los grupos de tiol es reversible. Esto aumenta el riesgo de que el complejo de DFO-maleimida-radionucleido se disocie del anticuerpo, dando como resultado la distribución del complejo en todo el cuerpo. Esto no solo disminuye la selectividad en el diagnóstico por imagen, sino que también aumenta la probabilidad de efectos secundarios tóxicos a medida que la radiación emitida procedente del radionucleido en el complejo interactúa con otros órganos.

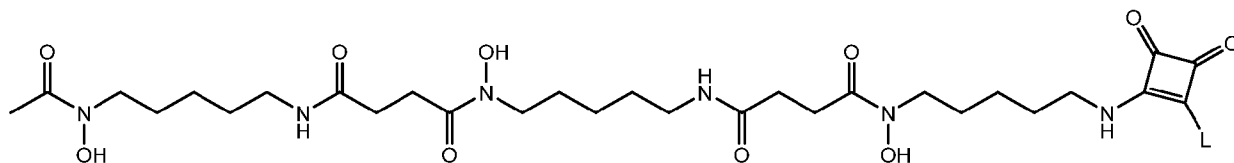
Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes para su uso con radioisótopos, que no tengan estos inconvenientes.

50 La referencia a cualquier técnica anterior en la especificación no es un reconocimiento o sugerencia de que esta técnica anterior forme parte del conocimiento general común en cualquier jurisdicción o de que esta técnica anterior se podría esperar razonablemente que se entienda, que se considere relevante, y/o que se combine con otras partes de la técnica anterior por un experto en la técnica.

Sumario de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un conjugado formado por la reacción de:

- un compuesto de fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y

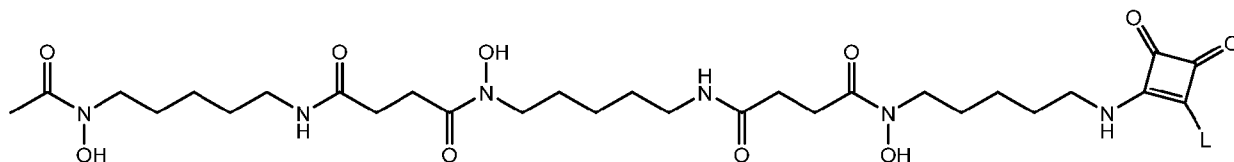
- una molécula objetivo;

5 en donde la molécula objetivo es un anticuerpo;

en donde L es un es un grupo saliente seleccionado de azida, halógeno, cianato y OR,

en donde R se selecciona de alquilo de C₁ a C₁₀, heteroalquilo de C₁ a C₁₀, alqueno de C₂ a C₁₀, alquino de C₂ a C₁₀, y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; u OR se selecciona de O-*p*-toluensulfonato, O-bencensulfonato y O-*m*-nitrobencensulfonato.

10 Los presentes inventores han encontrado que el compuesto de fórmula (I) descrito a continuación (también denominado en la presente invención "DFO-escuaramida" o "DFOSq"), y su conjugado con una molécula biológica (cuando se compleja a un radionucleido tal como ⁸⁹Zr), es un agente eficaz de diagnóstico por imágenes mediante PET:

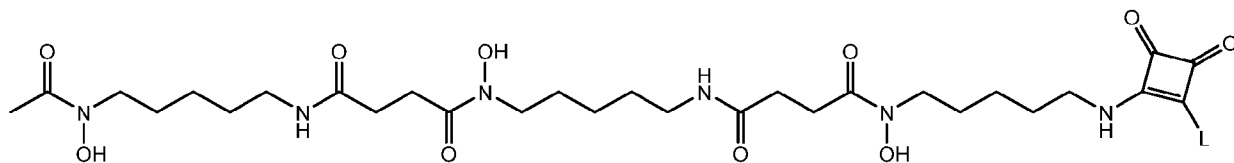


(I)

15 en donde L es un grupo saliente. En una realización, L es OR. R se puede seleccionar de alquilo de C₁ a C₁₀, heteroalquilo de C₁ a C₁₀, alqueno de C₂ a C₁₀, alquino de C₂ a C₁₀, y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. R puede ser alquilo de C₁ a C₁₀ (por ejemplo, alquilo de C₁ a C₆, tal como metilo, etilo, propilo o butilo). R puede ser metilo o etilo. R puede ser etilo.

20 Por lo tanto, una parte de la descripción se refiere a un compuesto de fórmula (I), como se define anteriormente, o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra parte de la descripción se refiere a un complejo de radionucleido de un compuesto de fórmula (I):



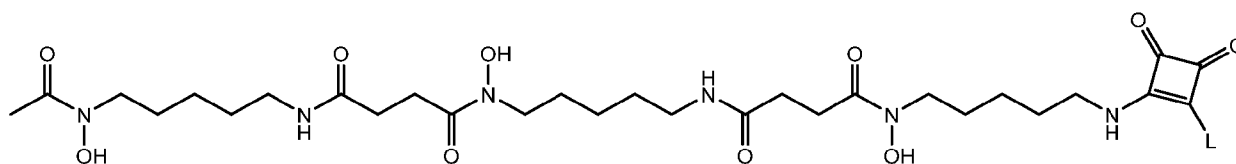
(I)

25 o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde L es un grupo saliente. L puede ser OR. R se puede seleccionar de alquilo de C₁ a C₁₀, heteroalquilo de C₁ a C₁₀, alqueno de C₂ a C₁₀, alquino de C₂ a C₁₀, y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. R puede ser alquilo (por ejemplo, alquilo de C₁ a C₆, tal como metilo, etilo, propilo o butilo). R puede ser metilo o etilo. R puede ser etilo.

30 El radionucleido puede ser un radioisótopo de circonio, galio o indio. El radioisótopo de circonio puede ser ⁸⁹Zr. El radioisótopo de galio puede ser ⁶⁸Ga. El radioisótopo de indio puede ser ¹¹¹In. El radionucleido puede ser un radioisótopo de circonio (por ejemplo, ⁸⁹Zr).

Otra parte de la descripción se refiere a un conjugado de:

- un compuesto de fórmula (I):



(I)

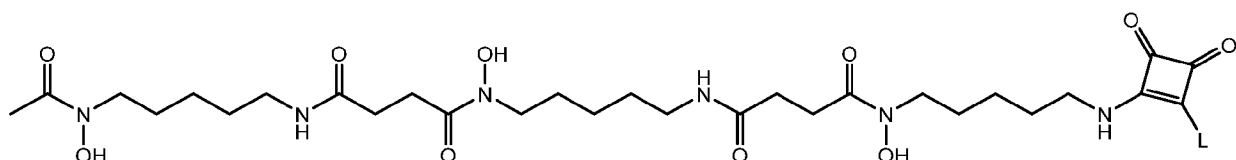
- o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde L es un grupo saliente (como se define en la presente invención), y

- 5 - una molécula objetivo.

La molécula objetivo puede ser un polipéptido (tal como una proteína transportadora o un anticuerpo). La molécula objetivo puede ser un péptido (tal como un péptido marcado). El polipéptido puede ser un anticuerpo. El anticuerpo se puede seleccionar de Herceptin (trastuzumab), rituximab y cetuximab.

Otra descripción se refiere a un conjugado marcado con radionucleido de:

- 10 - un compuesto de fórmula (I):



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde L es un grupo saliente (como se define en la presente invención),

- 15 - una molécula objetivo, y
- un radionucleido complejado al mismo.

La molécula objetivo puede ser un polipéptido (tal como una proteína transportadora o un anticuerpo). La molécula objetivo puede ser un péptido (tal como un péptido marcado). El polipéptido puede ser un anticuerpo. El anticuerpo se puede seleccionar de Herceptin (trastuzumab), rituximab y cetuximab.

- 20 El radionucleido puede ser un radioisótopo de circonio, galio o indio. El radioisótopo de circonio puede ser ^{89}Zr . El radioisótopo de galio puede ser ^{68}Ga . El radioisótopo de indio puede ser ^{111}In . El radionucleido puede ser un isótopo de circonio (por ejemplo, ^{89}Zr).

El complejo marcado con radionucleido y el conjugado marcado con radionucleido tienen una afinidad mejorada en comparación con el DFO-Ph-NCS o un conjugado de DFO-Ph-NCS y la molécula objetivo.

- 25 Otra descripción se refiere a un método de diagnóstico por imágenes de un paciente, que incluye:
- administrar a un paciente un conjugado marcado con radionucleido, como se definió anteriormente, y
- diagnosticar por imágenes al paciente.

Otra descripción se refiere a un método de diagnóstico por imágenes de una célula o de una muestra de biopsia in vitro, el método incluye:

- 30 - administrar a una célula o a una muestra de biopsia in vitro un conjugado marcado con radionucleido, como se definió anteriormente, y
- diagnosticar por imágenes a la célula o a la muestra de biopsia in vitro.

Otros aspectos de la presente invención y otras realizaciones de los aspectos descritos en los párrafos precedentes se harán evidentes a partir de la siguiente descripción, dada a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos.

35 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Diagnóstico por imágenes mediante micro-PET (por sus siglas en inglés) del tumor HER2-positivo (modelo de carcinoma de mama BT474) usando ^{89}Zr (DFO-escuarato-trastuzumab).

Figura 2. Diagnóstico por imágenes mediante micro-PET (por sus siglas en inglés) del tumor HER2-positivo (modelo de tumor colorrectal LS174T) usando $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-maleimida-trastuzumab})$.

Figura 3. Diagnóstico por imágenes mediante micro-PET (por sus siglas en inglés) del tumor HER2-positivo (modelo de tumor colorrectal LS174T) usando $^{89}\text{ZrCl}$.

5 Figura 4. Un cromatograma de radio-iTLC (por sus siglas en inglés) de una muestra de control (es decir, sin DFOSq).

Figura 5. Un cromatograma de radio-iTLC (por sus siglas en inglés) del complejo ^{89}Zr DFOSq (60 minutos después de la adición del ^{89}Zr).

10 Figura 6. Dos cromatogramas de HPLC (por sus siglas en inglés) con UV-Visible de exclusión por tamaños (a dos longitudes de onda de absorción diferentes de 280 y 254 nm) y un cromatograma de radiación de una muestra de control.

Figura 7. Dos cromatogramas de HPLC (por sus siglas en inglés) con UV-Visible de exclusión por tamaños y un cromatograma de radiación del complejo ^{89}Zr DFOSq (78 horas después de la adición del ^{89}Zr).

15 Figura 8. Un cromatograma de radio-iTLC (por sus siglas en inglés) del DFOSq-cRGDfK marcado con ^{89}Zr (tomado 60 minutos después de la adición del ^{89}Zr).

Figura 9. Un espectro de LCMS (por sus siglas en inglés) del DFOSq-transferrina (DFOSq-Tf).

Figura 10. Un cromatograma de radio-iTLC (por sus siglas en inglés) del DFOSq-Tf marcado con ^{89}Zr (tomado 20 minutos después de la adición del ^{89}Zr).

20 Figura 11. Dos cromatogramas de HPLC (por sus siglas en inglés) con UV-Visible de exclusión por tamaños y un cromatograma de radiación del DFOSq-Tf marcada con ^{89}Zr (20 minutos después de la adición del ^{89}Zr).

Figura 12. Un espectro de LCMS (por sus siglas en inglés) del DFOSq-herceptin (DFOSq-Herc).

Figura 13. Un cromatograma de radio-iTLC (por sus siglas en inglés) de DFOSq-Herc marcado con ^{89}Zr (tomado 25 minutos después de la adición del ^{89}Zr).

Figura 14. Un cromatograma de radio-iTLC (por sus siglas en inglés) de DFOSq-Herc marcado con ^{89}Zr purificado.

25 Figura 15. Dos cromatogramas de HPLC (por sus siglas en inglés) con UV-Visible de exclusión por tamaños y un cromatograma de radiación del DFOSq-Herc frío (es decir, sin marcar).

Figura 16. Dos cromatogramas de HPLC (por sus siglas en inglés) con UV-Visible de exclusión por tamaños y un cromatograma de radiación del DFOSq-Herc marcado con ^{89}Zr (tomado 24 horas después de la purificación).

30 Figura 17. Diagnóstico por imágenes mediante PET (por sus siglas en inglés) del ratón 1 después de la administración del $^{89}\text{ZrDFOSq-Herceptin}$.

Figura 18. Diagnóstico por imágenes mediante PET (por sus siglas en inglés) del ratón 2 después de la administración del $^{89}\text{ZrDFOSq-Herceptin}$.

Figura 19. ESI-MS (por sus siglas en inglés) deconvolucionada del DFOSq-trastuzumab (trastuzumab sin marcar = 148.232).

35 Figura 20. Análisis mediante iTLC (por sus siglas en inglés) de la mezcla de reacción $^{89}\text{Zr-DFOPhNCS-trastuzumab}$ después de 30 min (el origen es a 55 mm, el frente del disolvente a 150 mm; el trastuzumab marcado permanece en el origen, la actividad con una distancia de >70 mm (r.f. >0,1) representa al ^{89}Zr no quelado).

40 Figura 21. Análisis mediante SE-HPLC (por sus siglas en inglés) del $^{89}\text{Zr-DFOSq-trastuzumab}$ después de la purificación con PD-10 (parte superior: absorbancia a 280 nm; parte inferior: señal de radiación (mV); $^{89}\text{Zr-DFOSq-trastuzumab}$ eluye a los ~12 minutos, el gentisato eluye a 20-25 minutos).

Figura 22. Diagnóstico por imágenes mediante PET (por sus siglas en inglés) de ratones NOD/SCID portadores de tumores BT474 usando $^{89}\text{Zr-DFOSq-trastuzumab}$.

Figura 23. ESI-MS (por sus siglas en inglés) deconvolucionada del DFOSq-trastuzumab (trastuzumab sin marcar = 148.232).

45 Figura 24. Análisis mediante iTLC (por sus siglas en inglés) de la mezcla de reacción del $^{89}\text{Zr-DFOSq-trastuzumab}$ después de 1 hora (el origen es a 70 mm, el frente del disolvente a 160 mm; el trastuzumab marcado permanece en el origen, la actividad con una distancia de >80 mm (r.f. >0,1) representa al ^{89}Zr no quelado).

Figura 25. Rastreo de radiación por análisis mediante SE-HPLC (por sus siglas en inglés) del ^{89}Zr -DFOSq-trastuzumab purificado (tiempo de retención del producto ~12,5 min).

Figura 26. Análisis mediante iTLC (por sus siglas en inglés) de la mezcla de reacción del ^{89}Zr -DFOSq-trastuzumab después de 1,5 h (el origen es a 70 mm, el frente del disolvente a 145 mm; el trastuzumab marcado permanece en el origen, la actividad con una distancia de >80 mm (r.f. >0,1) representa ^{89}Zr no quelado).

Figura 27. Traza de la radiación por análisis mediante SE-HPLC (por sus siglas en inglés) del ^{89}Zr -DFOSq-trastuzumab purificado (tiempo de retención del producto ~12,5 min).

Figura 28. Diagnóstico por imágenes mediante PET (por sus siglas en inglés) de ratones portadores del tumor SKOV3 usando ^{89}Zr -DFOSq-trastuzumab como agente de diagnóstico por imagen.

Figura 29. Diagnóstico por imágenes mediante PET (por sus siglas en inglés) de ratones portadores del tumor LS174T usando ^{89}Zr -DFOSq-trastuzumab como agente de diagnóstico por imagen.

Figura 30. Análisis mediante ^1H NMR (por sus siglas en inglés) del DFOPhNCS (d_6 -DMSO, 400 MHz).

Figura 31. Traza analítica por HPLC (absorbancia a 214 nm) del DFOPhNCS purificado (señal a 1,5 min = DMSO, 8,95 min = DFOPhNCS).

Figura 32. Análisis mediante ESI-MS (por sus siglas en inglés) del DFOPhNCS purificado.

Figura 33. ESI-MS (por sus siglas en inglés) deconvolucionada del DFOPhNCS-trastuzumab (trastuzumab no marcado = 148.234; trastuzumab con un acoplamiento de DFOPhNCS = 148.987).

Figura 34. (a) Análisis mediante iTLC (por sus siglas en inglés) de la mezcla de reacción de ^{89}Zr -DFOPhNCS-trastuzumab después de 1 h, mostrando una eficiencia de marcaje del ~30% (el origen es a 60 mm, el frente del disolvente a 150 mm; el trastuzumab marcado permanece en el origen, la actividad con una distancia de >70 mm (r.f. > 0,1) representa al ^{89}Zr no quelado. (b) Análisis mediante iTLC (por sus siglas en inglés) de la mezcla de reacción de ^{89}Zr -DFOPhNCS-trastuzumab después de 1 hora y media, mostrando una eficiencia de marcaje del ~50% (el origen es a 55 mm, el frente del disolvente a 135 mm; el trastuzumab marcado permanece en el origen, la actividad a una distancia de >65 mm (r.f. >0,1) representa al ^{89}Zr no quelado. (c) Análisis mediante iTLC (por sus siglas en inglés) de la mezcla de reacción de ^{89}Zr -DFOPhNCS-trastuzumab después de 2 h, mostrando una eficiencia de marcaje del ~65% (el origen es a 60 mm, el frente de solvente a 145 mm; el trastuzumab marcado permanece en el origen; la actividad con una distancia de >70 mm (r.f. > 0,1) representa al ^{89}Zr no quelado.

Figura 35. Análisis mediante iTLC (por sus siglas en inglés) del ^{89}Zr -DFOPhNCS-trastuzumab después de la purificación con PD-10 (el origen es a 55 mm, el frente del disolvente a 150 mm; el trastuzumab marcado permanece en el origen, la actividad con una distancia de >70 mm (r.f. >0,1) representa al ^{89}Zr no quelado.

Figura 36. Análisis mediante SEC-HPLC (por sus siglas en inglés) del ^{89}Zr -DFOPhNCS-trastuzumab después de la purificación con PD-10 (parte superior: absorbancia a 280 nm; parte inferior: señal de radiación (mV); ^{89}Zr -DFOPhNCS-trastuzumab comienza a eluir a ~12 minutos, el ácido genticónico eluye a 20-25 minutos).

Figura 37. Diagnóstico por imágenes mediante PET (por sus siglas en inglés) de ratones portadores del tumor SKOV3 usando ^{89}Zr -DFOPhNCS-trastuzumab como agente de diagnóstico por imagen.

Figura 38. Resultados del diagnóstico por imágenes mediante PET (por sus siglas en inglés) del ^{89}Zr -DFO-Sq/Herceptin frente a ^{89}Zr -DFO-Ph-NCS/Herceptin tomados en ratones portadores del tumor SKOV3.

Figura 39. Análisis mediante HPLC (por sus siglas en inglés) de la mezcla de reacción ^{89}Zr -DFOPhNCS-cRGDFK; parte superior: absorbancia a 280/254 nm; parte inferior: radiación.

Figura 40. Análisis mediante HPLC (por sus siglas en inglés) de la mezcla de reacción ^{89}Zr -DFOSq-cRGDFK; parte superior: absorbancia a 254 nm; parte media: absorbancia a 280 nm; parte inferior: radiación.

Figura 41. Análisis mediante HPLC (por sus siglas en inglés) de la mezcla de reacción DFOPhNCS-cRGDFK/DFOSq-cRGDFK/ ^{89}Zr ; parte superior: absorbancia a 280/254 nm; parte inferior: radiación.

Figura 42. Espectro de ^1H NMR (por sus siglas en inglés) (400 MHz, D_2O) del DFOSqTaur.

Figura 43. Espectro de ESI-MS (por sus siglas en inglés) del DFOSqTaur. $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc) $m/z = 764,35$.

Figura 44. Espectro de ^1H NMR (por sus siglas en inglés) (400 MHz, D_2O) del DFOPhSO₃H.

Figura 45. Espectro de ESI-MS (por sus siglas en inglés) del DFOPhSO₃H. $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc) $m/z = 776,33$.

Figura 46. Espectro de ESI-MS (por sus siglas en inglés) de la mezcla de reacción DFOPhSO₃H/DFOSqTaur /Zr.

Descripción detallada de las realizaciones

Los presentes inventores han descubierto que la síntesis del compuesto de fórmula (I) (y, en particular, la síntesis de conjugados de este compuesto con moléculas biológicas) es más simple y modificable ante la presencia de moléculas sensibles al pH, tales como los anticuerpos, que la del *N*-suc-DFO-TFP, ya que no es necesario usar iones Fe^{3+} para proteger los grupos ácido hidroxámico. Esto hace que la conjugación del anticuerpo y del radiomarcado con ^{89}Zr sea sencilla. Además, el compuesto de fórmula (I) no es sensible a tampones que contienen cloruro, no produce la formación de agregados durante la conjugación con biomoléculas, y no se une de manera reversible a las moléculas biológicas.

Además, inesperadamente, los conjugados radiomarcados de los compuestos de fórmula (I) con moléculas objetivo exhiben un marcado tumoral y una selectividad de tejido mejorados con respecto a un número de agentes quelantes de radionucleidos conocidos (particularmente otros agentes quelantes a base de DFO) que se usan como agentes de diagnóstico por imágenes mediante PET (por sus siglas en inglés).

Hay una serie de factores potenciales que podrían contribuir a este marcado tumoral y selectividad de tejido mejorados, incluida la fuerza con que se quela el radioisótopo, la estabilidad metabólica, y la tasa de excreción de los metabolitos. Ninguna de estas ventajas de los compuestos de la fórmula (I) se describe en la técnica anterior, ni podrían esperarse, y se desconoce la ponderación relativa de sus contribuciones al rendimiento mejorado general de los compuestos de la fórmula (I).

Una "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto descrito en la presente invención es una sal ácida o básica que generalmente se considera en la técnica que es adecuada para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos o de animales sin excesiva toxicidad o carcinogenicidad, y preferiblemente sin irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación. Dichas sales incluyen sales de ácidos minerales y orgánicos de residuos básicos tales como aminas, así como sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos.

Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos tales como clorhídrico, fosfórico, bromhídrico, málico, glicólico, fumárico, sulfúrico, sulfámico, sulfanílico, fórmico, toluensulfónico, metanosulfónico, bencenosulfónico, etano disulfónico, 2-hidroxiethylsulfónico, nítrico, benzoico, 2-acetoxibenzoico, cítrico, tartárico, láctico, esteárico, salicílico, glutámico, ascórbico, pamoico, succínico, fumárico, maleico, propiónico, hidroximaleico, hidroxidróico, fenilacético, alcanico (tal como acético, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ donde n es cualquier número entero de 0 a 6, es decir, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6), y similares. De manera similar, los cationes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sodio, potasio, calcio, aluminio, litio, y amonio. Un experto en la técnica reconocerá otras sales farmacéuticamente aceptables para los compuestos proporcionados en la presente invención. En general, una sal ácida o básica farmacéuticamente aceptable se puede sintetizar a partir de un compuesto original que contiene un resto básico o ácido por cualquier método químico convencional. Brevemente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o del ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico (tal como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo), o en una mezcla de los dos.

Será evidente que los compuestos de fórmula (I) pueden, pero no necesariamente, estar presentes como un hidrato, solvato o complejo no covalente (para un metal distinto del radionucleido).

Un "profármaco" es un compuesto que puede no cumplir completamente con los requisitos estructurales de los compuestos que se proporcionan en la presente invención, pero se modifica in vivo tras su administración a un sujeto o paciente, para producir un conjugado radiomarcado como se proporciona en la presente invención. Por ejemplo, un profármaco puede ser un derivado acilado de un conjugado radiomarcado. Los profármacos incluyen compuestos en donde grupos hidroxilo o amina están unidos a cualquier grupo que, cuando se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo libre hidroxilo o amina, respectivamente. Ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, derivados de acetato, formiato, fosfato y benzoato de grupos funcionales de amina dentro del conjugado radiomarcado. Los profármacos de los mismos pueden prepararse modificando los grupos funcionales presentes en los compuestos de forma tal que las modificaciones se escindan in vivo para generar los compuestos base.

Un "sustituyente", como se usa en la presente invención, se refiere a un resto molecular que está unido covalentemente a un átomo dentro de una molécula de interés. El término "sustituido", como se usa en la presente invención, significa que uno o más hidrógenos en el átomo designado se reemplazan con una selección de los sustituyentes indicados, siempre que no se exceda la valencia normal del átomo designado, y que la sustitución dé lugar a un compuesto estable, es decir, un compuesto que se pueda aislar, caracterizar y analizar para determinar su actividad biológica. Cuando un sustituyente es oxo, es decir, $=\text{O}$, entonces se reemplazan dos hidrógenos en el átomo. Un grupo oxo que es un sustituyente de un átomo de carbono aromático da como resultado una conversión de $-\text{CH}-$ a $-\text{C}(=\text{O})-$ y una pérdida de aromaticidad. Por ejemplo, un grupo piridilo sustituido con oxo es una piridona. Ejemplos de sustituyentes adecuados son grupos alquilo, heteroalquilo, halógeno (por ejemplo, átomos de flúor, cloro, bromo o yodo), OH, $=\text{O}$, SH, SO_2 , NH_2 , NHalquilo, $=\text{NH}$, N_3 y NO_2 .

El término "opcionalmente sustituido" se refiere a un grupo en donde uno, dos, tres o más átomos de hidrógeno se han reemplazado independientemente entre sí por grupos alquilo, halógeno (por ejemplo, átomos de flúor, cloro, bromo o yodo), OH, $=\text{O}$, SH, $=\text{S}$, SO_2 , NH_2 , NHalquilo, $=\text{NH}$, N_3 o NO_2 .

Como se usa en la presente invención, una redacción que define los límites de un intervalo de longitud tal como, por ejemplo, "de 1 a 5" significa cualquier número entero de 1 a 5, es decir, 1, 2, 3, 4 y 5. En otras palabras, cualquier intervalo definido por dos números enteros mencionados explícitamente se entiende que comprende y describe cualquier número entero que defina dichos límites y cualquier número entero comprendido en dicho intervalo.

- 5 El término "grupo saliente" se refiere a cualquier resto que sea capaz de ser desplazado del resto escuarato por reacción con una molécula objetivo. Se desplazará el grupo saliente y se formará un enlace entre un grupo (tal como un grupo amino de una cadena lateral de lisina) de la molécula objetivo y el escuarato. En una realización, el grupo saliente ("L") es OR. En una realización, R se selecciona de alquilo de C₁ a C₁₀, heteroalquilo de C₁ a C₁₀, alqueno de C₂ a C₁₀ y alquino de C₂ a C₁₀, y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido, R es alquilo de C₁ a C₁₀ (por ejemplo, alquilo de C₁ a C₆, tal como metilo, etilo, propilo o butilo). En una realización, R es metilo o etilo. En una realización, R es etilo. En otra realización, L es halógeno (por ejemplo, flúor, cloro, bromo, o yodo), o L es un grupo azida.

- 10 El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado saturado, de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, un grupo n-octilo, especialmente de 1 a 6 átomos de carbono, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Ejemplos específicos de grupos alquilo son metilo, etilo, propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, *iso*-pentilo, *n*-hexilo y 2,2-dimetilbutilo.

- 15 El término "heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se definió anteriormente que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre. Ejemplos específicos de grupos heteroalquilo son metoxi, trifluorometoxi, etoxi, *n*-propiloxi, *iso*-propiloxi, butoxi, *terc*-butiloxi, metoximetilo, etoximetilo, -CH₂CH₂OH, -CH₂OH, metoxietilo, 1-metoxietilo, 1-etoxietilo, 2-metoxietilo o 2-etoxietilo, metilamino, etilamino, propilamino, *iso*-propilamino, dimetilamino, dietilamino, *iso*-propil-etilamino, metilamino metilo, etilamino metilo, di-*iso*-propilamino etilo, metiltio, etiltio, *iso*-propiltio, metanosulfonilo, trifluorometanosulfonilo, enol éter, dimetilamino metilo, dimetilamino etilo, acetilo propionilo, butirilo, acetiloxi, metoxicarbonilo, etoxi-carbonilo, propioniloxi, acetilamino, propionilamino, carboximetilo, carboxietilo o carboxipropilo, *N*-etil-*N*-metilcarbamoilo y *N*-metilcarbamoilo. Otros ejemplos de grupos heteroalquilo son grupos nitrilo, *iso*-nitrilo, cianato, tiocianato, *iso*-cianato, *iso*-tiocianato y alquilnitrilo.

- 20 El término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, al menos parcialmente insaturado, que contiene de 2 a 10 átomos de carbono, especialmente de 2 a 6 átomos de carbono, es decir 2, 3, 4, 5 o 6. Ejemplos específicos de grupos alqueno son grupo etenilo (vinilo), propenilo (alilo), *iso*-propenilo, butenilo, etinilo, propinilo, butinilo, acetilenilo, propargilo, *iso*-prenilo y hex-2-enilo. Preferiblemente, los grupos alqueno tienen uno o dos enlace(s) doble(s).

- 25 El término "alquino" se refiere a un grupo hidrocarburo al menos parcialmente insaturado, de cadena lineal o ramificada que contiene de 2 a 10 átomos de carbono, especialmente de 2 a 6 átomos de carbono, es decir, 2, 3, 4, 5 o 6. Ejemplos específicos de grupos alquino son grupos etinilo, propinilo, butinilo, acetilenilo y propargilo. Preferiblemente, los grupos alquino tienen uno o dos (especialmente preferiblemente uno) enlace(s) triple(s).

- 30 El término "arilo" se refiere a un grupo aromático que contiene uno o más anillos que contienen de 6 a 14 átomos de carbono de anillo, preferiblemente de 6 a 10 (especialmente 6) átomos de carbono de anillo. Ejemplos son grupos fenilo, naftilo y bifenilo. Ejemplos de grupos arilo sustituidos adecuados para usar en la presente invención incluyen *p*-toluenosulfonilo (Ts), bencenosulfonilo (Bs) y *m*-nitrobencenosulfonilo (Ns).

Compuestos preferidos de la fórmula (I) son aquellos donde R es alquilo de C₁ a C₁₀ (y en particular donde R es etilo).

- 35 En una realización, el grupo saliente se selecciona entre OCH₂CH₃, O-*p*-toluenosulfonato (OTs), O-metanosulfonato (OMs), O-trifluorometanosulfonato (OTf), O-bencenosulfonato (OBs), O-*m*-nitrobencenosulfonato (ONs), cianato (CN), azida (N₃) y halógeno (por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo).

- 40 Como se usa en la presente invención, el término "complejo de radionucleido" se refiere a un compuesto de fórmula (I), como se define anteriormente, que ha formado un complejo de coordinación con un radionucleido. En general, esto ocurre como resultado de la formación de enlaces de coordinación entre los grupos donantes de electrones (tales como los grupos hidroxamato) del compuesto de fórmula (I) y el radionucleido.

- 45 En los compuestos de fórmula (I), los enlaces de coordinación se postulan para formarse entre los grupos ácido hidroxámico del DFO y el radionucleido. Sin embargo, sin querer limitarse por ninguna teoría, los presentes inventores también creen que los grupos oxo en el resto escuarato (además de los grupos ácido hidroxámico de DFO) también actúan como átomos donantes, proporcionando uno o dos sitios adicionales por los cuales el compuesto de fórmula (I) se puede unir al radionucleido. Esto da como resultado un complejo de coordinación ocho, que es muy favorable desde una perspectiva de estabilidad para los radionucleidos que tienen una geometría de coordinación ocho (tal como el ⁸⁹Zr), y puede explicar la estabilidad observada con respecto a los complejos. En particular, puede explicar por qué el radionucleido no se lixivia tan fácilmente fuera del tejido objetivo (en otro tejido, tal como el hueso), lo que resulta en una calidad mejorada de diagnóstico por imagen cuando se compara con otros agentes de diagnóstico por imagen a base de DFO. En las Figuras y Ejemplos se ilustran estas ventajas de los compuestos de fórmula (I) sobre los quelantes usados actualmente.

Como se muestra en las Figuras 1, 18 y 22, el ⁸⁹Zr(DFOSq-trastuzumab) se dirige de manera muy selectiva, y

permanece concentrado en el sitio del tumor BT474 HER2-positivo (un carcinoma de mama). Esto contrasta con los resultados mostrados en las Figuras 2 y 3, que demuestran una distribución significativa del radionucleido (cuando se administra como $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-maleimida-trastuzumab})$ y $^{89}\text{ZrCl}$, respectivamente) en todos los cuerpos de los ratones. Como se discutió anteriormente, un posible contribuyente a la especificidad mejorada es que el agente a base de escuarato tiene un fuerte potencial de quelación, lo que evita su distribución en todo el cuerpo y la acumulación en otro tejido, tal como hueso (por el cual el circonio tiene una afinidad muy alta), el hígado y los riñones.

La alta afinidad por el circonio en comparación con el $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-PhNCS})$ se demuestra en un estudio de competencia (ver los Ejemplos y las Figuras 39 a 41). Los espectros de absorbancia y de radiación muestran que el ^{89}Zr está complejo casi exclusivamente con el conjugado de la presente invención cuando se expone el ^{89}Zr a una mezcla de un conjugado de la presente invención (DFOSq-cRGDfK) con DFOPhNCS-cRGDfK .

Otro contribuyente a la especificidad puede ser la estabilidad metabólica del compuesto marcado con radionucleido de fórmula (I). Los metabolitos que contienen el radionucleido, pero que están libres del resto de trastuzumab ("metabolitos no dirigidos") no tendrían capacidad de marcaje, lo que resultaría en la distribución del radionucleido en todo el cuerpo. Esta estabilidad metabólica de los compuestos de fórmula (I) no podía esperarse, y no se puede explicar fácilmente.

Los presentes inventores también postulan que, incluso si se forman los metabolitos de los conjugados marcados con radionucleidos, estos pueden tener una alta tasa de excreción, lo que conduce a una menor acumulación del radionucleido en sitios no objetivo. Esto también sería una propiedad inesperada.

Esta especificidad y estabilidad del conjugado de la presente invención también se ilustra en las Figuras 28 y 29, que demuestran la capacidad del diagnóstico por imágenes del $^{89}\text{Zr}(\text{DFOSq-trastuzumab})$ con respecto a otros tumores HER2-positivos (LS174T, que es un modelo de tumor colorrectal, y SKOV3, que es un modelo de cáncer de ovario). Los resultados obtenidos con el $^{89}\text{Zr}(\text{DFOSq-trastuzumab})$ en el modelo de tumor SKOV3 (Figura 28) también se pueden contrastar cualitativamente con los obtenidos en el mismo modelo de tumor, pero usando el $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-PhNCS-trastuzumab})$ como agente de diagnóstico por imagen (ver Figura 37), lo que muestra una distribución significativa del radionucleido en todos los ratones tratados.

La actividad superior del conjugado radiomarcado sobre otros conjugados, tales como el $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-PhNCS-trastuzumab})$ también se demuestra por los Valores de Absorción Estandarizados (SUVs, por sus siglas en inglés) obtenidos a partir del diagnóstico por imagen de tumores SKOV3 usando el $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-escuarato-trastuzumab})$ (ver Tabla 3 en los Ejemplos) en comparación con los SUV (por sus siglas en inglés) obtenidos del diagnóstico por imagen de tumores SKOV3 usando el $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-PhNCS-trastuzumab})$ (ver Tabla 7 en los Ejemplos). El SUV (por sus siglas en inglés) es básicamente la concentración de radioactividad del tejido (en el momento t), dividida por la actividad inyectada dividida por el peso corporal del animal. Por lo tanto, el SUV se estandariza para diferentes cantidades de radioactividad inyectada y el tamaño del animal.

En general, las mejores imágenes (y una menor toxicidad por radio para los órganos no objetivo) se obtienen cuando la relación entre la captación del agente de diagnóstico por radio-imagen en un tumor y la captación del agente por un tejido no objetivo (tal como el hueso y el hígado) es mayor. Cuanto mayor sea la relación, mejor será la imagen y la selectividad del agente de diagnóstico por radio-imagen. Las gráficas en la Figura 38 muestran la SUV_{max} del tumor, así como la relación SUV para tumor:fondo, tumor:hígado y tumor:hueso, para un conjugado de radiomarcado ($^{89}\text{Zr}(\text{DFOSq-trastuzumab})$), y $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-PhNCS-trastuzumab})$. A partir de la Figura 38, se puede ver que la relación de SUV del $^{89}\text{Zr}(\text{DFOSq-trastuzumab})$ es más alta en todos los experimentos que la relación de SUV del $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-PhNCS-trastuzumab})$ porque hay más radioactividad en el sitio objetivo que en el otro tejido (hígado y hueso). Esto demuestra que el conjugado de radiomarcado es un agente más selectivo y estable que el $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-PhNCS-trastuzumab})$. La alta relación tumor:fondo es ventajosa.

En particular, la captación del conjugado radiomarcado también es dependiente del nivel de expresión del HER2 de los tumores. Los datos presentados en la presente invención demuestran que los tumores que tienen un alto nivel de expresión del HER2 (tal como el BT474) tienen una mayor captación del conjugado (y, por lo tanto, producen una imagen por PET más fuerte) que los tumores que tienen un nivel más bajo de expresión del HER2 (por ejemplo, el LS174T, lo que resultará en una imagen "dímera"). Esta diferencia en la intensidad de la imagen como resultado de variar el nivel de expresión del HER2 es una indicación fuerte de que el nivel de expresión del HER2 en un tumor es lo que influye en la intensidad de la imagen de PET obtenida, no la presencia de diferentes metabolitos.

Como se usa en la presente invención, el término "radionucleido" (también conocido comúnmente como un radioisótopo o isótopo radiactivo), es un átomo con un núcleo inestable. Se descompone de forma radioactiva, lo que resulta en la emisión de radiación nuclear (tal como rayos gamma y/o partículas subatómicas, tales como partículas alfa o beta). El radionucleido puede ser uno que también es útil en aplicaciones de radioinmunoterapia (por ejemplo, un emisor de partículas beta). Preferiblemente, el radionucleido tiene una geometría de coordinación ocho. Ejemplos de radionucleidos incluyen radioisótopos de circonio (por ejemplo, ^{89}Zr), galio (por ejemplo, ^{67}Ga y ^{68}Ga), lutecio (por ejemplo, ^{176}Lu y ^{177}Lu), holmio (por ejemplo, ^{166}Ho), escandio (por ejemplo, ^{44}Sc y ^{47}Sc), titanio (por ejemplo, ^{45}Ti), indio (por ejemplo, ^{111}In y ^{115}In), itrio (por ejemplo, ^{86}Y y ^{90}Y), terbio (por ejemplo, ^{149}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb y ^{161}Tb), tecnecio (por ejemplo, $^{99\text{m}}\text{Tc}$), samario (por ejemplo, ^{153}Sm) y niobio (por ejemplo, ^{95}Nb y ^{90}Nb). El radionucleido se puede

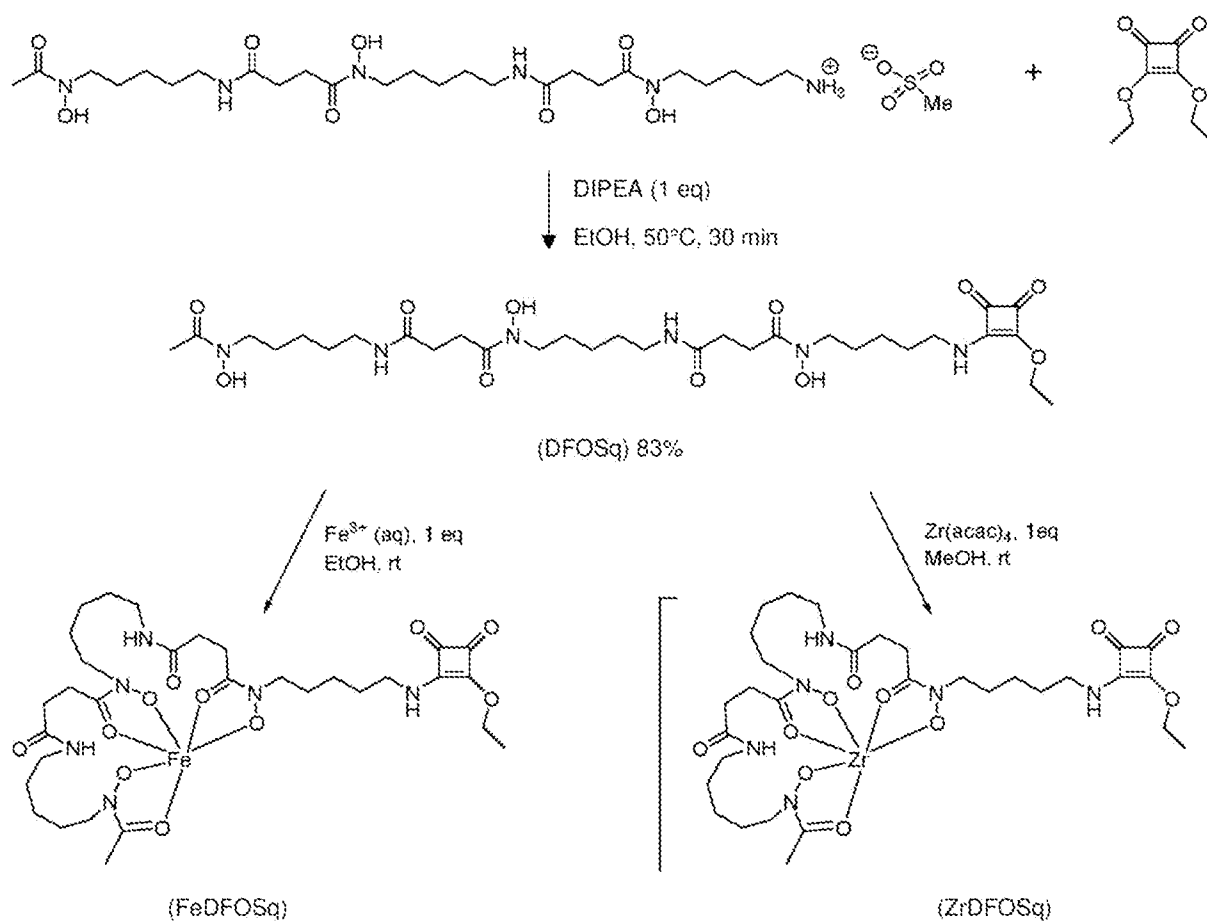
seleccionar de galio (específicamente, ^{67}Ga y ^{68}Ga), indio (específicamente, ^{111}In), y circonio (específicamente, ^{89}Zr). El radionucleido se puede seleccionar entre ^{68}Ga , ^{111}In y ^{89}Zr . Por ejemplo, se ha demostrado que el ^{68}Ga se une con la DFO (ver Ueda et al (2015) Mol Imaging Biol, vol. 17, páginas 102-110), y el indio tiene una química de coordinación similar al circonio (y por lo tanto sería de esperar que se uniera al compuesto de fórmula (I) de una manera similar).

- 5 Una persona experta en la técnica entenderá que el compuesto de fórmula (I) también puede complejar metales no radiactivos usados en aplicaciones de diagnóstico por imagen, tales como MRI (por sus siglas en inglés). Un ejemplo de dicho metal es el gadolinio (por ejemplo, ^{152}Gd).

10 Como se mencionó anteriormente, la presente invención como se define en las reivindicaciones también se refiere a un conjugado de un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y a una molécula objetivo. En esta realización, la molécula objetivo es un anticuerpo.

15 Como se usa en la presente invención, el término "molécula objetivo" se refiere a una molécula biológica, o a un fragmento de una molécula biológica, que tiene la capacidad de dirigirse hacia un tejido o tumor particular. La molécula objetivo puede ser un polipéptido, tal como una proteína (por ejemplo, una proteína de transporte como la transferrina), una albúmina (por ejemplo, albúmina sérica) o un anticuerpo (por ejemplo, trastuzumab, también conocido como herceptin, ranibizumab, bevacizumab, fresolimumab, cetuximab, panitumumab, rituximab, pertuzumab, y ofatumumab). El anticuerpo se puede seleccionar de Herceptin, rituximab y cetuximab. La molécula objetivo puede ser un péptido (por ejemplo, un péptido dirigido que se usa para atacar células involucradas en la angiogénesis tumoral, tales como las secuencias de RGD cíclicas, u otro péptido dirigido, tal como octreotato, bombesina y glu-N(CO)N-lis PSMA). La molécula objetivo tendrá un grupo funcional (tal como un grupo amina de un residuo de lisina) que reaccionará con el resto escuarato para formar un enlace covalente entre la molécula objetivo y el compuesto de fórmula (I). Esto da lugar a la formación del conjugado. El conjugado también puede incluir un radionucleido complejoado con el mismo. Esto produce un conjugado marcado con radionucleido de un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, una molécula objetivo, y un radionucleido complejoado con el mismo. El radionucleido puede ser un radioisótopo de circonio (por ejemplo, ^{89}Zr).

25 Los compuestos de fórmula (I) y los complejos de radionucleidos se pueden sintetizar por cualquier método adecuado conocido por un experto en la materia. Un ejemplo de un método sintético se da a continuación en el Esquema 1.



Esquema 1

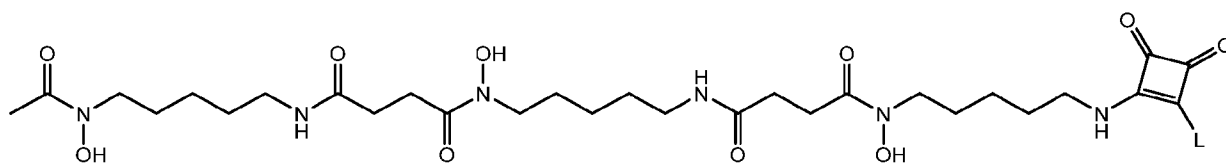
Los complejos de radionucleidos se pueden conjugar con las moléculas objetivo de interés (para producir un conjugado radiomarcado) por cualquier método adecuado conocido por un experto en la materia. Un ejemplo de un método adecuado se expone a continuación:

- 5 1. Prepare la molécula objetivo en tampón de borato, pH 9, a una concentración tal que la concentración final del tampón de la mezcla de reacción sea 0,5 M.
2. Prepare la disolución de DFOSq en DMSO al 4% en agua MilliQ (primero se debe añadir el DMSO para asegurar que el DFOSq esté completamente disuelto).
- 10 3. La disolución de DFOSq se debe añadir a la molécula objetivo según sea necesario y la mezcla de reacción se deja reposar a temperatura ambiente durante la noche (tiempos de reacción más cortos darán como resultado un menor promedio de agentes quelantes por molécula objetivo).
4. Los conjugados se pueden purificar usando filtros de centrifugadora con un límite de peso molecular apropiado (al menos 1 kDa). Después de la filtración inicial, el conjugado se debe lavar en el filtro de centrifugadora al menos dos veces con DMSO al 4% en MilliQ para eliminar todo el exceso de DFOSq.
- 15 5. Una etapa de intercambio de tampón usando el filtro de centrifugadora permite entonces almacenar el conjugado (se recomienda una disolución de NaCl al 0,9% para el DFOSq-Herceptin).

También estará claro para un experto en la materia que el conjugado se puede preparar en ausencia del radionucleido. El radionucleido puede añadirse al conjugado una vez que se ha preparado el conjugado.

Otra descripción se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen un conjugado marcado con radionucleido de:

- 20 - un compuesto de fórmula (I):



(I)

- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde L es un grupo saliente (como se define en la presente invención),

5 - una molécula objetivo, y

- un radionucleido complejoado con el mismo,

y una o más sustancias portadoras, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, por ejemplo, uno o más de agua, tampones (por ejemplo, disolución salina tamponada neutra, disolución salina tamponada con fosfato, citratos y acetatos), etanol, aceite, carbohidratos (por ejemplo, glucosa, fructosa, manosa, sacarosa y manitol), proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes (por ejemplo, bisulfito de sodio), agentes de ajuste de la tonicidad (tales como cloruro de potasio y de calcio), agentes quelantes como EDTA o glutatión, vitaminas y/o conservantes.

Las composiciones farmacéuticas se formularán preferiblemente para administración parenteral. El término "parenteral", como se usa en la presente invención, incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular, espinal, intracraneal, intratecal, intraocular, periocular, intraorbital, intrasinovial e intraperitoneal, así como cualquier inyección similar o técnica de infusión. Se prefiere la administración intravenosa. Componentes adecuados de formulaciones parenterales, y métodos para hacer tales formulaciones, se detallan en varios textos, incluyendo en el "Remington's Pharmaceutical Sciences".

La composición se administrará a un paciente por vía parenteral de la manera habitual. El complejo conjugado DFO-escuramida puede entonces tardar de 1 a 24 horas en distribuirse por todo el cuerpo hasta el sitio objetivo. Una vez que se ha logrado la distribución deseada, se tomará una imagen del paciente.

Otra descripción se refiere a un método de diagnóstico por imagen de un paciente, el método incluye:

- administrar a un paciente el conjugado marcado con radionucleido, como se define en la presente invención; y
- diagnosticar por imágenes dicho paciente.

25 Otra descripción se refiere a un método de diagnóstico por imagen de una célula o de una muestra de biopsia in vitro, el método incluye:

- administrar a una célula o a una muestra de biopsia in vitro el conjugado marcado con radionucleido, tal como se define en la presente invención; y
- diagnosticar por imágenes la célula o la muestra de biopsia in vitro.

30 Preferiblemente, la molécula objetivo sirve para dirigir el conjugado a un sitio deseado *in vivo*, o a un sitio deseado en la célula o en la muestra de biopsia. Preferiblemente, el sitio deseado es un tumor.

Se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular, y el periodo de tiempo que tomará el agente para llegar al sitio objetivo, dependerán de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, y la tasa de excreción, y de la gravedad del trastorno en particular que se está sometiendo a la terapia.

El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de la que resulta en una cantidad detectable de radiación después de la administración del conjugado marcado con radionucleido a un paciente. Una persona experta en la técnica sabrá qué cantidad del conjugado marcado con radionucleido deberá administrar a un paciente para lograr la capacidad óptima de diagnóstico por imágenes sin causar problemas desde una perspectiva de toxicidad. Los conjugados marcados con radionucleidos encuentran un uso particular para ayudar a los médicos a determinar dónde está un cáncer (incluido si un objetivo, tal como un receptor, está presente de manera homogénea en un tumor), a qué tratamiento responderá un cáncer (lo que facilita la selección del tratamiento y la determinación de las dosis óptimas), y cuánto del tratamiento finalmente llegará al sitio objetivo. Los conjugados marcados con radionucleido también se pueden usar para estudiar la farmacocinética y la distribución de las moléculas objetivo en particular (por ejemplo, durante el desarrollo de un fármaco de nuevos agentes terapéuticos biológicos, tales como anticuerpos monoclonales).

Los pacientes pueden incluir, pero no están limitados a, primates, especialmente humanos, animales de compañía

domesticados, tales como perros, gatos, caballos, y ganado, tales como vacas, cerdos y ovejas, con dosis como las que se describen en la presente invención.

Como se mencionó anteriormente, los conjugados marcados con radionucleidos son particularmente útiles para el diagnóstico por imágenes de tumores (los cuales se forman como resultado de la proliferación descontrolada o progresiva de células). Algunas de estas células en proliferación no controlada son benignas, pero otras se denominan "malignas" y pueden causar la muerte del organismo. Las neoplasias malignas o "cánceres" se distinguen de los crecimientos benignos porque, además de exhibir una proliferación celular agresiva, pueden invadir tejidos circundantes y hacer metástasis. Además, las neoplasias malignas se caracterizan porque muestran una mayor pérdida de diferenciación (mayor "desdiferenciación") y una mayor pérdida de su organización entre sí y entre sus tejidos circundantes. Esta propiedad también se llama "anaplasia". Las neoplasias tratables también incluyen tumores/tumores malignos de fase sólida, es decir, carcinomas, tumores localmente avanzados y sarcomas de tejidos blandos humanos. Los carcinomas incluyen aquellas neoplasias malignas derivadas de células epiteliales que se infiltran (invaden) los tejidos circundantes y dan lugar a cánceres metastásicos, incluidas las metástasis linfáticas.

Los adenocarcinomas son carcinomas derivados de tejido glandular, o que forman estructuras glandulares reconocibles. Otra amplia categoría de cánceres incluye los sarcomas, que son tumores cuyas células están incrustadas en una sustancia fibrilar u homogénea como el tejido conectivo embrionario.

El tipo de cáncer o células tumorales que pueden ser susceptibles de diagnosticar por imágenes incluyen, por ejemplo, cáncer de mama, de colon, de pulmón, y de próstata, cánceres gastrointestinales incluyendo a cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer colorrectal, pólipos asociados con neoplasias colorrectales, cáncer de páncreas y cáncer de vesícula biliar, cáncer de la corteza suprarrenal, tumores productores de ACTH (por sus siglas en inglés), cáncer de vesícula, cáncer de cerebro que incluye tumores de cerebro intrínsecos, neuroblastomas, tumores de cerebro astrocíticos, gliomas, e invasión de células tumorales metastásicas del sistema nervioso central, sarcoma de Ewing, cáncer de cabeza y cuello incluyendo cáncer de boca y cáncer de laringe, cáncer de riñón incluyendo carcinoma de células renales, cáncer de hígado, cáncer de pulmón incluyendo cánceres de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, efusión peritoneal maligna, efusión pleural maligna, cánceres de piel incluyendo melanoma maligno, progresión tumoral de queratinocitos de piel humana, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, y hemangiopericitoma, mesotelioma, sarcoma de Kaposi, cáncer de huesos incluyendo osteomas y sarcomas tales como fibrosarcoma y osteosarcoma, cánceres del tracto reproductivo femenino incluyendo cáncer de útero, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de ovario (células germinales) y tumores sólidos en el folículo ovárico, cáncer de vagina, cáncer de vulva, y cáncer cervical, cáncer de mama (célula pequeña y ductal), cáncer de pene, retinoblastoma, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, neoplasias trofoblásticas, y tumor de Wilms.

También puede ser ventajoso administrar los conjugados marcados con radionucleidos con fármacos que tienen actividad anticancerígena. Ejemplos de fármacos adecuados a este respecto incluyen fluorouracilo, imiquimod, anastrozol, axitinib, belinostat, bexaroteno, bicalutamida, bortezomib, busulfán, cabazitaxel, capecitabina, carmustina, cisplatino, dabrafenib, clorhidrato de daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, eloxati, erlotinib, etopósido, exemestano, fulvestrant, metotrexato, gefitinib, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, ixabepilona, lanalidomida, letrozol, lomustina, acetato de megestrol, temozolomida, vinorelbina, nilotinib, tamoxifeno, oxaliplatino, paclitaxel, raloxifeno, pemetrexed, sorafenib, talidomida, topotecan, vermurafenib, y vincristina.

Los conjugados marcados con radionucleidos también se pueden usar para determinar si un tumor particular tiene uno o más tipos de receptores y, por lo tanto, si un paciente puede beneficiarse de una terapia particular. Por ejemplo, al usar herceptin como una molécula objetivo en el conjugado radiomarcado, se puede probar para la presencia de receptores HER2 en el tumor de un paciente. Si el tumor es HER2-negativo (es decir, no tiene receptores HER2), el agente de diagnóstico por imágenes no se "pegará" al tumor, lo que indica que herceptin puede no ser una terapia útil para el paciente.

Se entenderá que la invención descrita y definida en esta especificación se extiende a todas las combinaciones alternativas de dos o más de las características individuales mencionadas o evidentes a partir del texto o de los dibujos. La totalidad de estas combinaciones diferentes constituyen los diferentes aspectos alternativos de la invención.

Ejemplos

Todos los reactivos y disolventes se obtuvieron de fuentes comerciales estándar y, a menos que se indique lo contrario, se usaron como se recibieron.

Los espectros de ^1H y ^{13}C se registraron con un FT-NMR 400 de Varian o con un FT-NMR 500 de Varian (Varian, California, EE.UU.). Los espectros de ^1H -NMR (por sus siglas en inglés) se tomaron a 400 o 500 MHz y los espectros de ^{13}C -NMR (por sus siglas en inglés) se tomaron a 101 o 125 MHz. Todos los espectros de NMR (por sus siglas en inglés) se registraron a 25°C a menos que se indique lo contrario. Los cambios químicos reportados (en partes por millón) se refieren a la señal residual del disolvente.

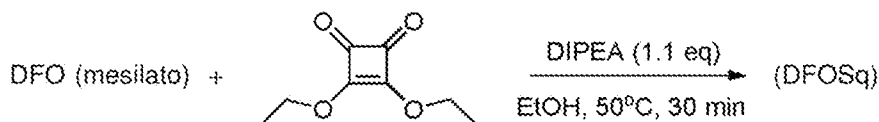
La ESI-MS (por sus siglas en inglés) de muestras no proteicas se registraron en un espectrómetro de masas 6510 ESI-TOF LC/MS de Agilent (Agilent, California, EE.UU.).

La HPLC (por sus siglas en inglés) de fase inversa analítica se realizó en un 1100 Series de Agilent. Las muestras de proteínas se analizaron usando un espectrómetro de masas 6220 ESI-TOF LC/MS de Agilent acoplado a un sistema 1200 LC de Agilent (Agilent, Palo Alto, CA). Todos los datos se adquirieron y la masa de referencia se corrigió a través de una fuente de ionización por electropulverización (ESI, por sus siglas en inglés) de pulverización doble. La adquisición se realizó con el programa informático Agilent Mass Hunter Acquisition versión B.02.01 (B2116.30). Modo de ionización: Ionización por electropulverización; Flujo del gas de secado: 7 L/min; Nebulizador: 35 psi; Temperatura del gas de secado: 325°C; Voltaje del capilar (Vcap): 4000 V; Fragmentador: 300 V; Deflector: 65 V; OCT RFV: 250 V; Intervalo de exploración adquirido: 300-3200 m/z Iones de referencia interna: Modo de ion positivo = m/z = 121,050873 y 922,009798.

La desalación de las proteínas y la separación cromatográfica se realizaron usando una columna Poroshell C18 2,1 x 75 mm, de 5 µm de Agilent con acetonitrilo al 5% (v/v) llevada a restos (0-5 min). Tras la desalación de la muestra, el flujo se volvió a la fuente del ESI (por sus siglas en inglés) para una posterior elución de gradiente con acetonitrilo (5% (v/v) a 100% (v/v))/ácido fórmico al 0,1% durante 8 minutos a 0,25 ml/min. El análisis se realizó usando un Mass Hunter versión B.06.00 con el programa informático BioConfirm usando el algoritmo de deconvolución de proteínas de máxima entropía; paso de masa 1 Da; Factor de línea base 3,00; ancho de pico establecido en incertidumbre.

La HPLC (por sus siglas en inglés) de exclusión por tamaño se realizó en un sistema SCL-10A VP/LC-10 AT VP de Shimadzu con un detector SPD-10A VP UV de Shimadzu seguido de un detector de radiación (base fotomultiplicador modelo 276 de Ortec con preamplificador, preamplificador mate 925-SCINT ACE de Ortec, suministro BIAS y SCA, tubo fotomultiplicador 1M 11/2 de Bicon). Se usó una columna 125 HR SEC 5 µm 7,8 x 300 mm de Biosuite con un caudal de 0,6 ml/min y PBS de Dulbecco con isopropanol al 5% como eluyente. Las Radio-iTLC (por sus siglas en inglés) se analizaron usando un escáner TLC Rita-Star de Raytest.

Síntesis del DFO-escuaramida (DFOSq)



Se agitó una mezcla de Deferoxamina B mesilato (0,20 g, 0,31 mmol) y DIPEA (0,05 ml, 0,3 mmol) en EtOH (6 ml) a 50°C. Después de 1 h, se añadió 3,4-diétoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (0,1 ml, 0,7 mmol) en EtOH (9 ml). Después de otros 30 minutos de agitación a 50°C, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se trituró con EtOH (3 x 10 ml). El producto se secó a vacío para dar DFOSq en forma de un polvo blanco (0,17 g, 83%).

¹H NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz) δ 9,61 (s, 6H), 8,77 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 8,58 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,77 (d, *J* = 4,7 Hz, 5H), 4,64 (p, *J* = 6,9 Hz, 5H), 3,45 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H), 3,38 (s, 5H), 3,26 (dd, *J* = 13,0, 6,6 Hz, 1H), 3,00 (dd, *J* = 12,7, 6,4 Hz, 10H), 2,56 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 2,26 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 1,96 (s, 7H), 1,50 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,42 - 1,31 (m, 3H), 1,24 (ddd, *J* = 20,2, 14,7, 8,0 Hz, 2H); ¹³C NMR (*d*₆-DMSO, 101 MHz) δ 189,39, 189,30, 182,05, 181,84, 176,93, 176,47, 172,58, 172,17, 171,97, 171,30, 170,13, 70,18, 68,77, 68,73, 47,09, 47,01, 46,79, 43,68, 43,39, 39,52, 38,42, 30,10, 29,90, 29,60, 28,82, 27,56, 26,04, 25,82, 23,50, 22,92, 20,35, 15,64; HRMS ESI [*M*+*H*⁺]: 685,3768, calculado para (C₃₁H₅₃N₆O₁₁)⁺: 685,3767, [*M*+Na⁺]: 707,3589, calculado para (C₃₁H₅₂NaN₆O₁₁)⁺: 707,3586.

Radiomarcaje

Se añadió Na₂CO₃ acuoso (2 M, 4,5 µL) a una disolución de ⁸⁹Zr en ácido oxálico 1 M (10 MBq, 10 µL) hasta que el pH aumentó a 10. Luego se añadió tampón HEPES (0,5 M, pH 7,50 µL) y la disolución se dejó reposar durante 5 min. Se confirmó el pH neutro, y luego se añadió una disolución de DFOSq en DMSO (1 µL, 0,18 µmol). Después de 1 h, la finalización de la reacción se confirmó por radio-iTLC (por sus siglas en inglés) (placa de sílice infundida con fibra de vidrio, 20 mM de tampón de citrato de pH 5, producto *R*_f = 0) y SEHPLC (columna BioSuite 125, 5 µm HR SEC 7,8 x 300 mm, 20 mM de PBS de Dulbecco de pH 7 con *i*-PrOH al 5% como eluyente, 0,6 mL/min, tiempo de retención del producto 21,80 min).

Radio-iTLC

En la Figura 4 se muestra el cromatograma del control (es decir, sin DFOSq). Esto muestra que la disolución que contiene circonio se mueve con el frente del disolvente (como se esperaba) cuando no está presente el DFOSq.

En la Figura 5 se muestra el complejo ⁸⁹Zr DFOSq (60 minutos después de la adición del ⁸⁹Zr). Esto muestra que el circonio ahora se ha mantenido en la línea de base (es decir, el "origen") debido a que está complejoado con el DFOSq.

HPLC de exclusión por tamaño

En la Figura 6 se muestran los cromatogramas de UV-Visible (a dos longitudes de onda de absorción diferentes de 280 y 254 nm) y el cromatograma de radiación (obtenido usando un contador Geiger como detector) del control.

En la Figura 7 se muestran los cromatogramas de UV-Visible y el cromatograma de radiación del complejo ^{89}Zr DFOSq (78 horas después de la adición del ^{89}Zr).

Síntesis y análisis del ^{89}Zr DFOSq-cRGDfK

- 5 Se añadió una disolución de DFOSq (5 mg, 7 μmol) en DMSO (35 μL) a cRGDfK (3 mg, 5 μmol) en tampón de borato de pH 9 (0,5 M, 965 μL). La mezcla de reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 días, luego se purificó por HPLC (por sus siglas en inglés) semipreparativa (columna C18 de ProteCol) a DFOSq-cRGDfK en forma de un sólido blanco (0,002 g, 32%).

HRMS ESI $[\text{M}+\text{H}^+]$: 604,3196, calculado para $(\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_9\text{O}_7)^+$: 604,3202, $[\text{M}+2\text{H}^+]$: 302,6637, calculado para $(\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_7)_2^+$: 302,6638.

- 10 Para el radiomarcaje, se añadió Na_2CO_3 acuoso (2 M, 4,5 μL) a una disolución de ^{89}Zr en 1M de ácido oxálico (10 MBq, 10 μL) hasta que el pH aumentó a 10. Luego se añadió tampón HEPES (0,5 M, pH 7, 50 μL) y se dejó reposar la disolución durante 5 min. Se confirmó pH neutro, y luego se añadió una disolución de DFOSq-cRGDfK en H_2O (10 μL , 0,008 μmol). Después de 70 minutos, se confirmó la finalización de la reacción por radio-iTLC (por sus siglas en inglés) (placa sílice infundida con fibra de vidrio, tampón de citrato 0,1 M y pH 6 como eluyente, producto $R_f = 0$).
- 15 En la Figura 8 se muestra el cromatograma de radio-iTLC (por sus siglas en inglés) del DFOSq-cRGDfK marcado con ^{89}Zr (tomado 60 minutos después de la adición del ^{89}Zr).

Síntesis y análisis de la ^{89}Zr DFOSq-transferrina

- 20 Se añadió una disolución de DFOSq (0,17 mg, 0,25 μmol) en DMSO/ H_2O (1:10, 26 μL) a una disolución de holotransferrina humana (1,0 mg, 0,013 μmol) en tampón de borato de pH 9 (0,5 M, 974 μL). La mezcla de reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante 17 h, y luego se filtró usando filtros de centrífuga de 10 kDa de Amicon. El producto bruto se lavó con una disolución de NaCl (0,9% p/v, 2 x 400 μL) y el concentrado se recogió para dar DFOSq-transferrina (1,25 mg, 0,012 μmol). El producto se analizó por LCMS (por sus siglas en inglés) (Columna Poroshell C18 5 μm 2,1 x 75 mm de Agilent), que indicaba una mezcla de transferrina (Tf) con 2-8 agentes quelantes, y un promedio de 4,5 agentes quelantes/proteína (ver Figura 9).

- 25 Para el radiomarcaje, se añadió Na_2CO_3 acuoso (2 M, 10 μL) a una disolución de ^{89}Zr en ácido oxálico 1M (1,2 MBq, 20 μL) hasta que el pH aumentó a 10. Luego se añadió tampón HEPES (0,5 M, pH 7, 30 μL) y la disolución se dejó reposar durante 5 min. Se confirmó el pH neutro, y luego se añadió una disolución de DFOSq-Tf en NaCl al 0,9% (2 μL , 100 g). Después de 20 min, la reacción se completó y se confirmó por radio-iTLC (por sus siglas en inglés) (placa de sílice infundida con fibra de vidrio, tampón de citrato 0,1 M y pH 6 como eluyente, producto $R_f = 0$) y SEHPLC (columna 125, 5 μm HR SEC 7,8 x 300 mm de BioSuite, PBS de Dulbecco 20 mM y pH 7 con *i*-PrOH al 5% como eluyente, tiempo de retención del producto 12,56 min).
- 30

En la Figura 10 se muestra el cromatograma de radio-iTLC (por sus siglas en inglés) de la DFOSq-Tf marcada con ^{89}Zr (tomado 20 minutos después de la adición del ^{89}Zr).

- 35 En la Figura 11 se muestran los cromatogramas de UV-Visible y el cromatograma de radiación de la DFOSq-Tf marcada con ^{89}Zr (20 minutos después de la adición del ^{89}Zr).

Síntesis y análisis del ^{89}Zr DFOSq-herceptin en ratones portadores del tumor BT474 - estudio 1

- 40 Se añadió una disolución de DFOSq (0,46 mg, 0,67 μmol) en DMSO/ H_2O (1:10, 228 μL) a una disolución de trastuzumab grado clínico (5,0 mg, 0,034 μmol), y se dejó la mezcla de reacción en reposo a temperatura ambiente en tampón de borato de pH 9 (0,5 M, volumen total 1,0 mL). Después de 16 h, la disolución se concentró usando filtros de centrífuga de 50 kDa de Amicon. El filtro se usó para luego lavar el producto crudo con disolución de NaCl/DMSO (NaCl al 0,9% p/v, DMSO al 5%, 4 x 400 μL) seguido de disolución de NaCl (0,9% p/v, 400 μL), y el concentrado se recogió para dar DFOSq-herceptin (1,4 mg, 0,0093 mol, 28%). El producto se analizó por LCMS (por sus siglas en inglés) (columna Poroshell C18, 5 μm 2,1 x 75 mm de Agilent), que indicaba una mezcla de Herceptin (Herc) con 2-7 agentes quelantes, y un promedio de 4,5 agentes quelantes/anticuerpo (ver Figura 12).

- 45 Para el radiomarcaje, se añadió Na_2CO_3 acuoso (2 M, 25 μL) a una disolución de ^{89}Zr en ácido oxálico 1 M (55 MBq, 75 μL) hasta que el pH aumentó a 10. Luego se añadió tampón HEPES (0,5 M, pH 7, 100 μL) y la disolución se dejó reposar durante 5 min. Se confirmó el pH neutro, luego se añadió una disolución de DFOSq-Herc en NaCl al 0,9% (4 μL , 225 g). Después de 25 min, se confirmó la finalización de la reacción por radio-iTLC (por sus siglas en inglés) (placa sílice infundida con fibra de vidrio, tampón de citrato 0,1 M y pH 6 como eluyente, producto $R_f = 0$). La mezcla de reacción se purificó en una columna de exclusión de tamaño PD-10 usando PBS de pH 7 (20 mM, con gentisato de sodio al 5%) como eluyente. Después de cargar la columna, se descartó flujo a través de la misma y se recogió la primera fracción (1,5 ml, 45 MBq). El producto se analizó por radio-iTLC (por sus siglas en inglés) y SEHPLC (por sus siglas en inglés) (columna 125, 5 μm HR SEC 7,8 x 300 mm de BioSuite, PBS de Dulbecco 20 mM y pH 7 con *i*-PrOH al 5% como eluyente, tiempo de retención del producto 12,55 min).
- 50

En la Figura 13 se muestra el cromatograma de radio-iTLC (por sus siglas en inglés) del DFOSq-Herc marcado con ^{89}Zr (tomado 25 minutos después de la adición del ^{89}Zr).

En la Figura 14 se muestra el cromatograma de radio-iTLC (por sus siglas en inglés) del DFOSq-Herc marcado con ^{89}Zr purificado.

- 5 En la Figura 15 se muestran los cromatogramas de UV-Visible y el cromatograma de radiación del DFOSq-Herc frío (es decir, sin marcar).

En la Figura 16 se muestran los cromatogramas UV-Visible y el cromatograma de radiación del DFOSq-Herc marcado con ^{89}Zr (tomado 24 horas después de la purificación).

Diagnóstico por imágenes del ratón usando ^{89}Zr DFOSq-herceptin

- 10 Se prepararon dos dosis de $^{89}\text{ZrDFOSq-Herceptin}$ en PBS 20 mM (pH 7) con gentisato de sodio al 5% (200 μL , 6,0 MBq cada una) y se administraron a ratones portadores del tumor BT474 por inyección en la vena de la cola. Las imágenes por PET se tomaron a intervalos de 22 horas, 46 horas, 94 horas y 8 días después de la administración (ver Figuras 17 y 18).

- 15 La siguiente tabla (Tabla 1) establece el valor de captación estandarizado (SUV, por sus siglas en inglés) para cada ratón a cada tiempo.

Tabla 1. Valores de captación estandarizados máximos (SUVs, por sus siglas en inglés) de tumores para ratones portadores del tumor BT474 usando ^{89}Zr DFOSq-herceptin

Tiempo posterior a la administración	SUV _{max} del Ratón 1	SUV _{max} del Ratón 2
22 h	10,76	11,62
46 h	16,17	16,24
94 h	21,97	25,79
8 d	31,73	37,21

- 20 También se realizó un estudio comparativo para comparar la eficacia de un compuesto de fórmula (I) (específicamente, $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-escuarato-trastuzumab})$) como agente de diagnóstico por imágenes de tumores, con otros dos agentes de diagnóstico por imágenes ($^{89}\text{Zr}(\text{DFO-maleimida-trastuzumab})$ y $^{90}\text{ZrCl}$). El $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-maleimida-trastuzumab})$ se preparó disolviendo un exceso de 50 veces de DFO-maleimida en agua, y añadiéndola a trastuzumab (Herceptin) en tampón de PBS. La DFO-maleimida sin reaccionar se eliminó por filtración por centrifugación y el conjugado purificado se radiomarcó con $^{89}\text{Zr}(\text{ox})_4$ como se describió anteriormente para el DFO-escuarato.

- 25 A los ratones con tumores HER2-positivos se les inyectaron dos dosis de una disolución que contenía $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-escuarato-trastuzumab})$, $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-maleimida-trastuzumab})$ o $^{89}\text{ZrCl}$, en PBS 20 mM (pH 7) con gentisato sódico al 5% (200 μL , 6,0 MBq cada una). Las imágenes mediante PET se tomaron a intervalos de 22 horas, 46 horas, 94 horas y 8 días después de la administración con respecto al ratón tratado con $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-escuarato-trastuzumab})$, y a las 24 horas para los ratones tratados con $^{89}\text{Zr}(\text{DFO-maleimida-trastuzumab})$ y $^{89}\text{ZrCl}$ (ver Figuras 1, 2 y 3, respectivamente).

- 30 Estudio del diagnóstico por imágenes con ^{89}Zr DFOSq-herceptin en ratones portadores del tumor BT474 - estudio 2

- 35 Se diluyó trastuzumab (2 mg) en tampón de borato a pH 9,0 (0,5 M, 355 μL) y se añadió una disolución de DFOSq en DMSO (1 mg/ml, 45 μL , 5 eq). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 40 h, y se purificó usando un filtro de centrífuga de 50 kDa de Amicon, se lavó con DMSO al 4% en disolución salina (3 x 300 μL), seguido de disolución salina solamente (300 μL). El análisis de ESI MS (por sus siglas en inglés) del conjugado purificado indicó 0-5 uniones de agentes quelantes, con un promedio de 2 agentes quelantes/mAb. La disolución de DFOSq-trastuzumab purificada se usó inmediatamente para el radiomarcado.

Radiomarcaje con ^{89}Zr del DFOSq-trastuzumab

- 40 Se diluyó una disolución de ^{89}Zr en ácido oxálico 1 M (150 MBq, 112 μL) con agua MilliQ (250 μL) y se añadió Na_2CO_3 acuoso (2 M, 32,5 μL) en pequeñas porciones hasta que el pH aumentó a 7. Luego se añadió tampón HEPES (0,5 M, pH 7, 120 μL) y la disolución se dejó reposar durante 5 min. Se añadió DFOSq-trastuzumab en NaCl al 0,9% (56 μL , 675 μg). Después de 30 minutos, se confirmó la finalización de la reacción por radio-iTLC (por sus siglas en inglés) (placa sílice infundida con fibra de vidrio, tampón de citrato de 0,1 M y pH 6 como eluyente, producto $R_f = 0$). La mezcla de reacción se purificó en una columna de exclusión de tamaño PD-10 usando PBS de Dulbecco a pH 7 (20 mM, con gentisato de sodio al 5%) como eluyente. Después de la carga de la columna, se descargó flujo a través de la misma y se recogieron dos fracciones (Fracción A: 0,5 mL, Fracción B: 1,0 mL, 90,2 MBq). La fracción B se analizó por SE-HPLC (por sus siglas en inglés) (columna 125, 5 μm HR SEC 7,8 x 300 mm de BioSuite, PBS de Dulbecco 20 mM a pH 7 con *i*-PrOH al 5% como eluyente, tiempo de retención del producto ~12,5 min).

⁸⁹Zr-DFOSq-trastuzumab: Diagnóstico por imágenes mediante PET de ratón (BT474)

Se extrajeron cuatro dosis (7,5 MBq cada una) de la disolución de mAb purificada y se administraron a ratones NOD/SCID portadores del tumor BT474. Se realizó un diagnóstico por imágenes mediante PET a las 24, 48 y 96 horas. Los ratones se recogieron a las 96 horas para los datos de biodistribución.

- 5 Tabla 2. Valores estandarizados de captación máximos (SUVs, por sus siglas en inglés) de tumores para ratones portadores del tumor BT474 usando ⁸⁹Zr-DFOSq-trastuzumab.

	Ratón n.º 3	Ratón n.º 5	Ratón n.º 6	Ratón n.º 7
24 h	8,7	11,4	12,2	9,5
48 h	11,6	14,4	12,9	11,0
96 h	10,8	11,5	9,9	9,1

Síntesis, análisis y diagnóstico por imágenes del ⁸⁹Zr DFOSq-herceptin en ratones portadores del tumor SKOV3 o LS174T

Conjugación de DFOSq a trastuzumab

- 10 Se diluyó trastuzumab (10 mg) en tampón de borato a pH 9,0 (0,5 M, 1,5 mL), y se añadió una disolución de DFOSq en DMSO (2 mg/mL, 455 µL, 16 eq). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante la noche, y se purificó usando un filtro de centrifuga de 50 kDa de Amicon, lavando con DMSO al 4% en disolución salina (2 x 300 µL), seguido de disolución salina solamente (300 µL). El análisis mediante ESI MS (por sus siglas en inglés) del conjugado purificado indicó 1-6 uniones de agentes quelantes con un promedio de 3,4 agentes quelantes/mAb. La disolución de DFOSq-trastuzumab purificada se almacenó a 4°C durante 8-9 días antes del radiomarcado.
- 15

Radiomarcaje con ⁸⁹Zr del DFOSq-trastuzumab

- Se diluyó una disolución de ⁸⁹Zr en ácido oxálico 1 M (150 MBq, 195 µL) con agua MilliQ (350 µL) y se añadió Na₂CO₃ (2 M, 65 µL) en pequeñas porciones hasta que el pH aumentó a 8. Luego se añadió tampón HEPES (0,5 M, pH 7, 200 µL) y la disolución se dejó reposar durante 5 min. Se añadió DFOSq-trastuzumab en NaCl al 0,9% (8 µL, 675 µg).
- 20 Después de 1 h, se confirmó la finalización de la reacción por radio-ITLC (por sus siglas en inglés) (placa de sílice infundida con fibra de vidrio, tampón de citrato de pH 6 y 0,1 M como eluyente, producto R_f = 0). La mezcla de reacción se purificó en una columna de exclusión de tamaño PD-10 usando PBS de Dulbecco a pH 7 (20 mM, con gentisato de sodio al 5%) como eluyente. Después de la carga de la columna, se descargó flujo a través de la misma y se recogió la primera fracción (1,0 mL, 54 MBq). El producto se analizó por SEHPLC (por sus siglas en inglés) (Columna 125, 5 µm HR SEC 7,8 x 300 mm de BioSuite, PBS de Dulbecco de 20 mM y pH 7 con *i*-PrOH al 5% como eluyente, tiempo de retención del producto ~12,5 min).
- 25

- Se diluyó una disolución de ⁸⁹Zr en ácido oxálico 1 M (145 MBq, 195 µL) con agua MilliQ (400 µL) y se añadió Na₂CO₃ acuoso (2 M, 75 µL) en pequeñas porciones hasta que el pH aumentó a 10. Luego se añadió tampón HEPES (0,5 M, pH 7, 250 µL) y luego la disolución se dejó reposar durante 5 min. Se añadió DFOSq-trastuzumab en NaCl al 0,9% (8 µL, 675 µg). Después de 1,5 h, se confirmó la finalización de la reacción por radio-ITLC (por sus siglas en inglés) (placa de sílice infundida con fibra de vidrio, tampón de citrato de pH 6 y 0,1 M como eluyente, producto R_f = 0). La mezcla de reacción se purificó en una columna de exclusión de tamaño PD-10 usando PBS de Dulbecco a pH 7 (20 mM, con gentisato de sodio al 5%) como eluyente. Después de la carga de la columna, se descargó un flujo de 1 mL a través de la misma y se recogió la primera fracción (1,0 mL, 47 MBq). El producto se analizó por SEHPLC (por sus siglas en inglés) (Columna 125, 5 µm HR SEC 7,8 x 300 mm de BioSuite, PBS de Dulbecco de 20 mM y pH 7 con *i*-PrOH al 5% como eluyente, tiempo de retención del producto ~12,5 min). Se supone que la señal a 11 minutos se debe a la aglomeración de anticuerpos como resultado de la agitación durante el almacenamiento antes del radiomarcado.
- 30
- 35

⁸⁹Zr-DFOSq-trastuzumab: diagnóstico por imágenes mediante PET de ratón (SKOV3)

- Se extrajeron tres dosis (7,5 MBq cada una) de la disolución de mAb purificada y se administraron a ratones NOD/SCID portadores del SKOV3. El diagnóstico por imágenes mediante PET se realizó a las 24, 48 y 96 horas. Los ratones se recogieron a las 96 horas para los datos de biodistribución.
- 40

Tabla 3. Valores estandarizados de captación (SUVs, por sus siglas en inglés) de tumores para ratones portadores del tumor SKOV3 usando ⁸⁹Zr-DFOSq-trastuzumab.

	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 4
24 h	5,27	6,32	4,68
48 h	6,78	7,37	5,80
96 h	4,87	7,59	4,97

Tabla 4. Datos de biodistribución de ratones SKOV3 usando ^{89}Zr -DFOSq-trastuzumab. Valores dados en % n.º/g.

Órgano	Ratón n.º 1	Ratón n.º 2	Ratón n.º 4	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media
Sangre	1,10	1,78	0,47	1,12	0,65	0,33
Pulmones	4,17	3,30	1,96	3,14	1,11	0,56
Corazón	1,32	1,67	6,38	3,12	2,83	1,41
Hígado	9,26	11,02	9,60	9,96	0,94	0,47
Riñones	3,53	4,07	3,14	3,58	0,47	0,23
Musculo	0,55	0,57	0,34	0,49	0,13	0,06
Bazo	77,40	106,48	118,20	100,69	21,00	10,50
Tumor	15,81	18,26	12,37	15,48	2,96	1,48

^{89}Zr -DFOSq-trastuzumab: diagnóstico por imágenes mediante PET de ratón (LS174T)

- 5 Se extrajeron tres dosis (7,5 MBq cada una) de la disolución de mAb purificada y se administraron a ratones desnudos BALB/c portadores del tumor LS174T. El diagnóstico por imágenes mediante PET se realizó a las 24, 48 y 96 horas. Los ratones se recogieron a las 96 horas para los datos de biodistribución.

Tabla 5. Valores de captación estandarizados de tumores para ratones portadores de tumores LS174T usando ^{89}Zr -DFOSq-trastuzumab

	Ratón 5	Ratón 6	Ratón 7
24 h	3,10	3,32	3,07
48 h	3,70	3,73	4,04
96 h	4,72	5,32	5,65

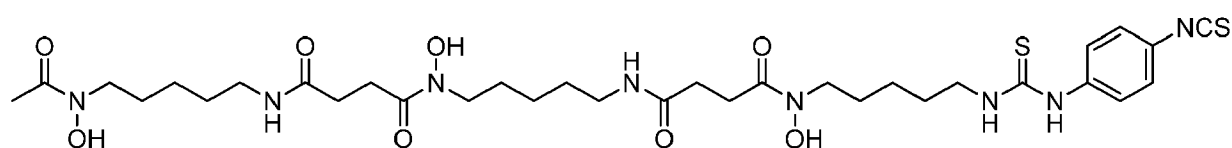
10

Tabla 6. Datos de biodistribución de ratones LS174T usando ^{89}Zr -DFOSq-trastuzumab. Valores dados en % n.º/g.

Órgano	Ratón n.º 5	Ratón n.º 6	Ratón n.º 7			
Sangre	12,82	12,24	11,49	12,18	0,66	0,38
Pulmones	7,99	7,04	7,38	7,47	0,48	0,28
Corazón	4,85	4,41	4,61	4,62	0,22	0,13
Hígado	6,37	7,88	4,58	6,28	1,65	0,95
Riñones	6,24	8,78	6,06	7,03	1,52	0,88
Musculo	1,34	1,37	1,23	1,31	0,08	0,04
Bazo	17,89	5,53	6,50	9,97	6,88	3,97
Tumor	13,11	12,47	13,67	13,08	0,60	0,35

Síntesis, análisis y diagnóstico por imágenes del ^{89}Zr DFO-Ph-NCS-herceptin en ratones portadores del tumor SKOV3

Síntesis del DFOPhNCS



(DFOPhNCS)

15

Se agitó deferoxamina (203 mg, 0,309 mmol) en *i*-PrOH/H₂O (32:3 mL), y se añadió una disolución de Ph(NCS)₂ (271 mg, 1,41 mmol) en CHCl₃ (20 ml). Se añadió inmediatamente trietilamina (100 µL, 0,717 mmol), y la mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente. Se añadió HCl (0,1 M, 25 ml) y se separó la capa orgánica. Se evaporó el disolvente para dar un sólido de color beige que se trituró con CH₂Cl₂. El sólido restante se separó por filtración y se secó para dar DFOPhNCS en forma de un polvo blanco (207 mg, 89%). ESIMS [M+H]⁺: 753,34, calculado para (C₃₃H₅₃N₈O₈S₂)⁺: 753,34. HPLC analítico: Método A, tiempo de retención 8,95 min. ¹H NMR (500 MHz, dmsO) δ 7,98 (s, 1H), 7,78 (s, 2H), 7,57 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,36 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 3,52 – 3,39 (m, *J* = 13,9, 7,0 Hz, 8H), 3,00 (dd, *J* = 12,7, 6,5 Hz, 4H), 2,61 - 2,54 (m, *J* = 3,9 Hz, 4H), 2,31 - 2,24 (m, *J* = 10,4, 5,4 Hz, 4H), 1,96 (s, 3H), 1,59 - 1,45 (m, *J* = 22,1, 14,6, 7,3 Hz, 8H), 1,42 - 1,33 (m, 4H), 1,30 - 1,16 (m, *J* = 18,8, 15,3, 7,1 Hz, 8H),

10 Conjugación del DFOPhNCS con trastuzumab

Procedimiento seguido directamente de Vosjan, M. J. W. D.; Perk, L. R.; Visser, G. W. M.; Budde, M.; Jurek, P.; Kiefer, G. E.; Van Dongen, G. A. M. S., Nat. Protocols 2010, 5 (4), 739-743.

Se diluyó trastuzumab (3,03 mg) en disolución salina (1 mL), y la disolución se ajustó a pH 9 con Na₂CO₃ 0,1 M. Se añadió un exceso de tres veces de DFOPhNCS en DMSO (2,3 mg/ml, 20 µL) a la disolución de mAb en porciones con agitación suave constante. La mezcla se incubó a 37°C a 550 rpm durante 30 minutos, y se purificó en una columna PD-10 usando ácido genticóico (5 mg/mL)/acetato de sodio (0,25 M) (pH 5,5) como eluyente. La disolución de DFOPhNCS-mAb purificada se almacenó a -20°C durante 5 días antes del radiomarcado. El análisis mediante ESI MS (por sus siglas en inglés) del conjugado indicó uniones de 0-1 agentes quelantes, con un promedio de 0,2 agentes quelantes/mAb.

20 Radiomarcado con ⁸⁹Zr de DFOPhNCS-trastuzumab

Procedimiento seguido directamente de Vosjan, M. J. W. D. et al. (arriba).

Se añadió Na₂CO₃ (2 M, 90 µL) a una disolución de ⁸⁹Zr (200 µL, 55 MBq) en ácido oxálico (1 M). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante tres minutos con agitación suave. Luego se añadió tampón HEPES (0,5 M, pH 7,2, 300 µL), seguido por la disolución de DFOPhNCS-trastuzumab (710 µL), luego tampón HEPES (0,5 M, pH 7,0, 700 µL). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente con agitación suave frecuente. El análisis mediante iTLC (ácido cítrico 20 mM, pH 5 como eluyente) se realizó a varios tiempos para monitorear el progreso del radiomarcado (1 h: 30% marcado, 1,5 h: 53% de marcado, 2 h: % de marcado).

Después de 2 h de tiempo de reacción, la mezcla se purificó usando una columna PD-10 acondicionada con acetato de sodio fresco (0,25 M)/ácido genticóico (5 mg/ml), pH 5-6. El ⁸⁹Zr-DFOPhNCS-trastuzumab purificado (1 mL, 21,8 MBq) se analizó mediante iTLC (por sus siglas en inglés) y SEC-HPLC (por sus siglas en inglés).

⁸⁹Zr-DFOPhNCS-trastuzumab: diagnóstico por imágenes mediante PET de ratón SKOV3

Se extrajeron tres dosis (3,5 MBq cada una) de la disolución de mAb purificada y se administraron a ratones NOD/SCID portadores del tumor SKOV3. El diagnóstico por imágenes mediante PET se realizó a las 24, 48 y 96 horas. Los ratones se recogieron a las 96 horas para los datos de biodistribución.

35 Tabla 7. Datos de biodistribución de ratones con SKOV3 usando ⁸⁹Zr-DFOPhNCS-trastuzumab

n.º Ratón	Tiempo	SUVmax	Tmax: Bav	Liverav	Tmax: Liverav	Boneav	Tmax: Boneav
16	24	3,53	3,41	0,39	1,34	0,17	3,09
	48	3,47	4,26	0,37	1,41	0,18	2,88
	96	2,20	4,24	0,41	1,03	0,21	2,02
28	24	5,48	3,96	0,51	1,61	0,19	4,26
	48	5,89	5,12	0,47	1,91	0,18	4,86
	96	4,19	6,09	0,42	1,89	0,21	3,72
33	24	5,30	4,07	0,53	1,48	0,17	4,70
	48	4,62	3,71	0,50	1,40	0,17	4,20
	96	3,86	5,36	0,60	1,23	0,22	3,37

Estudio de competencia 1

Síntesis de derivados del DFO-cRGDfK

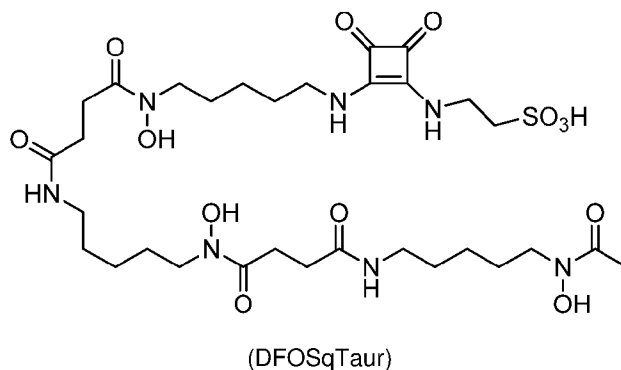
Se aumentó a pH 9 una disolución acuosa de cRGDfK (100 μ L, 2 mg, 2 μ mol) usando una disolución de carbonato de sodio. Una disolución de DFOSq en DMSO (100 μ L, 2 eq) en tampón de borato de pH 9 (0,5 M, 100 μ L). La mezcla de reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche, luego se purificó mediante HPLC (por sus siglas en inglés) semi-preparativa (columna C18 de ProteCol, H₂O/MeCN, TFA al 0,1%) y se liofilizó para dar DFOSq-cRGDfK como un sólido blanco. Se preparó DFOPhNCS-cRGDfK a partir de DFO-Ph-NCS usando el mismo procedimiento, sin embargo, debido a la precipitación, se centrifugó antes de la purificación y solo se purificó el material soluble. Se preparó una disolución acuosa de cada derivado de DFO-cRGDfK a concentraciones iguales, y esto se confirmó mediante valoración del Fe³⁺ usando espectrometría UV-Visible (425 nm).

Experimento de competencia

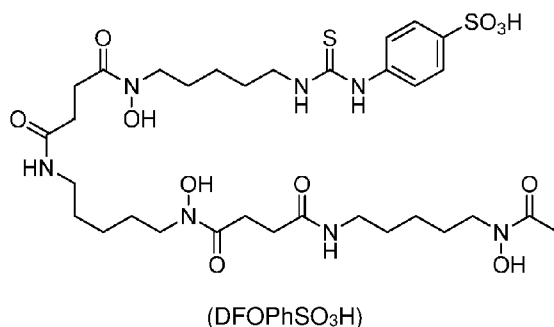
Se diluyó una disolución de ⁸⁹Zr (2 μ L, ~2 MBq) en ácido oxálico 1 M con H₂O (50 μ L) y se neutralizó usando Na₂CO₃ 2M (1 μ L), entonces se tamponó con tampón HEPES de pH 7,4 (5 μ L). Luego se añadió una pequeña cantidad de la disolución de Zr tamponada (5 μ L) a cada disolución de DFO-cRGDfK (50 μ L cada una). Después de 20 minutos, se confirmó la finalización de la reacción por radio-iTLC (por sus siglas en inglés). Cada muestra se analizó mediante HPLC (por sus siglas en inglés) (columna Phenomenex Luna) como estándar. El ligando DFOPhNCS-cRGDfK eluye a los 20,1 minutos, el complejo Zr a los 18,5 minutos (Figura 39). El ligando DFOSq-cRGDfK eluye a los 18,0 minutos, el complejo Zr a los 15,5 minutos (Figura 40). Una impureza no identificada en la disolución de ligando DFOSq-cRGDfK también se eluyó a los 18,0 minutos, sin embargo, esto no se unió al Zr.

Se preparó una disolución de ambos ligandos en concentraciones iguales (40 μ L cada una) y se mezcló completamente, y se añadió 5 μ L de la disolución de Zr tamponada. La mezcla de reacción se analizó después de 45 minutos mediante HPLC (por sus siglas en inglés), e indicó la formación de exclusivamente el complejo ZrDFOSq-cRGDfK (Figura 41).

Estudio de competencia 2

Síntesis de derivados del DFO-SO₃H: DFOSqTaur

Se añadió una pequeña cantidad de trietilamina (5 gotas) a una disolución de taurina (18 mg, 0,14 mmol) en H₂O. Se disolvió DFOSq (100 mg, 0,15 mmol) en DMSO y se añadió a la disolución de taurina, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se evaporó el disolvente y el material bruto se disolvió en H₂O con calentamiento suave, y se eliminó cualquier DFOSq sin reaccionar por centrifugación. El disolvente se evaporó para dar un polvo blanco. Las Figuras 42 y 43 muestran los espectros de ¹H NMR (por sus siglas en inglés) y de ESI-MS (por sus siglas en inglés) de la DFOSqTaur.

Síntesis de DFO-SO₃H derivados: DFOPhSO₃H

- 5 Se añadió una pequeña cantidad de trietilamina (5 gotas) a una disolución de la sal sódica monohidrato del 4-sulfofenil isotiocianato (38 mg, 0,15 mmol) en MeOH. Se añadió DFO mesilato (100 mg, 0,15 mmol) a la disolución, y se añadió H₂O (1 mL) para mejorar la solubilidad. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó por evaporación, y el polvo blanco crudo se lavó a fondo con MeOH a 40°C para dar el producto como un polvo blanco. Las Figuras 44 y 45 muestran los espectros de ¹H NMR (por sus siglas en inglés) y de ESI-MS (por sus siglas en inglés) del DFOPhSO₃H.

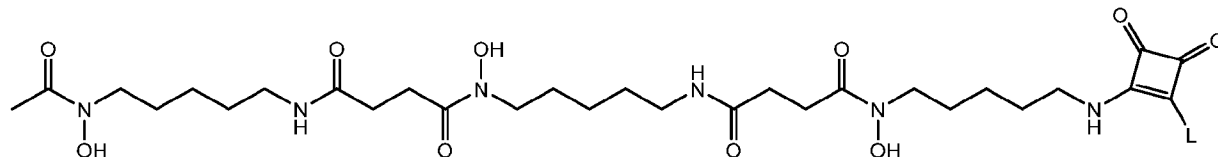
Experimento de competencia

- 10 Se preparó una disolución madre 3 mM de cada ligando, DFOPhSO₃H y DFOSqTaur, en una mezcla de H₂O y MeOH (las concentraciones se confirmaron antes de la dilución mediante valoración del Fe³⁺ UV-Visible en H₂O, 430 nm). Se mezcló completamente una mezcla de ambas disoluciones (25 uL cada una) y se calentó a 50°C. Se preparó también una disolución madre de ZrCl₄(THF)₂ en H₂O/MeOH (3 mM), y se añadieron 20 uL de esto a la mezcla del ligando. La mezcla se incubó a 50°C durante 7 horas. El análisis mediante ESI-MS (por sus siglas en inglés) de la mezcla a las 7 h (Figura 46) indicó la presencia del complejo ZrDFOSqTaur (Figura 46), [M] + m/z (calc) = 850,22

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado formado por la reacción de

- un compuesto de fórmula (I):



5

(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y

- una molécula objetivo;

en donde la molécula objetivo es un anticuerpo;

10

en donde L es un grupo saliente seleccionado de azida, halógeno, cianato y OR, en donde R se selecciona de alquilo de C₁ a C₁₀, heteroalquilo de C₁ a C₁₀, alqueno de C₂ a C₁₀, alquino de C₂ a C₁₀, y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; u OR se selecciona de O-*p*-toluensulfonato, O-bencenosulfonato y O-*m*-nitrobencenosulfonato.

2. El conjugado de la reivindicación 1, en donde L es OR.

3. El conjugado de la reivindicación 2, en donde R es alquilo de C₁ a C₆.

15

4. El conjugado de la reivindicación 1, en donde OR se selecciona de O-*p*-toluensulfonato, O-metanosulfonato, O-trifluorometanosulfonato, O-bencenosulfonato, y O-*m*-nitrobencenosulfonato.

5. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo se selecciona de trastuzumab, rituximab y cetuximab.

6. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo se selecciona de ranibizumab, bevacizumab, fresolimumab, panitumumab, pertuzumab, y ofatumumab.

20

Figura 1

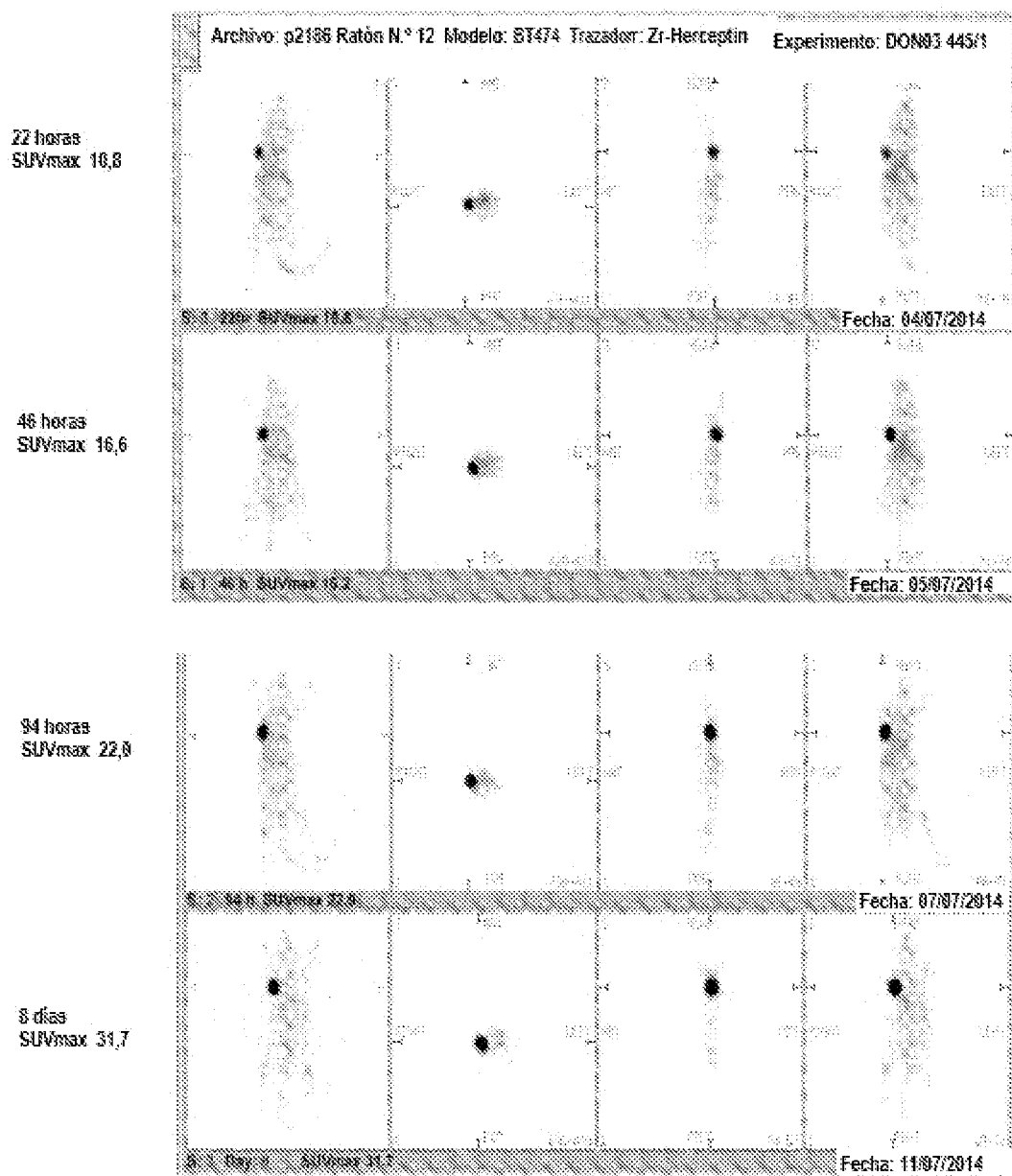


Figura 2

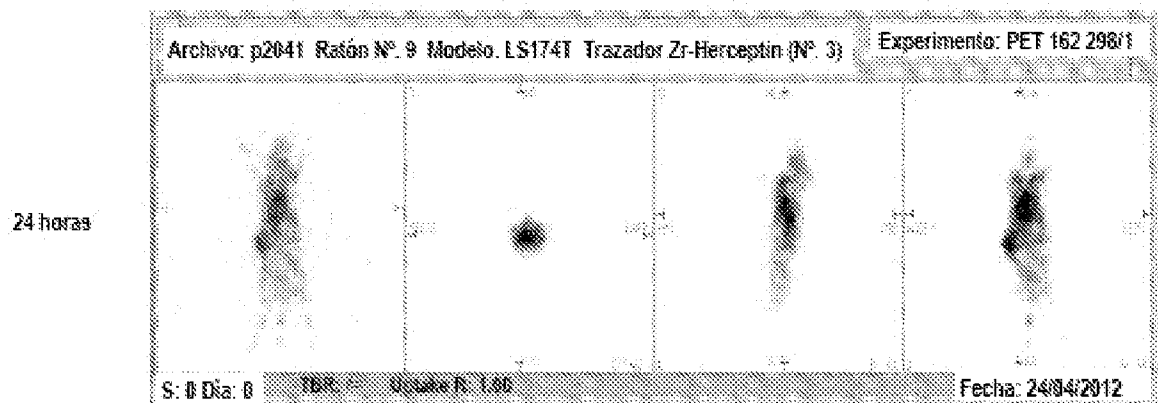


Figura 3

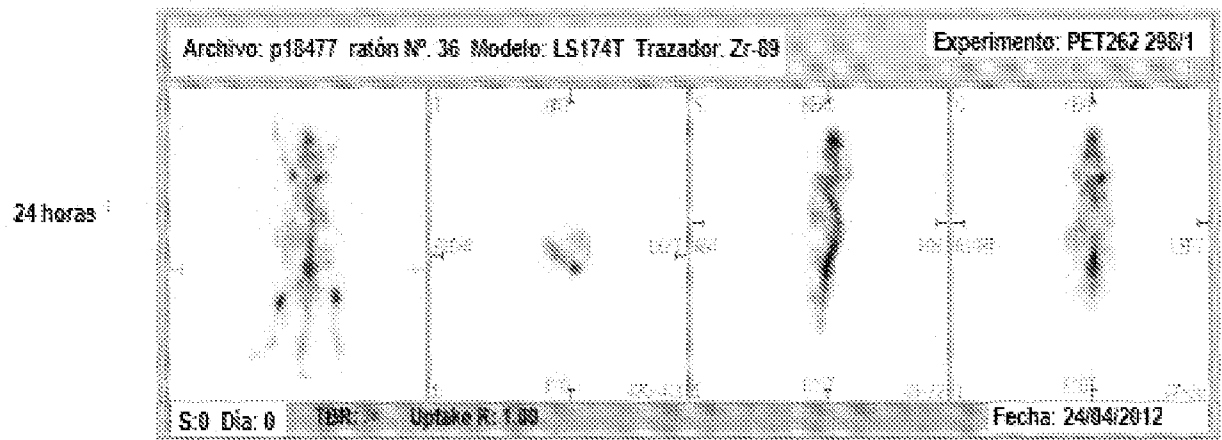


Figura 4

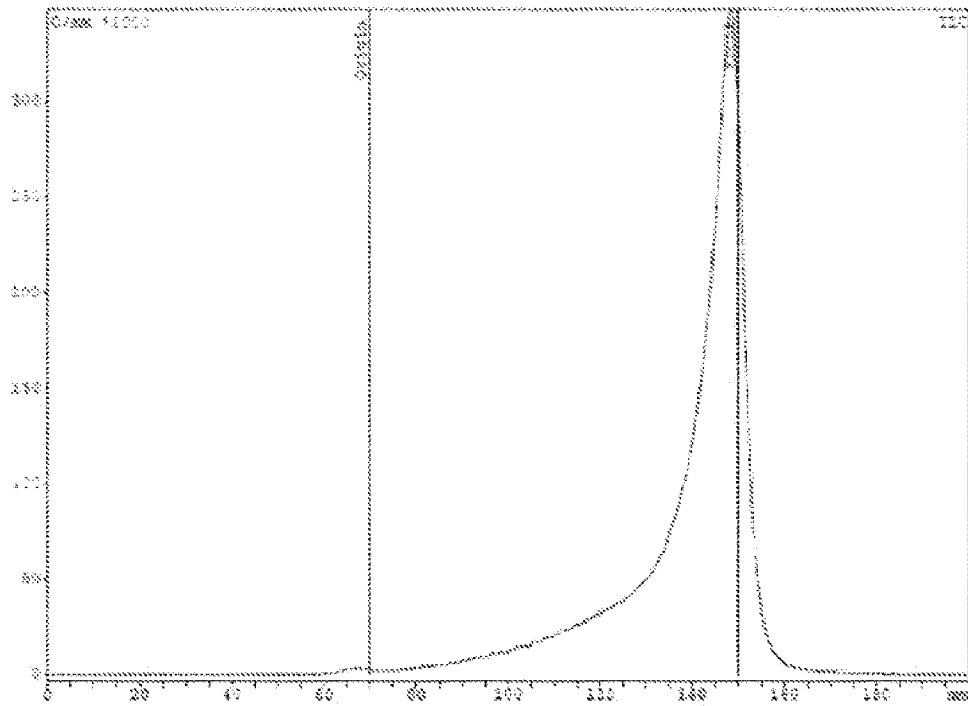


Figura 5

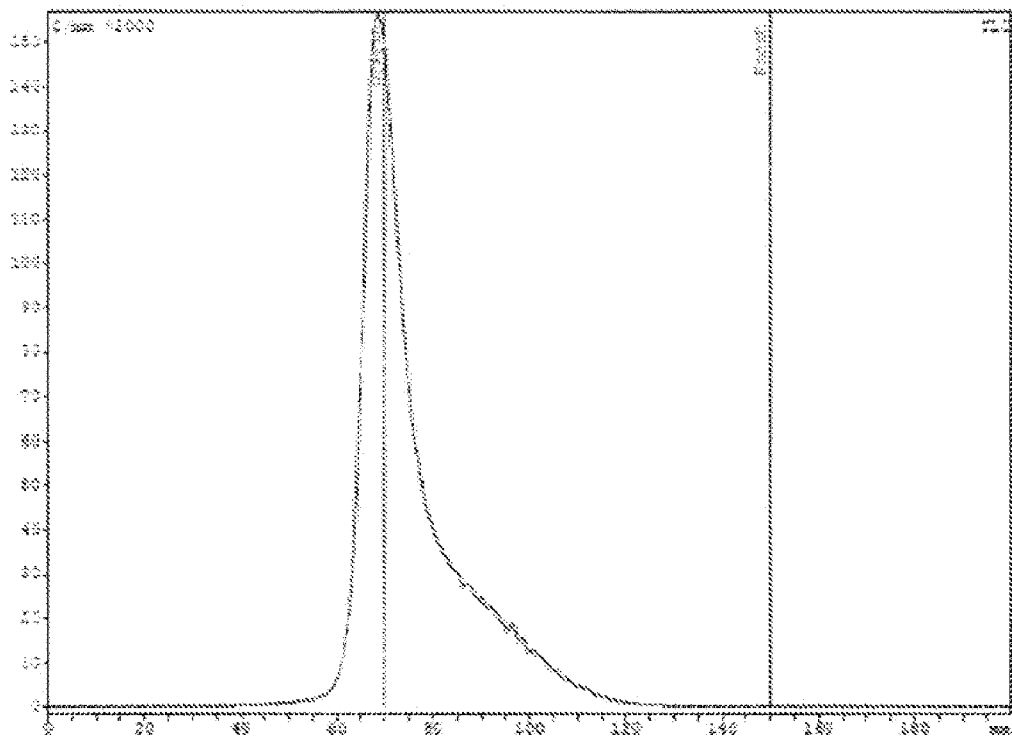


Figura 6

<Cromatograma>

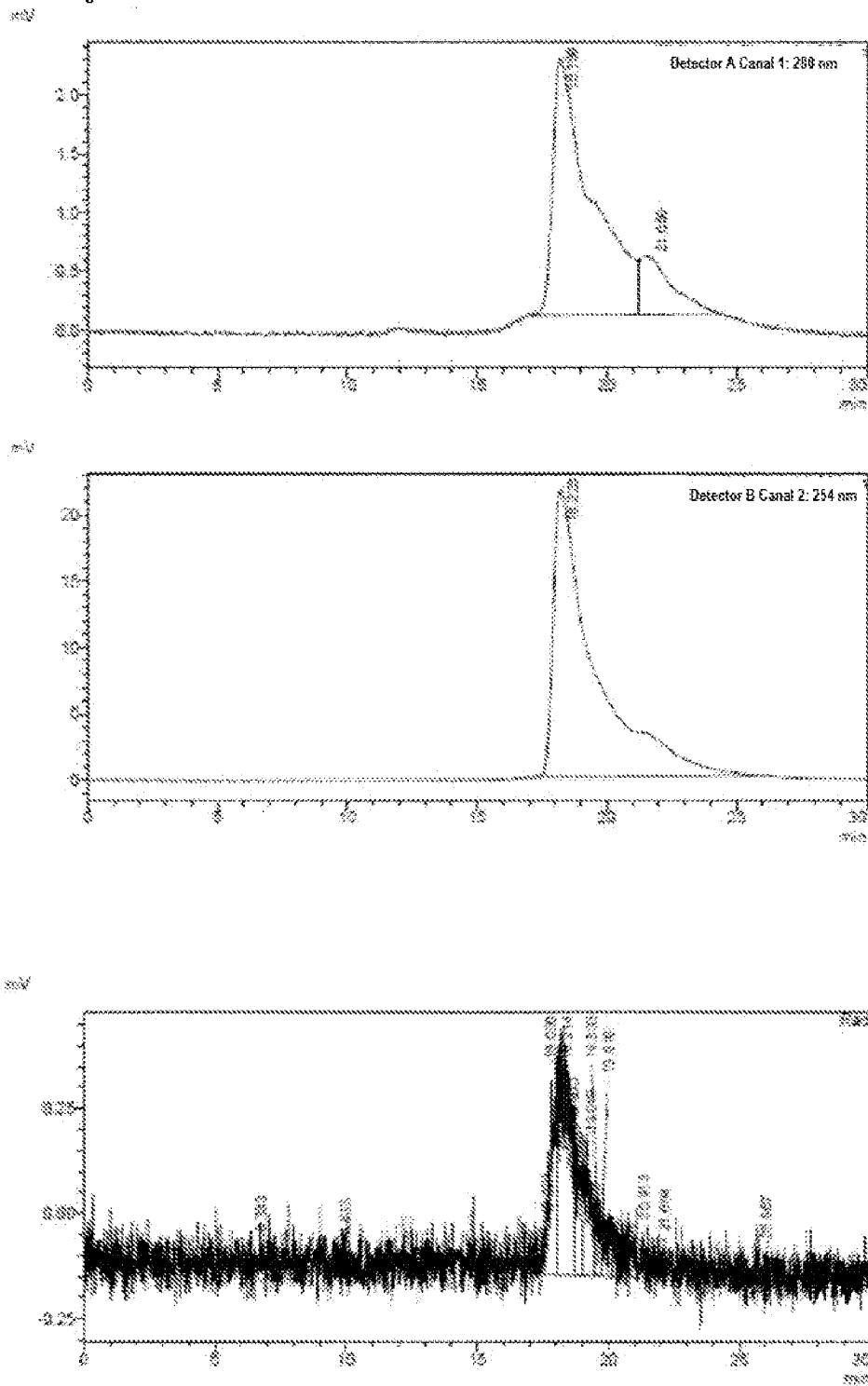


Figura 7

<Cromatograma>

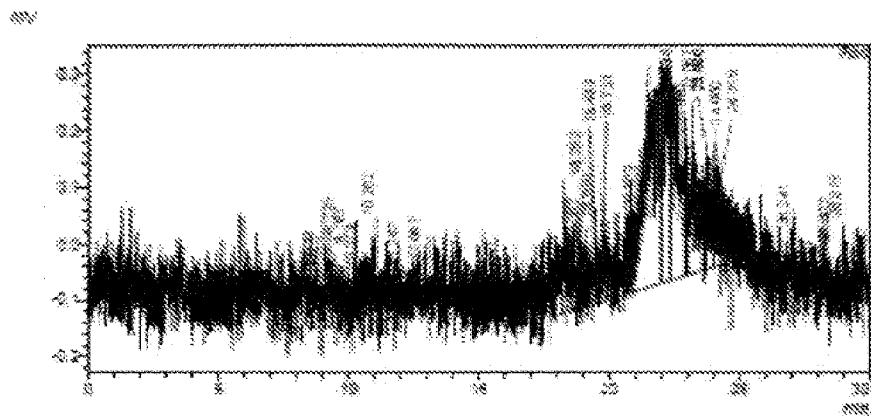
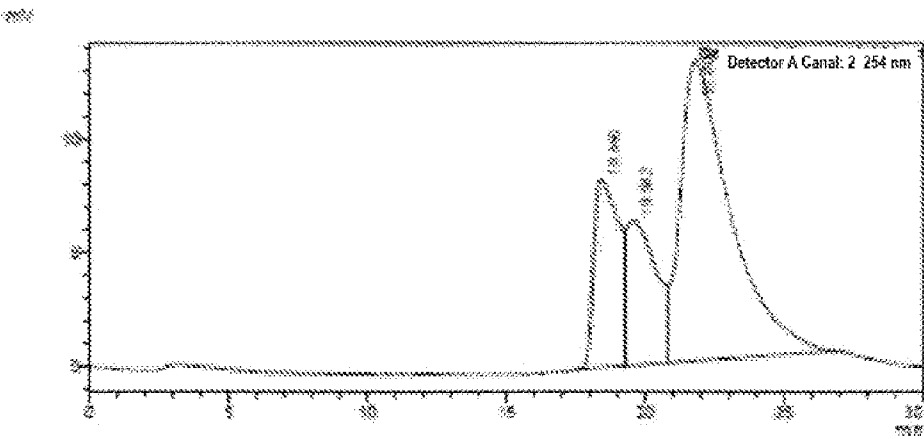
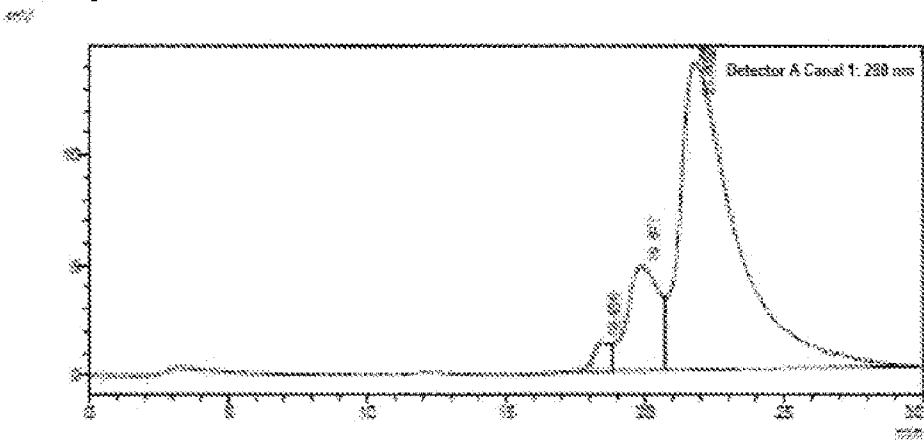


Figura 8

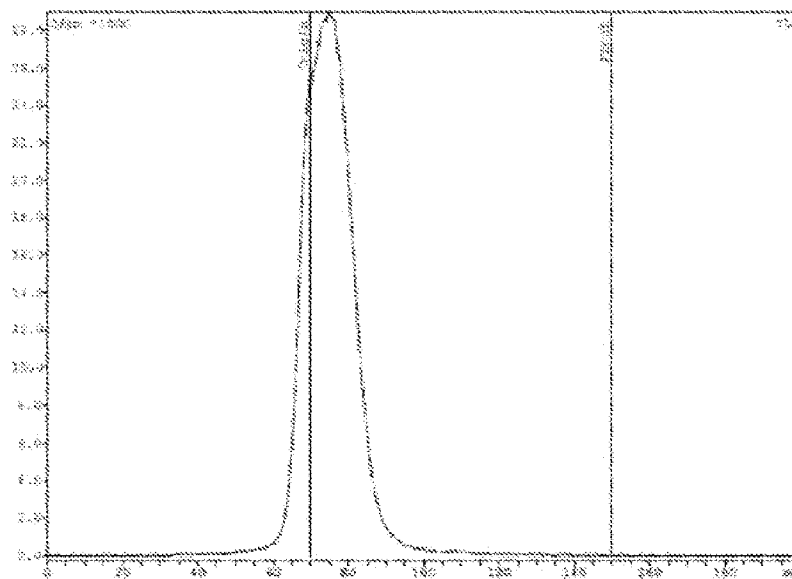


Figura 9

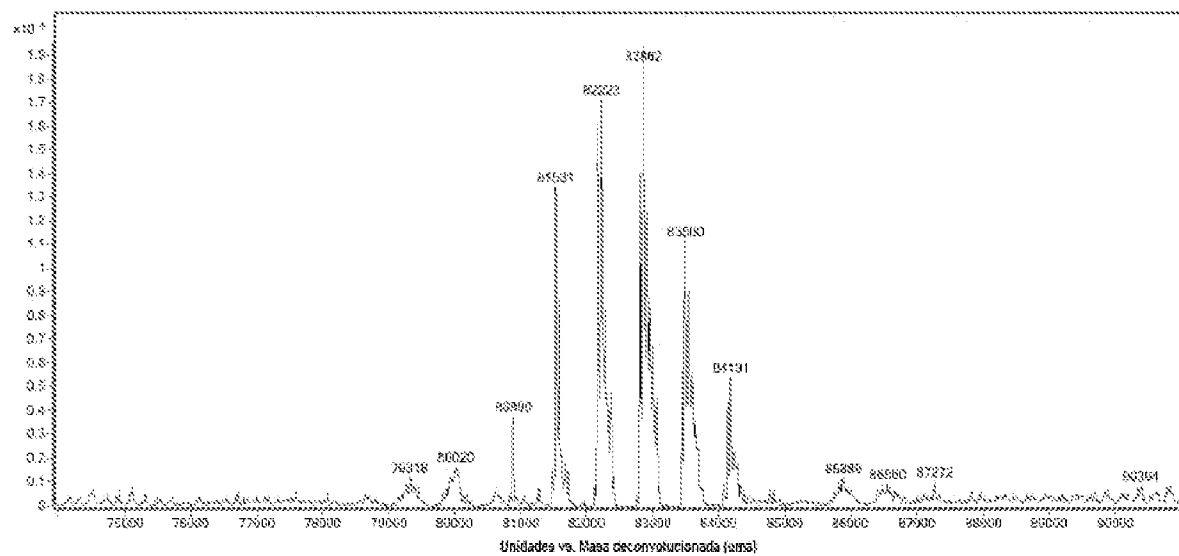


Figura 10

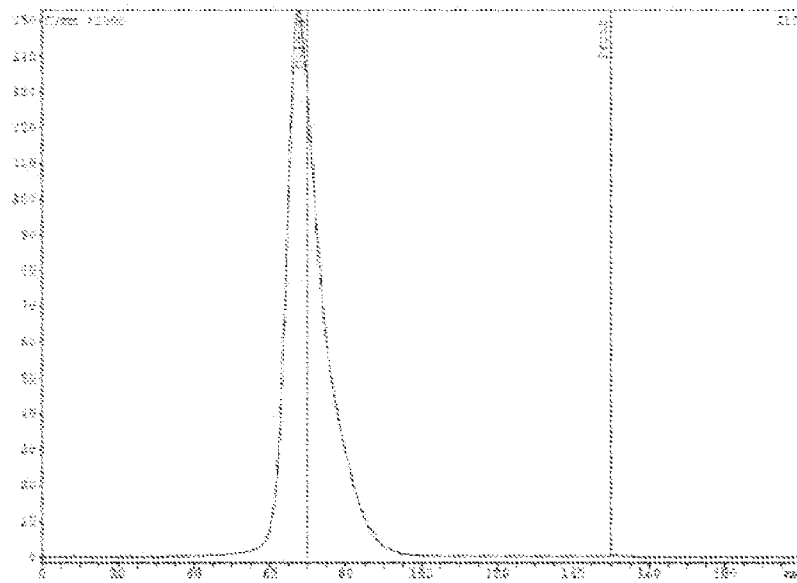


Figura 11

<Cromatograma>

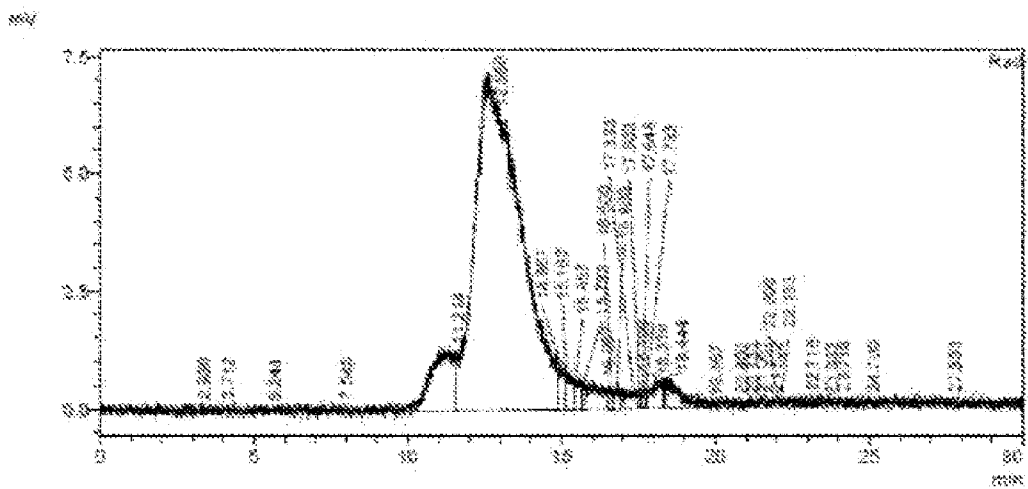
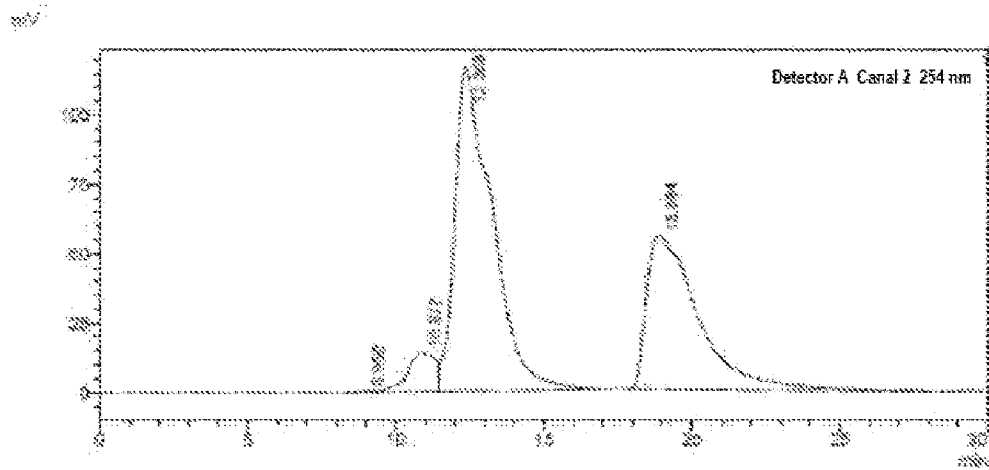
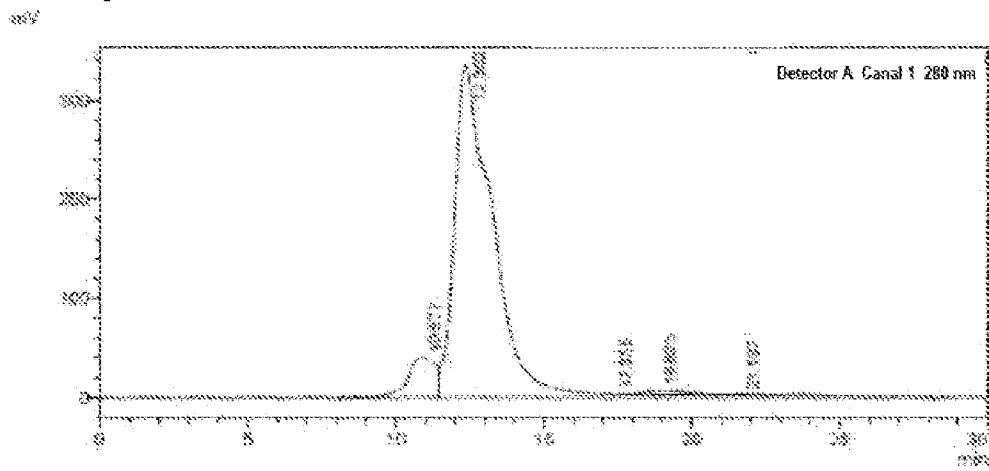


Figura 12

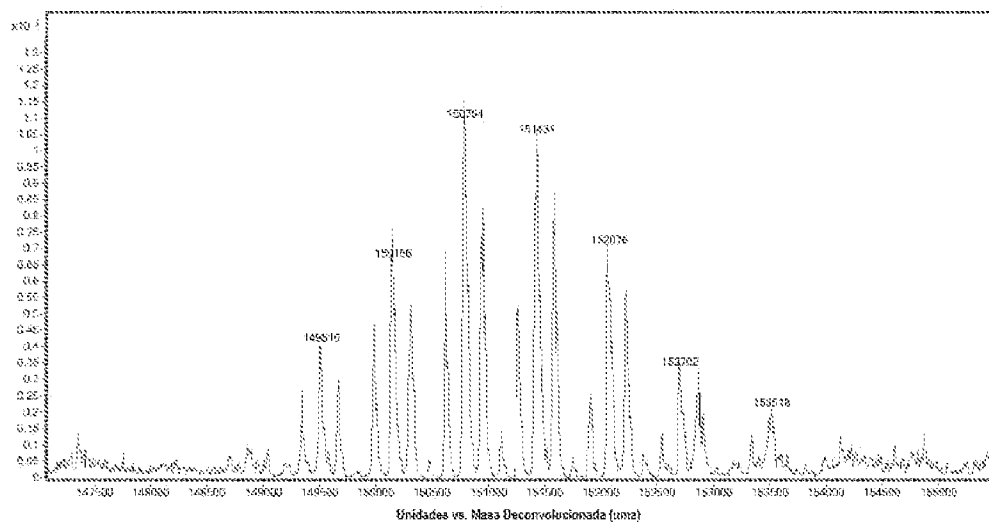


Figura 13

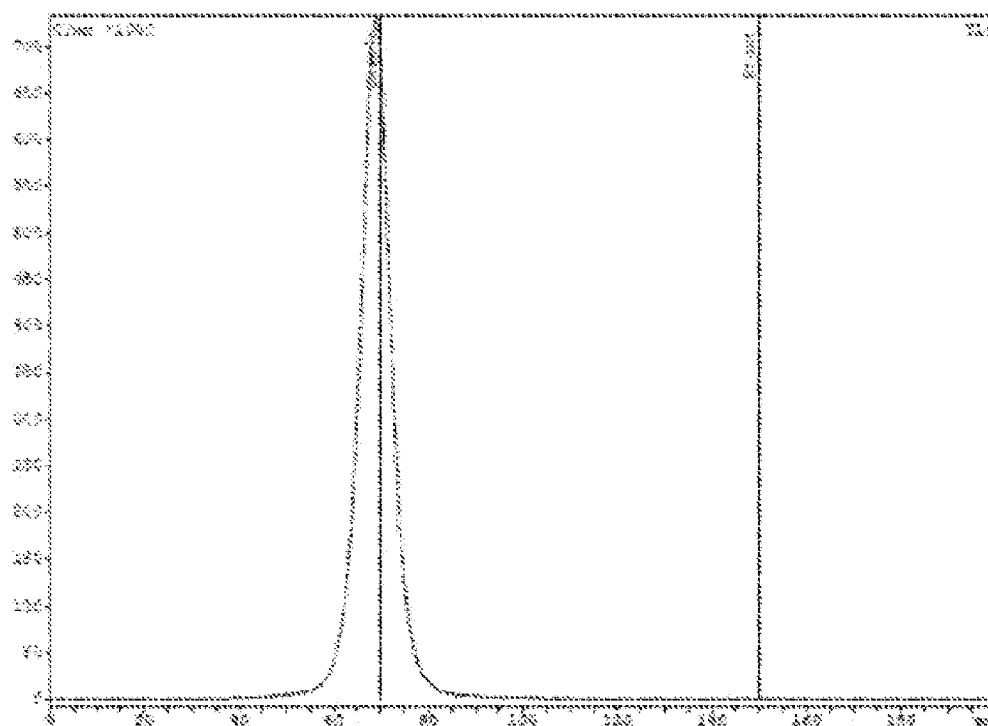


Figura 14

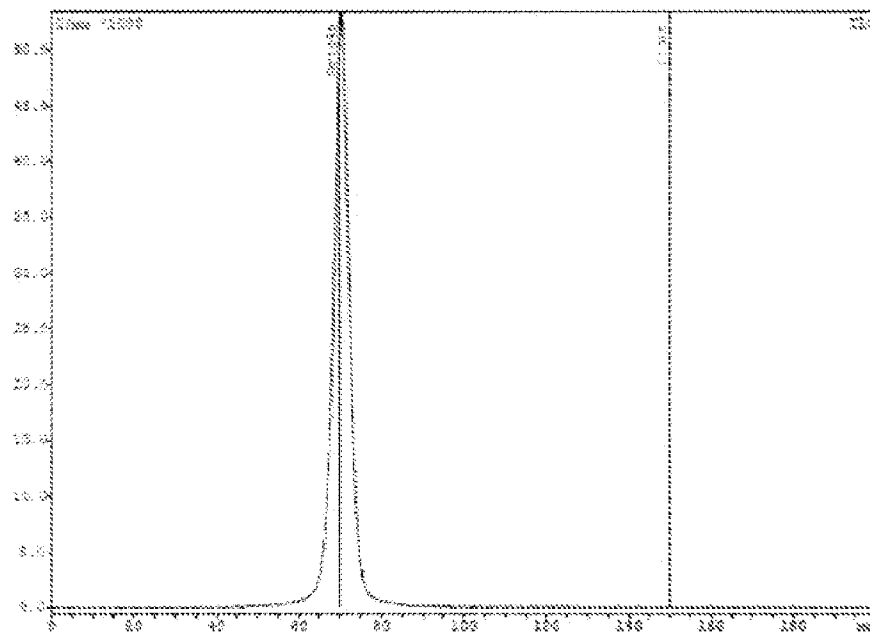


Figura 15

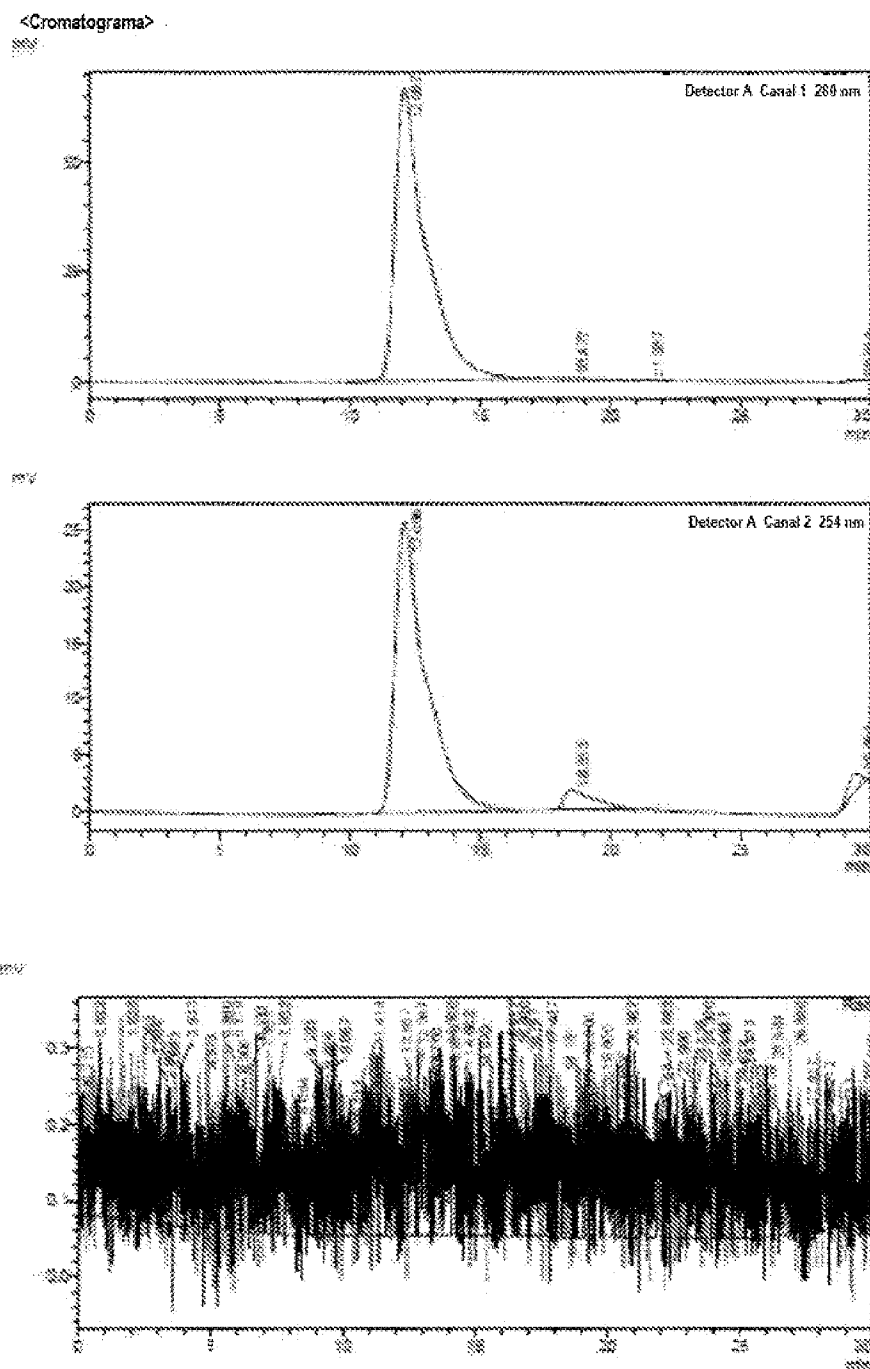


Figura 16

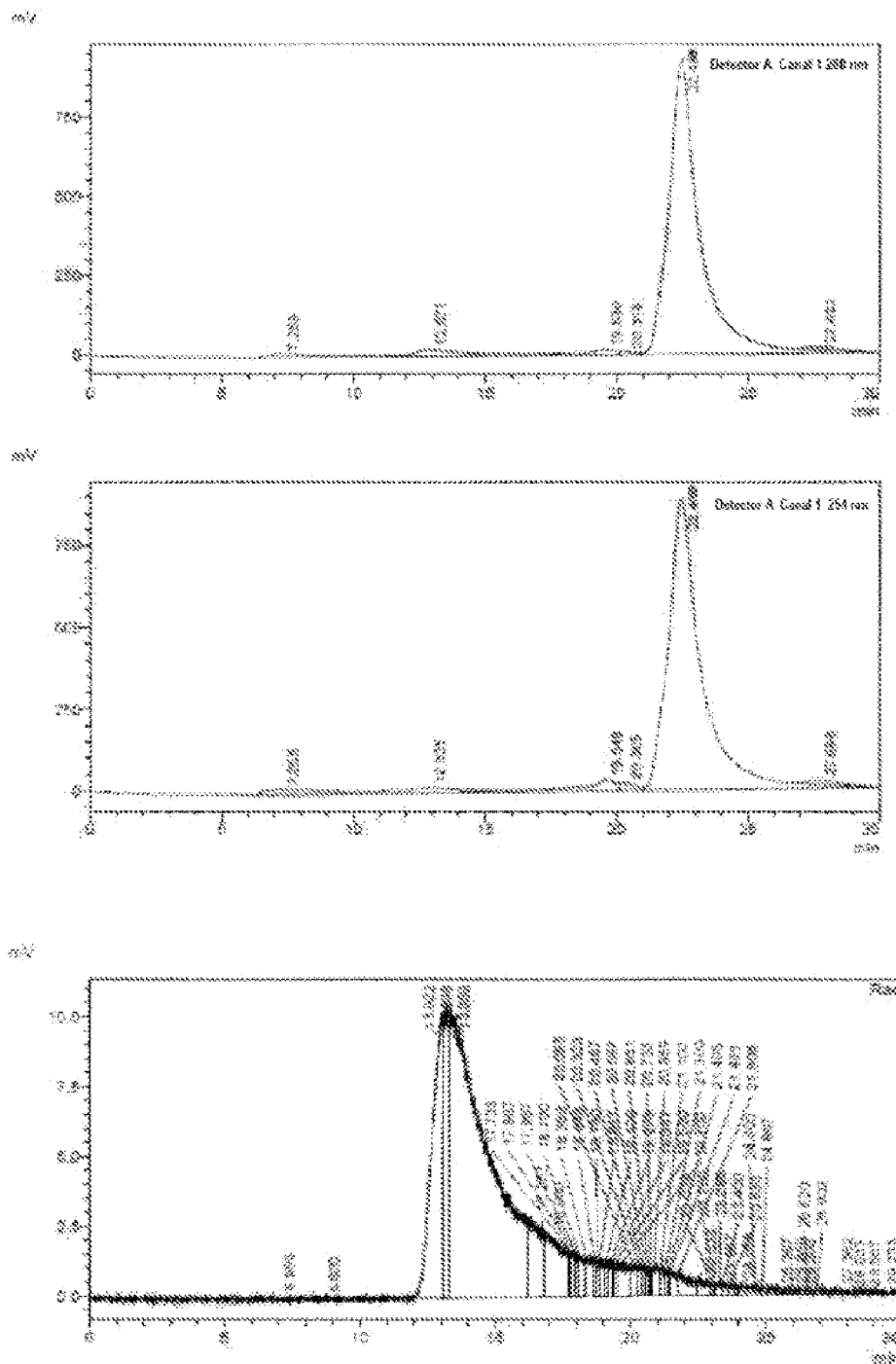


Figura 17

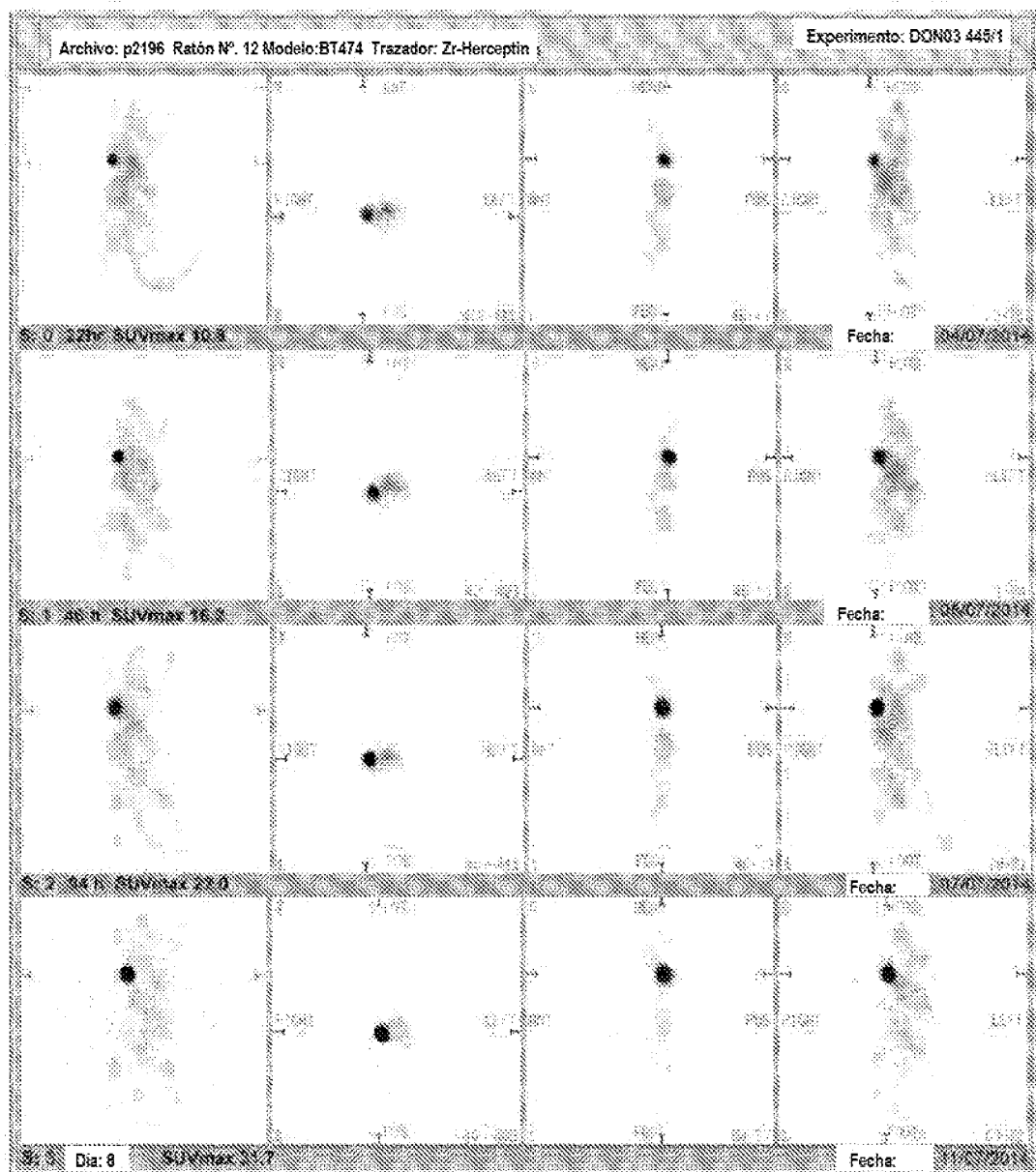


Figura 18

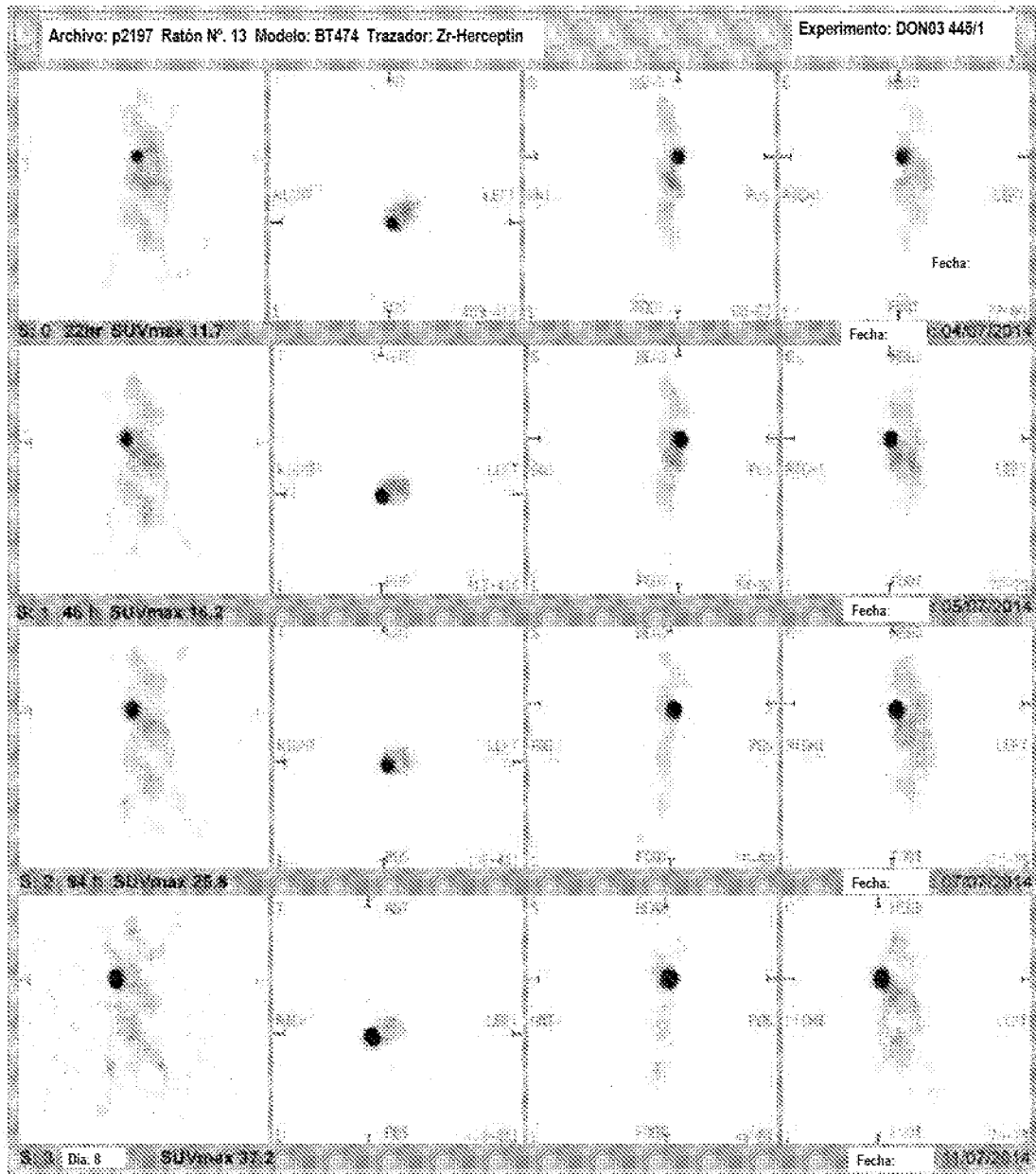


Figura 19

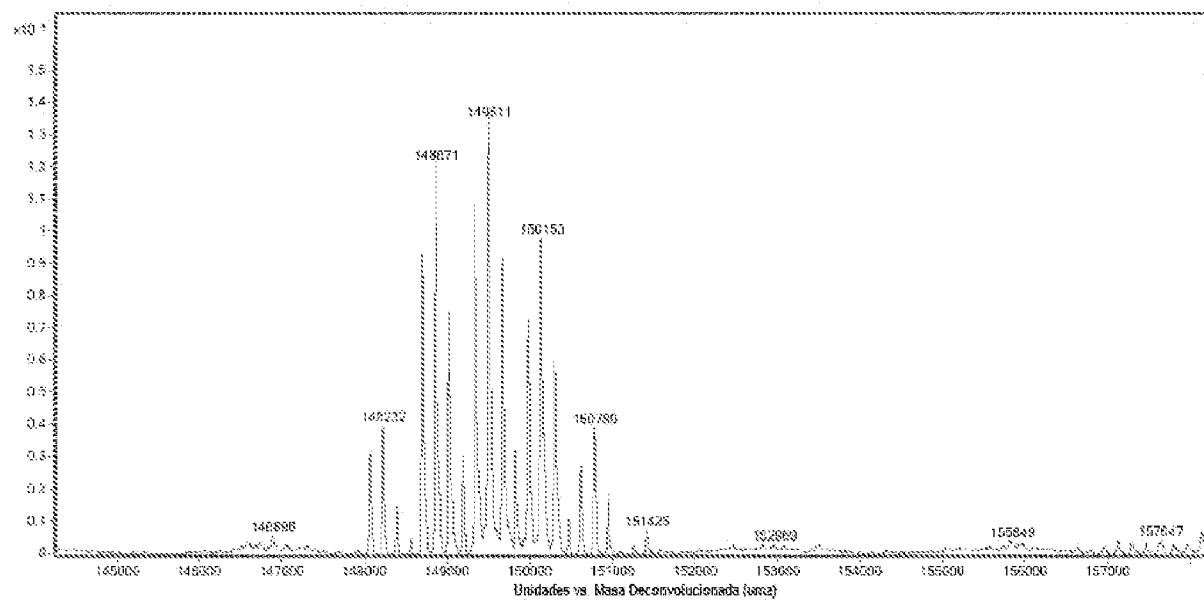


Figura 20

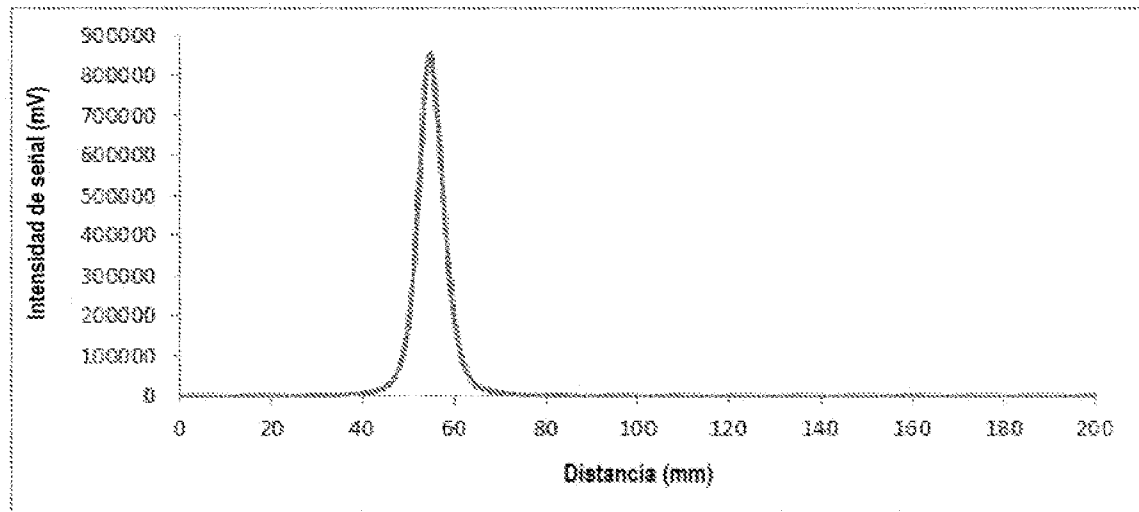


Figura 21

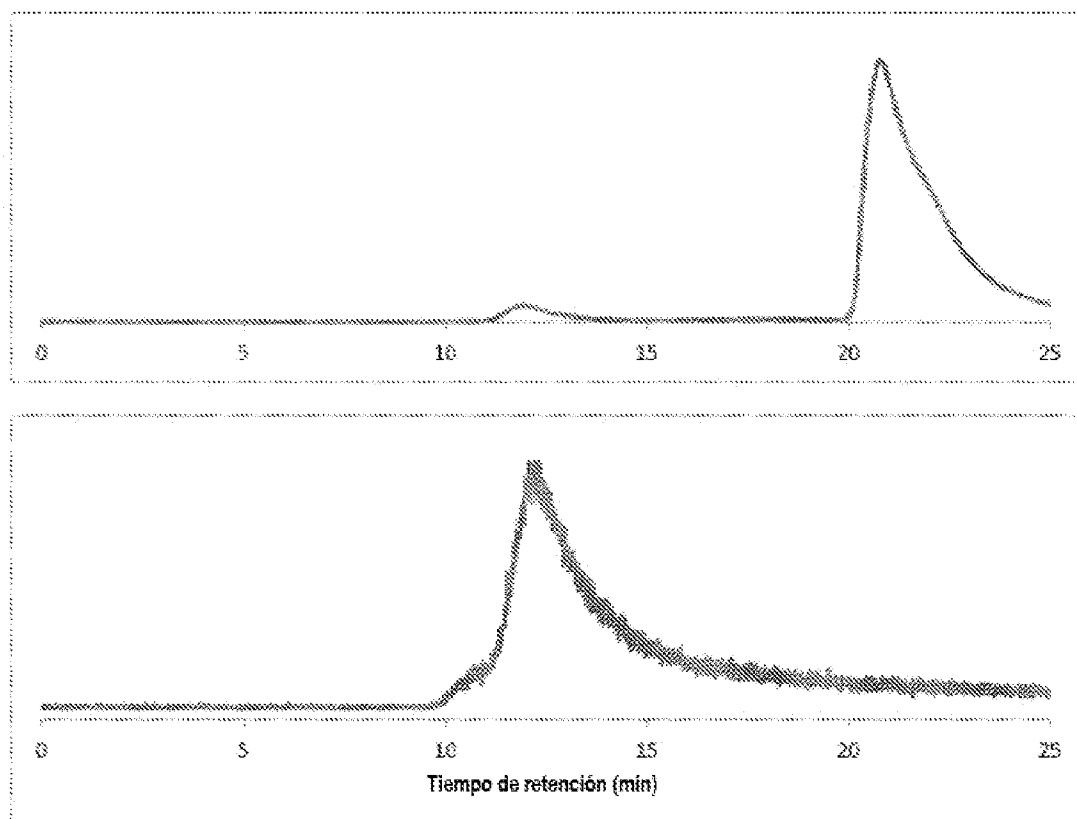


Figura 22

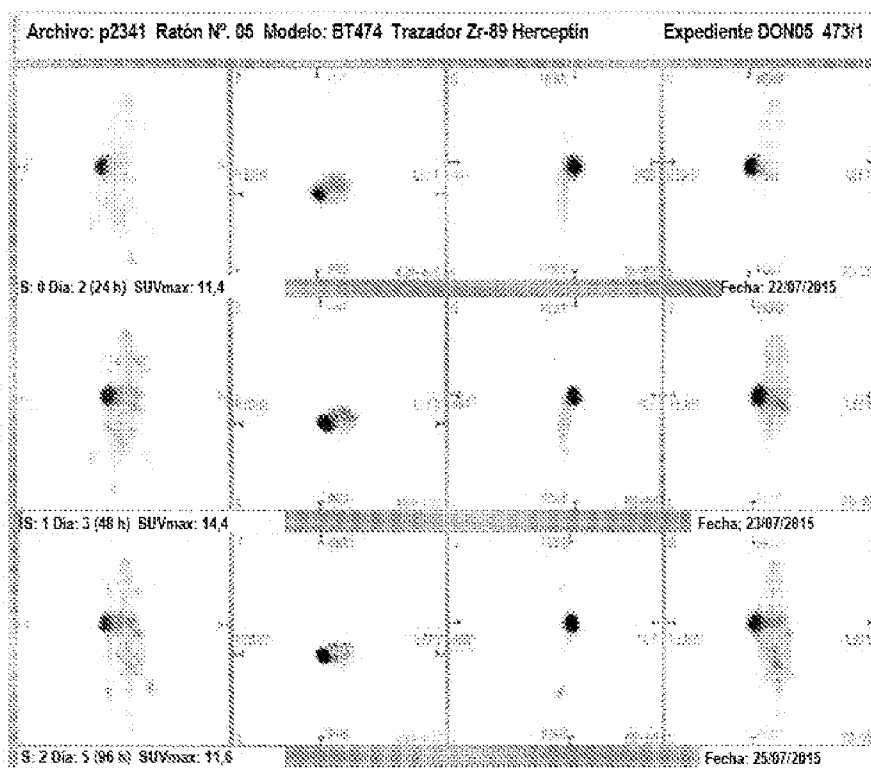
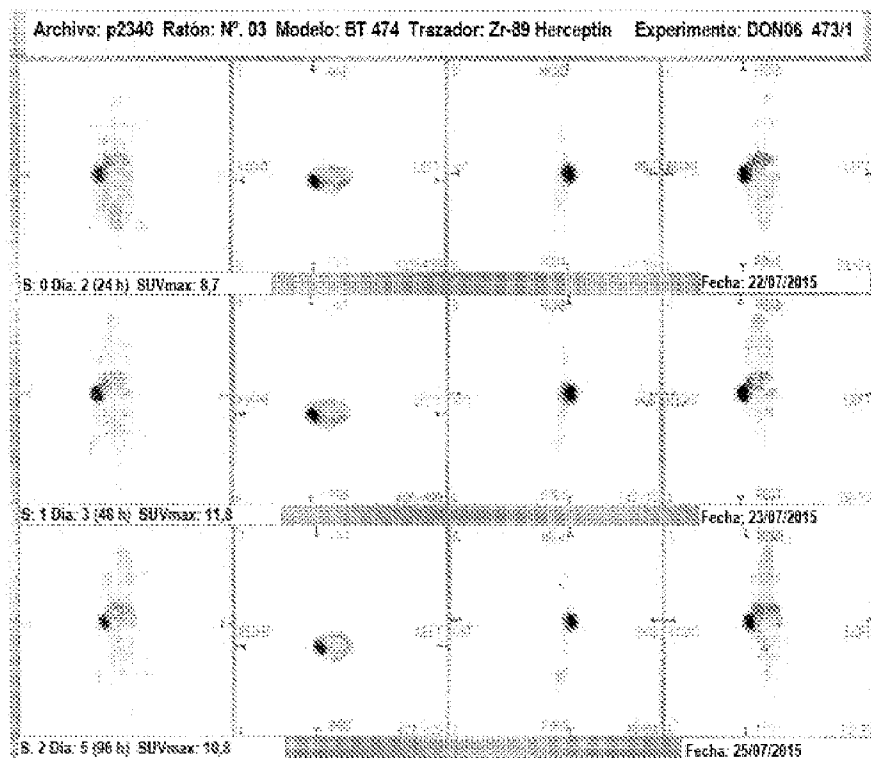


Figura 22 (continuación)

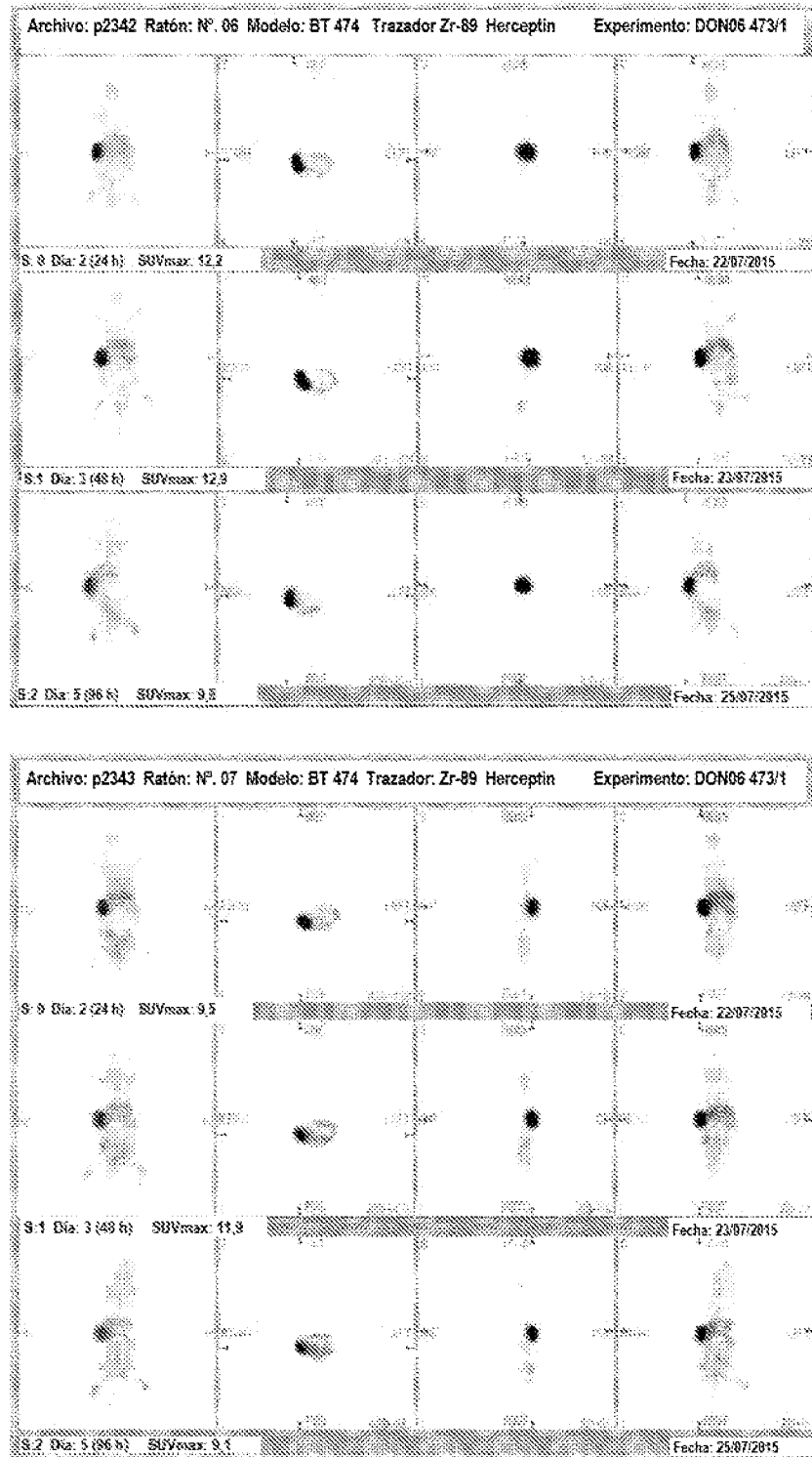


Figura 23

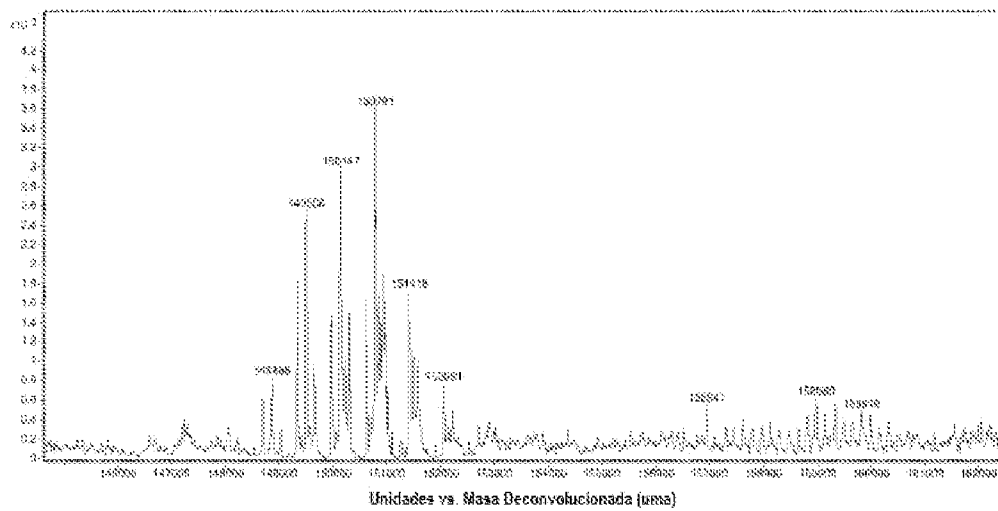


Figura 24

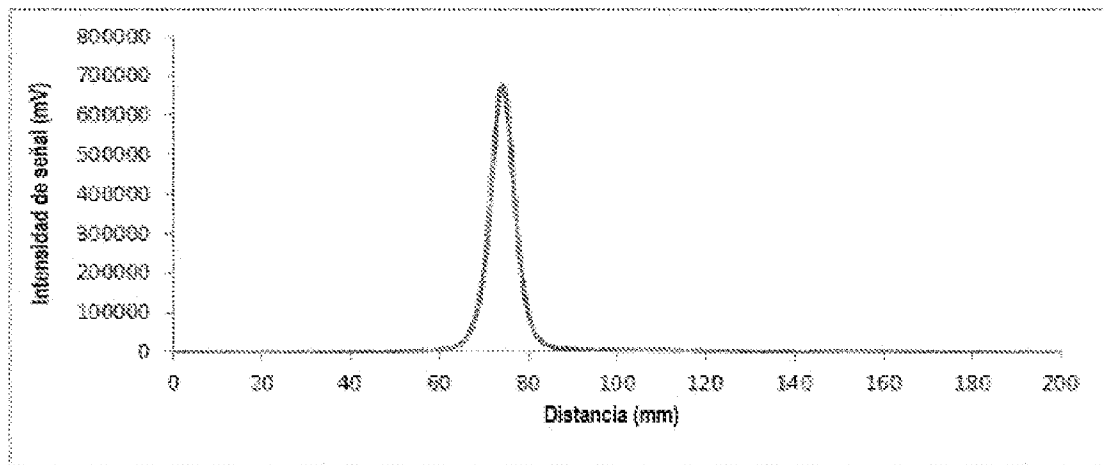


Figura 25

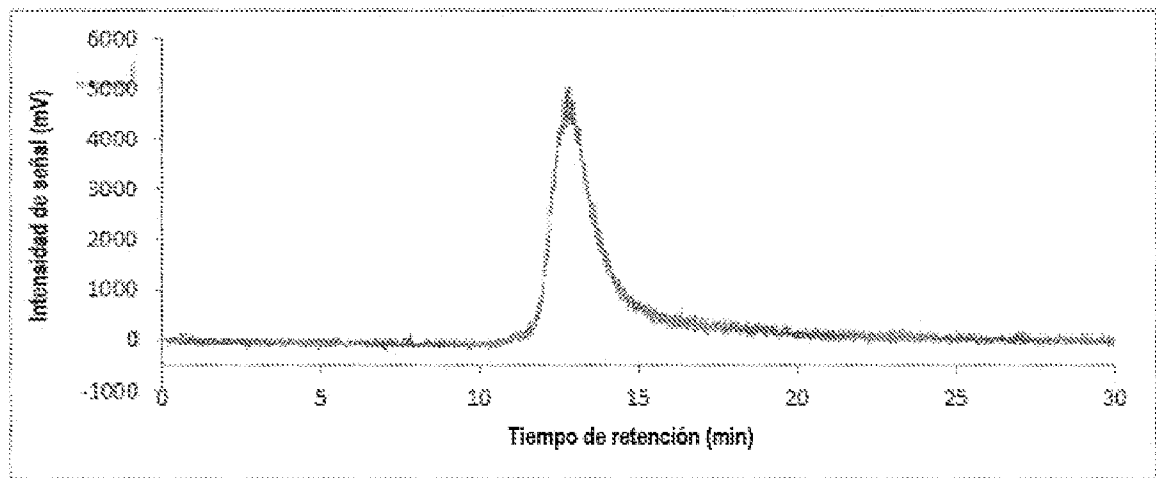


Figura 26

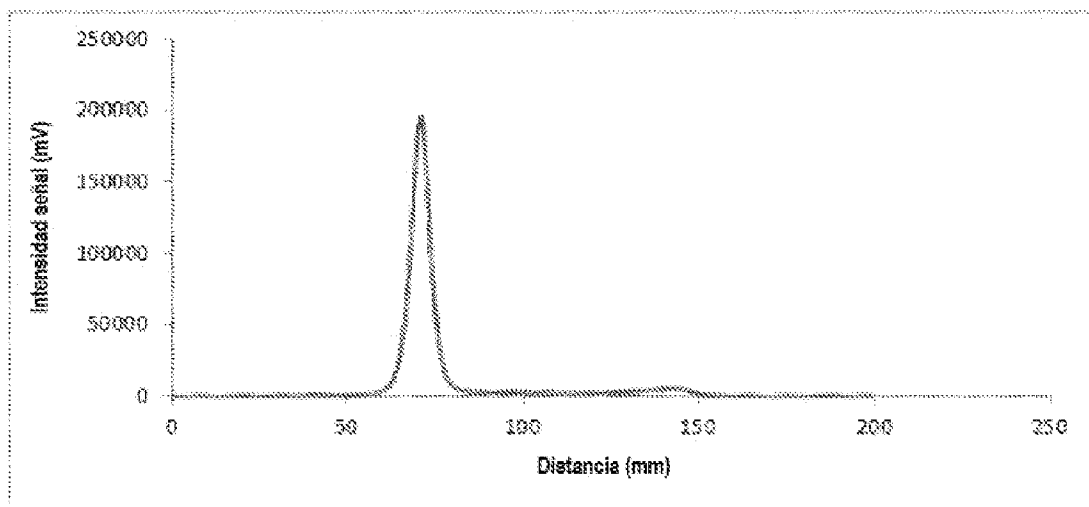


Figura 27

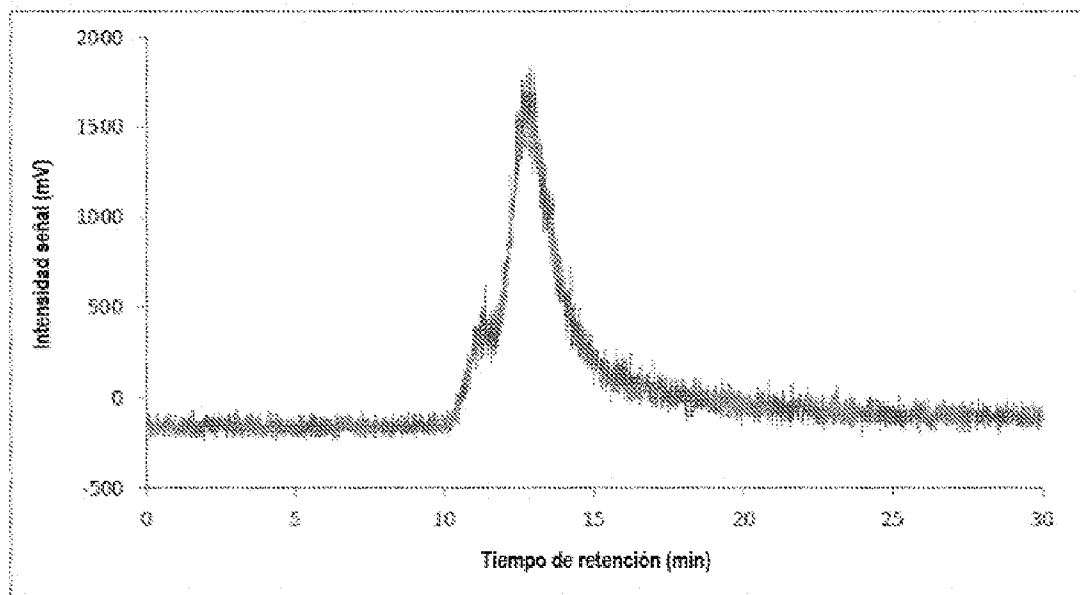


Figura 28

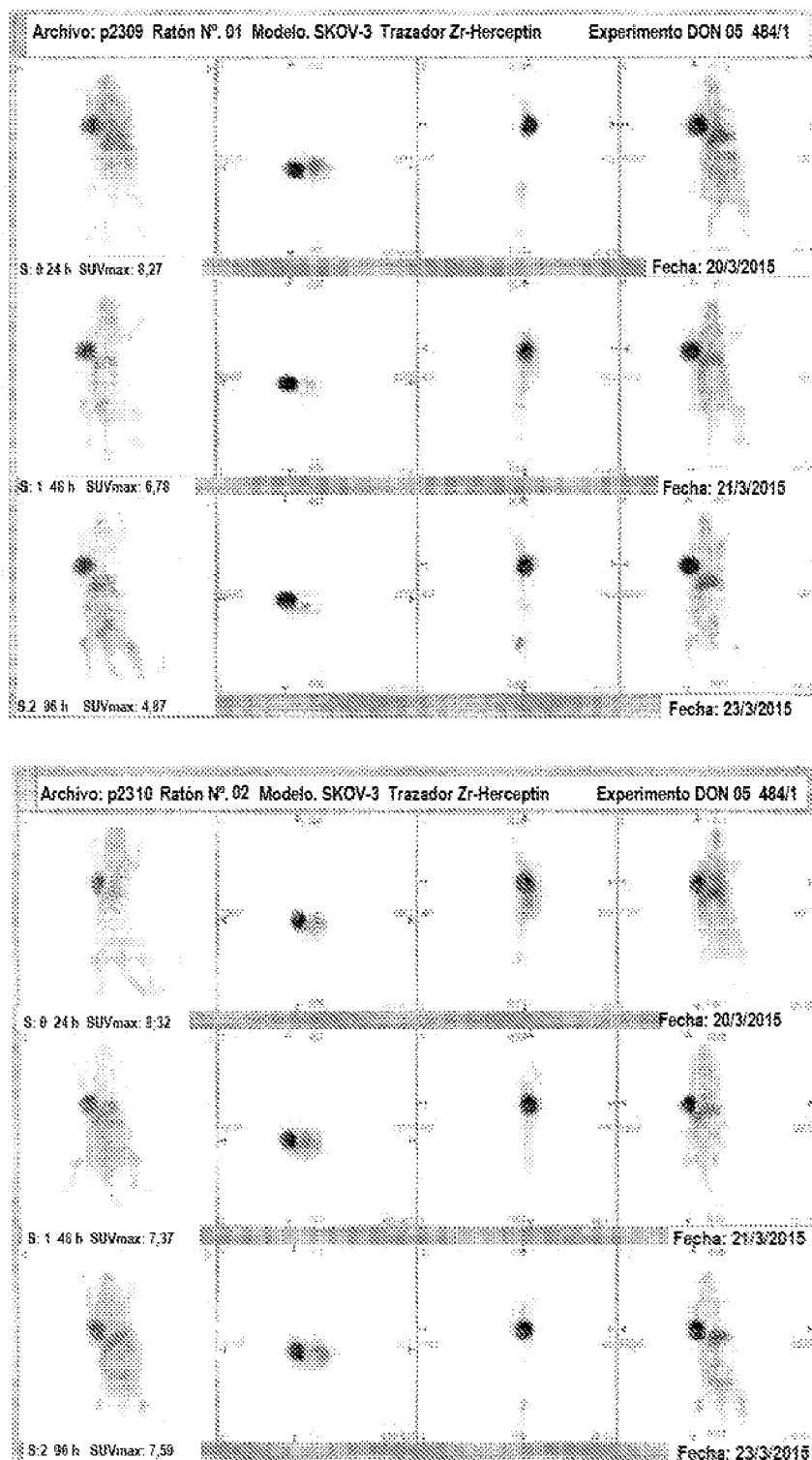


Figura 28 (Continuación)

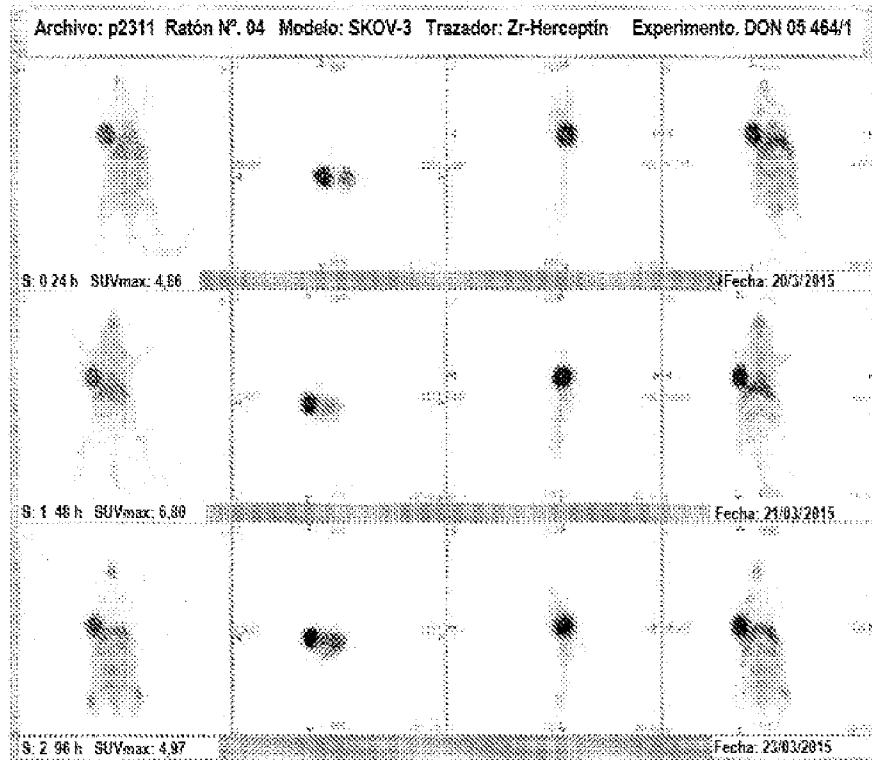


Figura 29

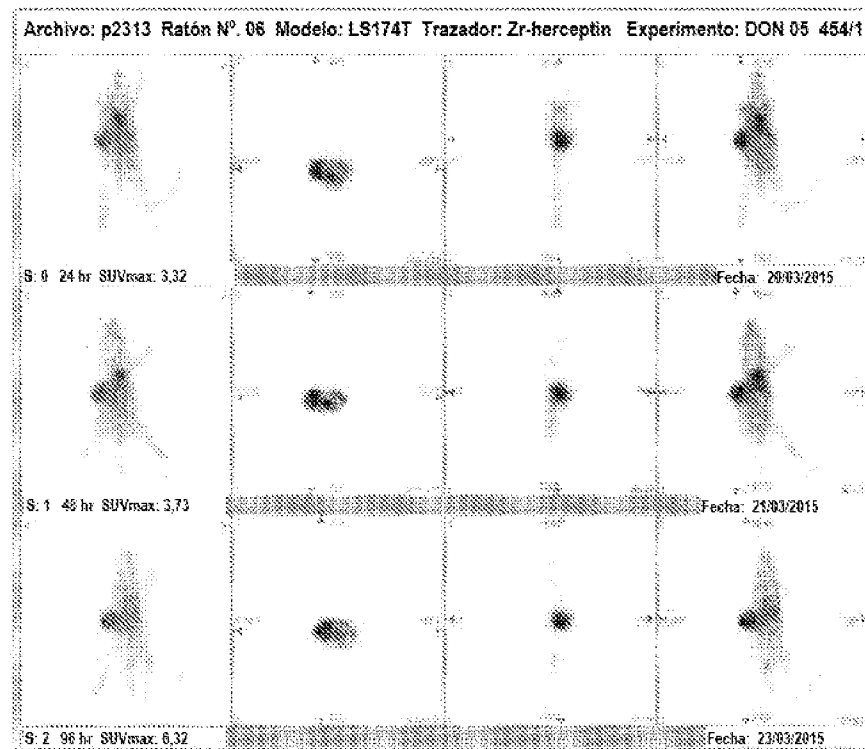
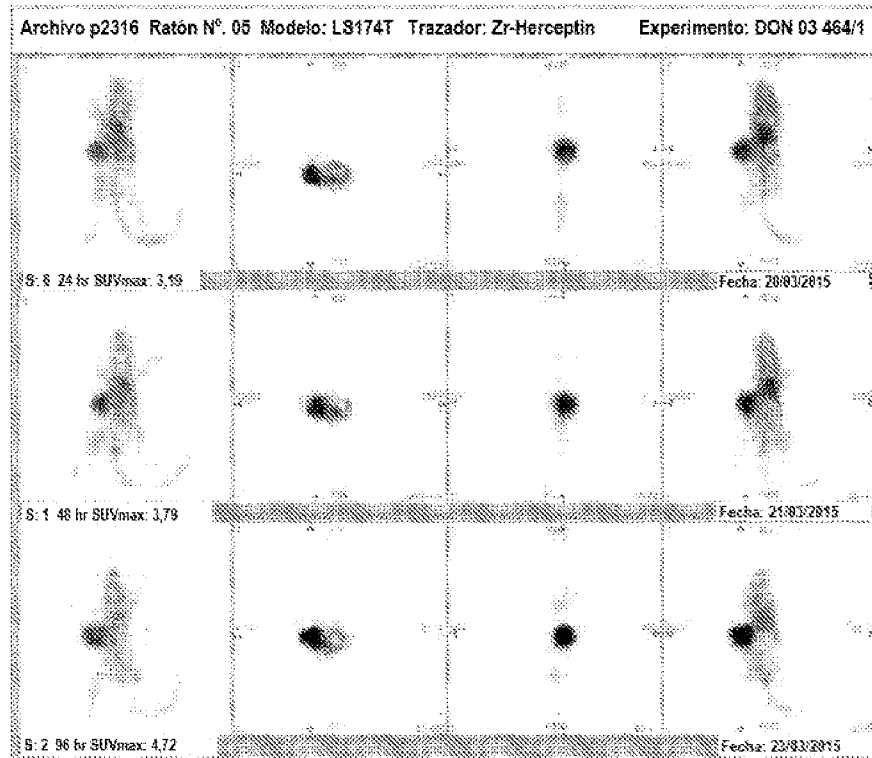


Figura 29 (Continuación)

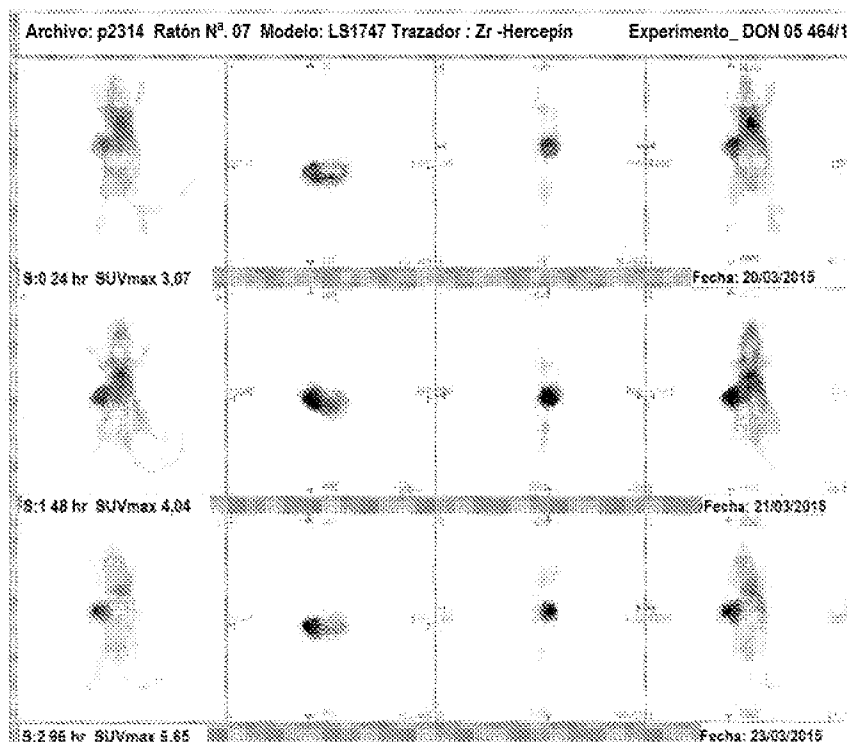


Figura 30

SER-3-058-DCM-insoluble-500MHz-1H-DMSO

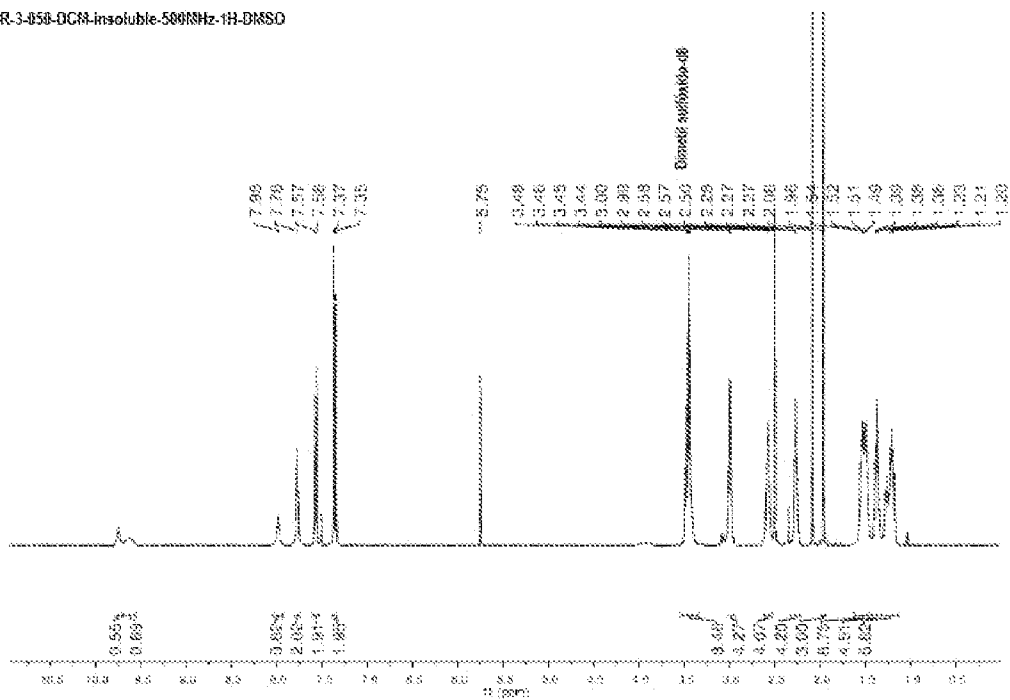


Figura 31

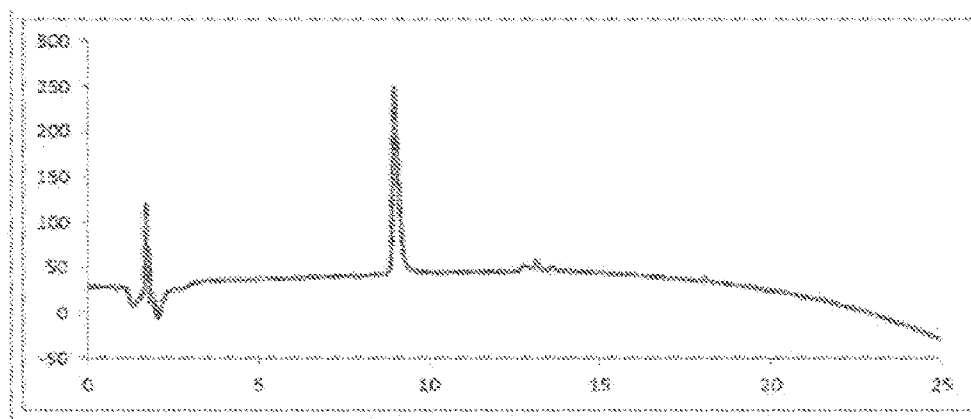


Figura 32

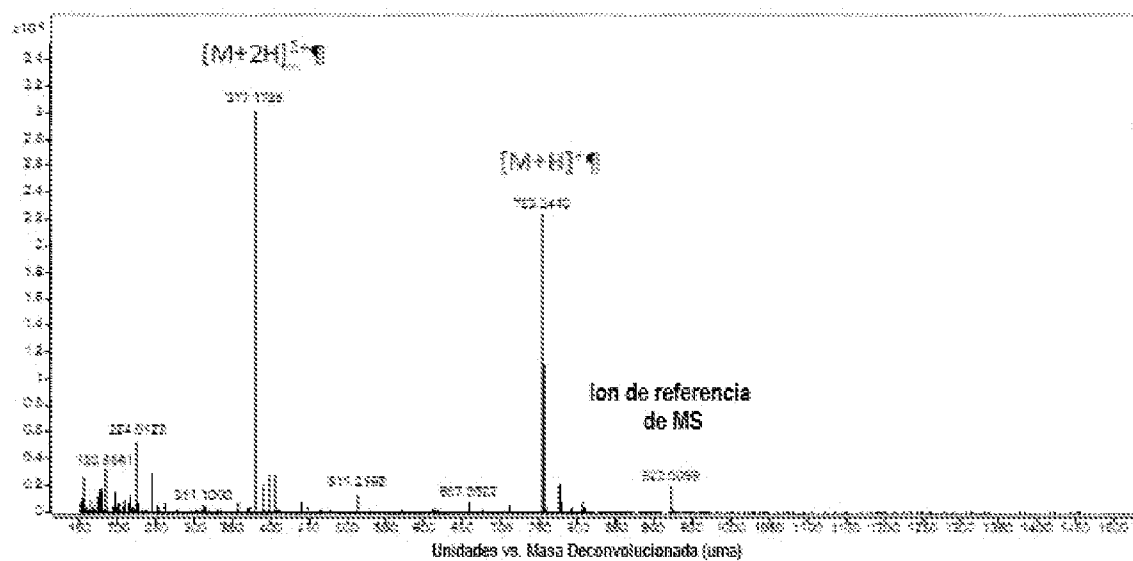


Figura 33

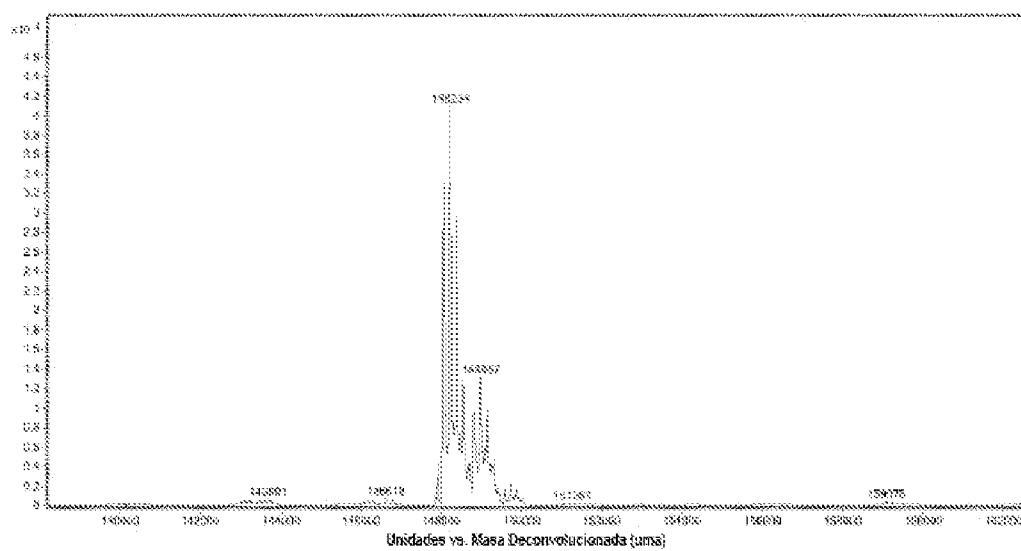


Figura 34 (a)

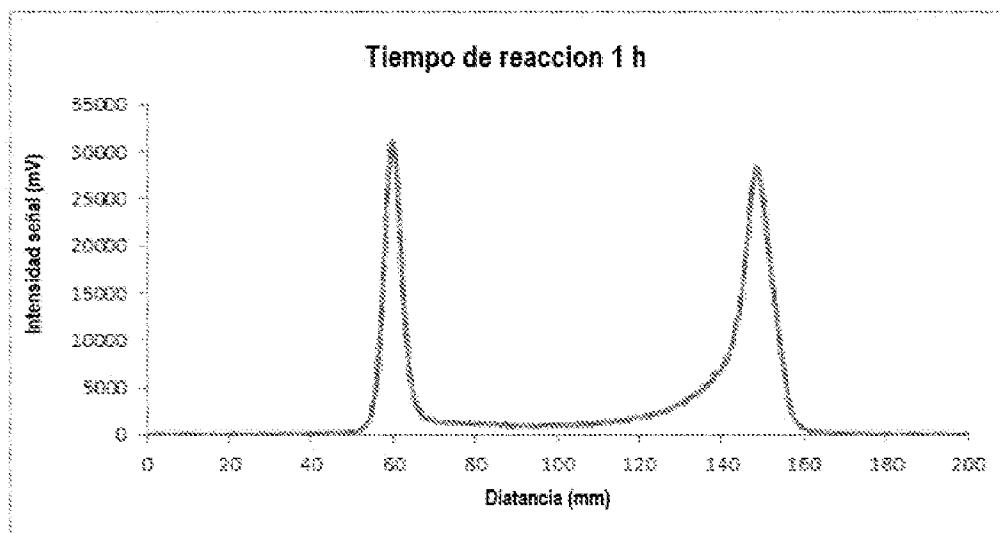


Figura 34 (b)

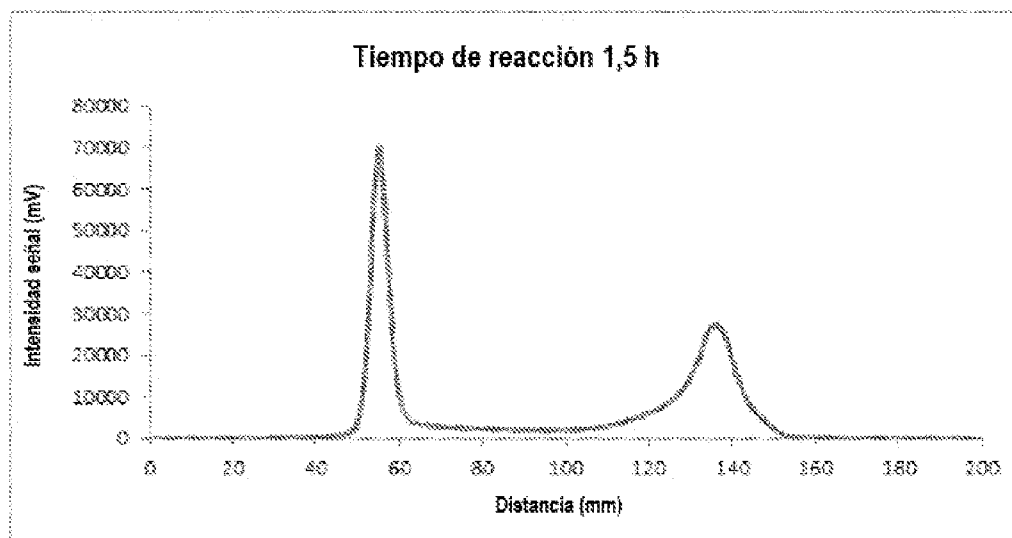


Figura 34 (c)

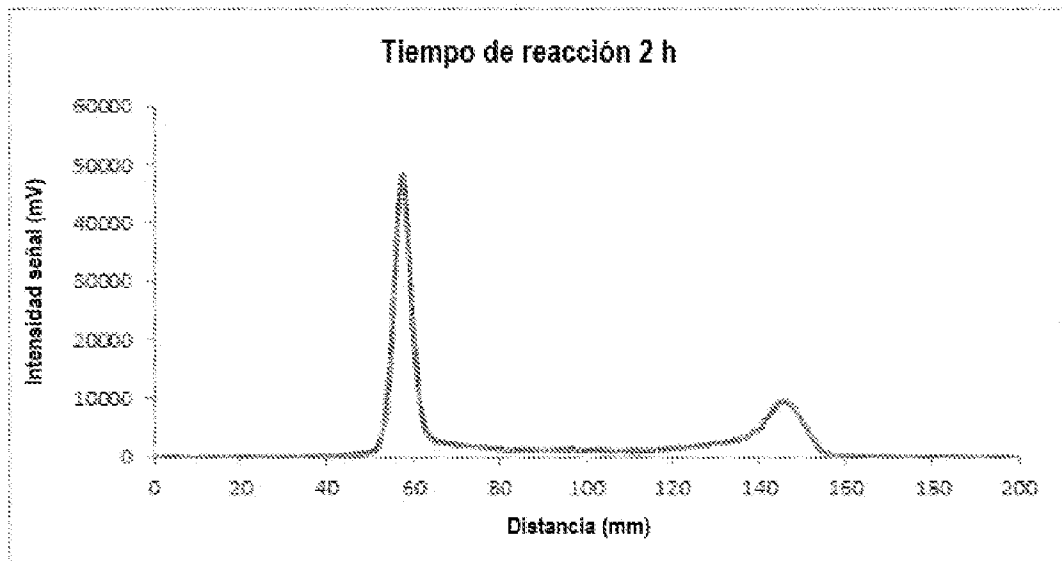


Figura 35

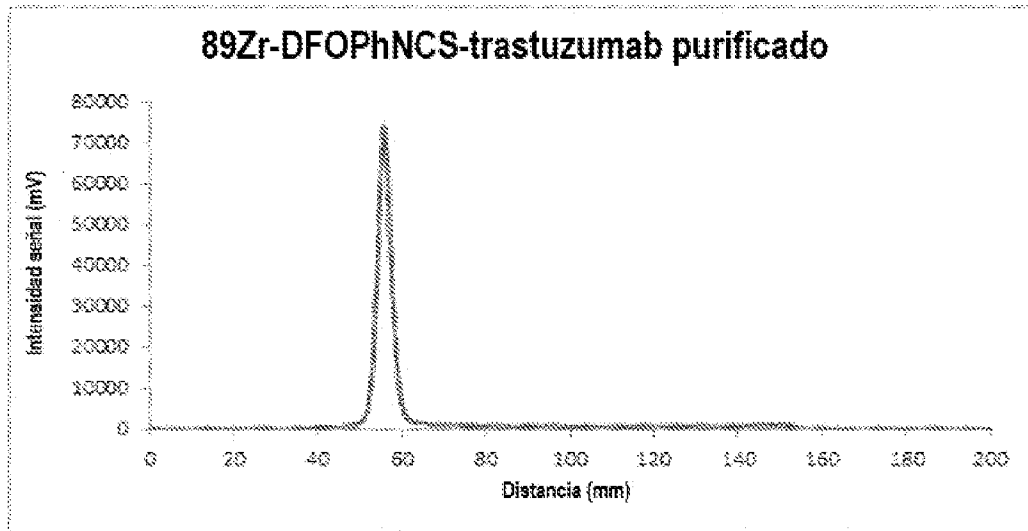


Figura 36

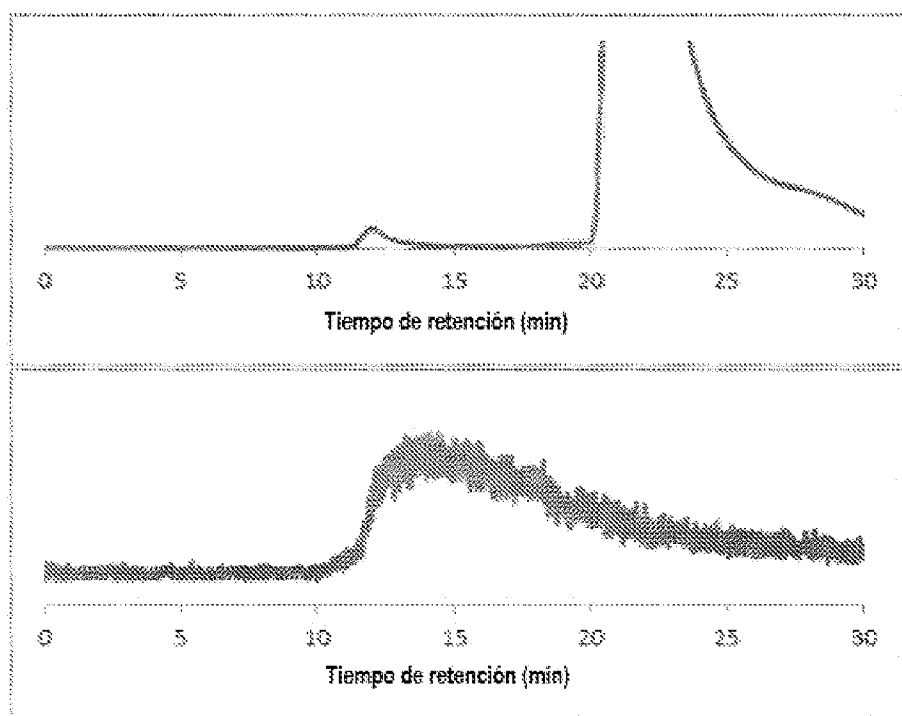


Figura 37

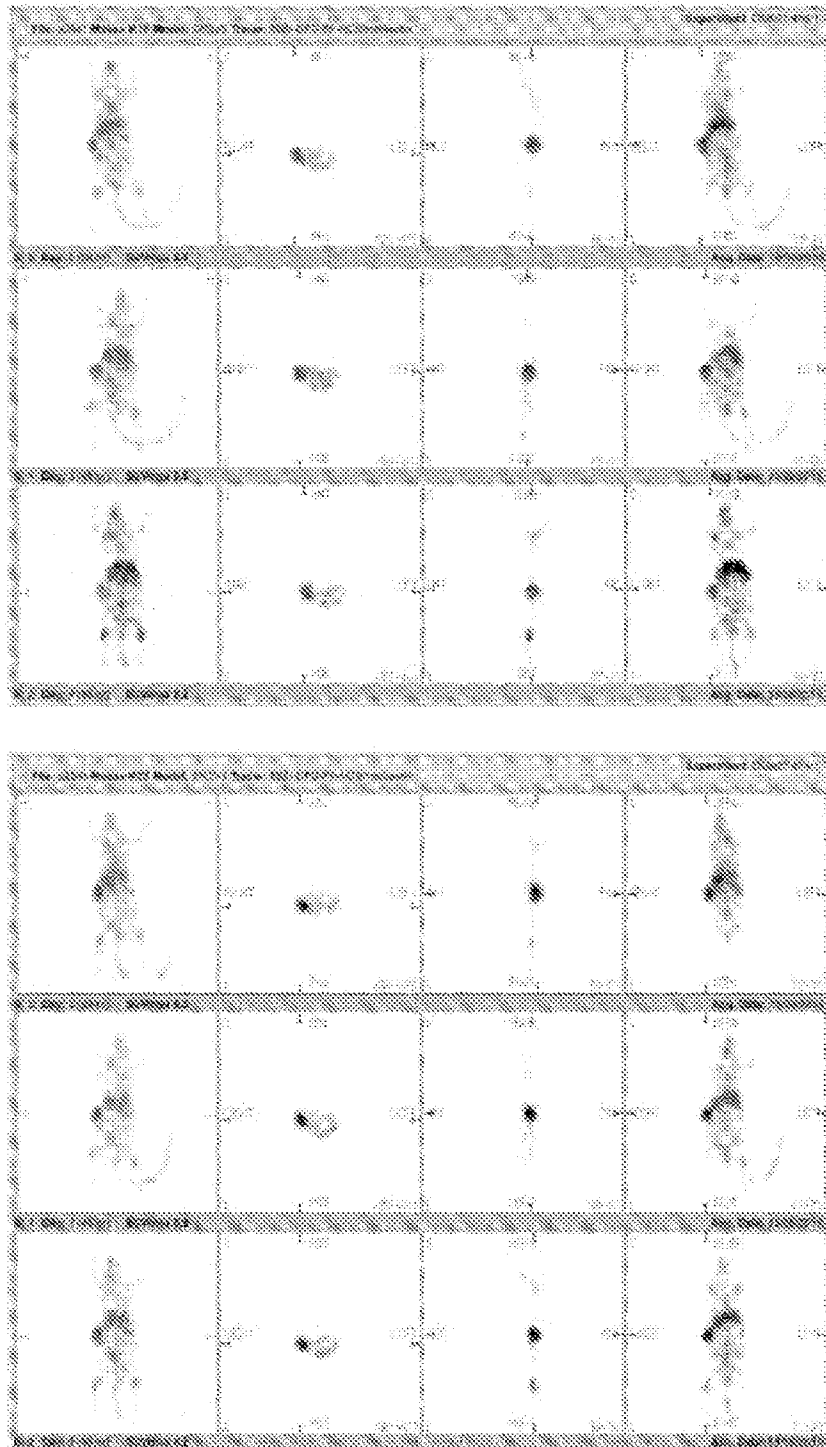


Figura 37 (continuación)

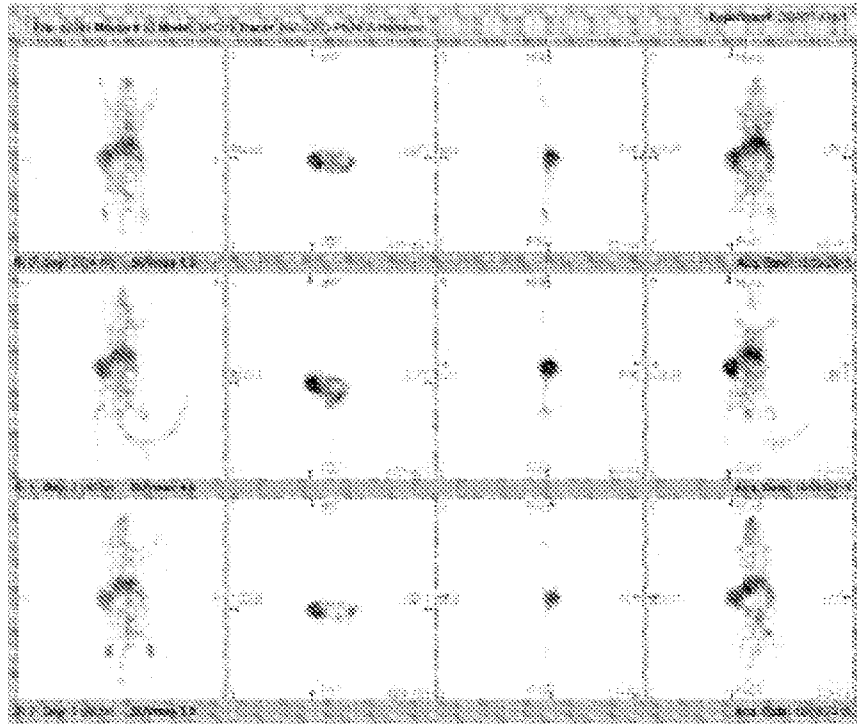


Figura 38

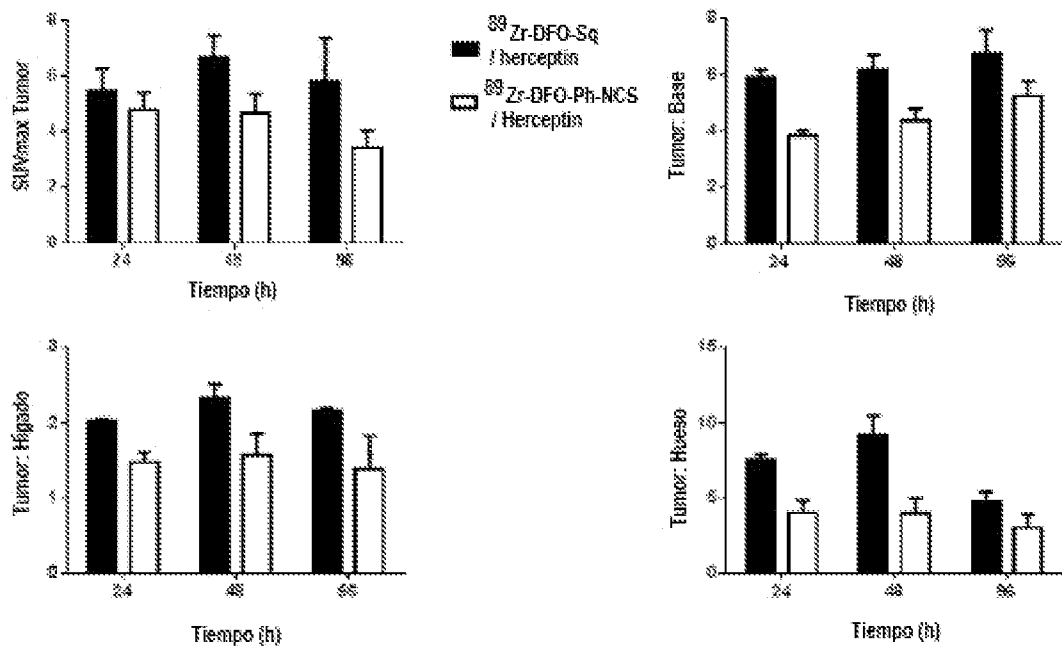


Figura 39

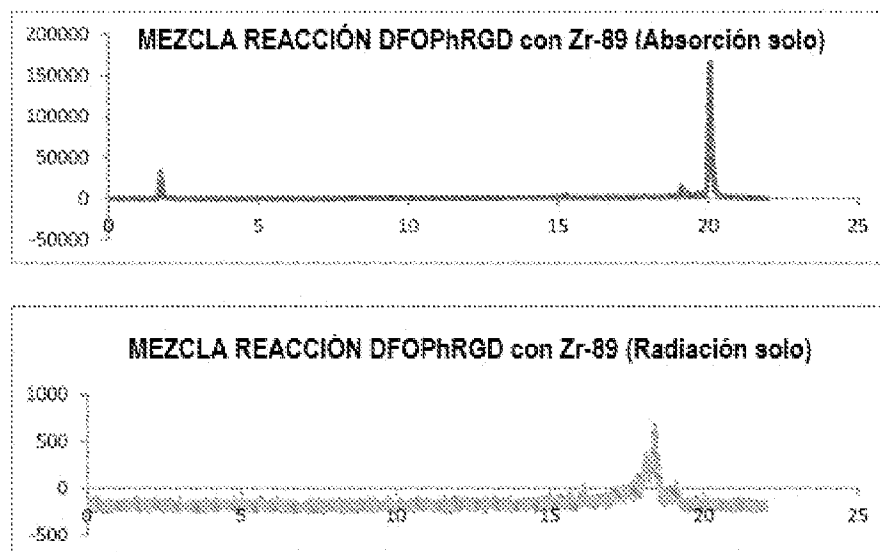


Figura 40

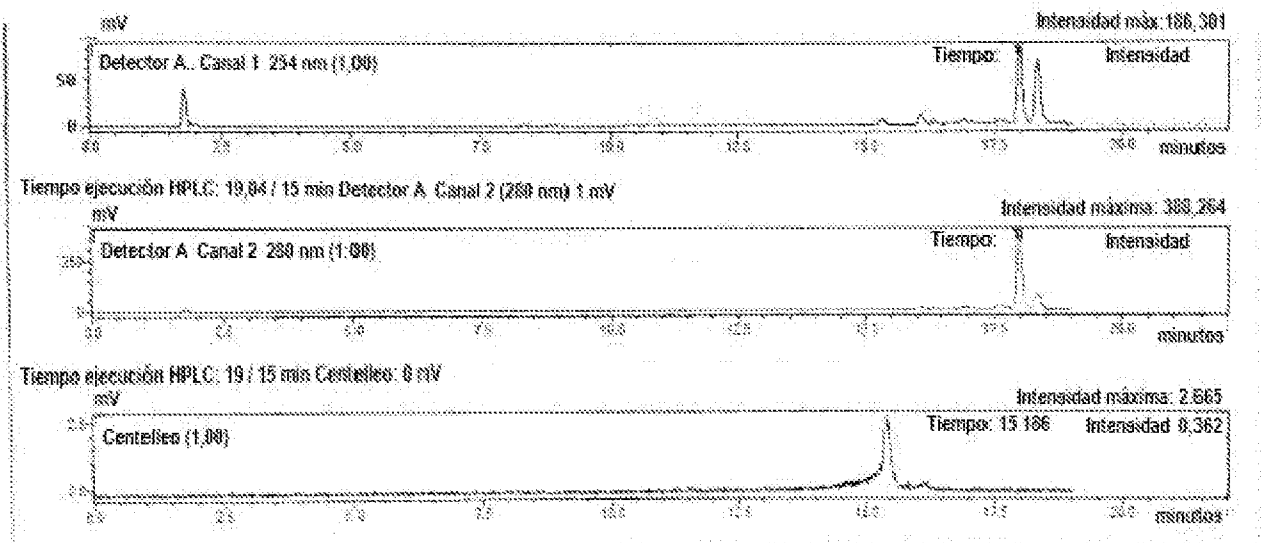


Figura 41

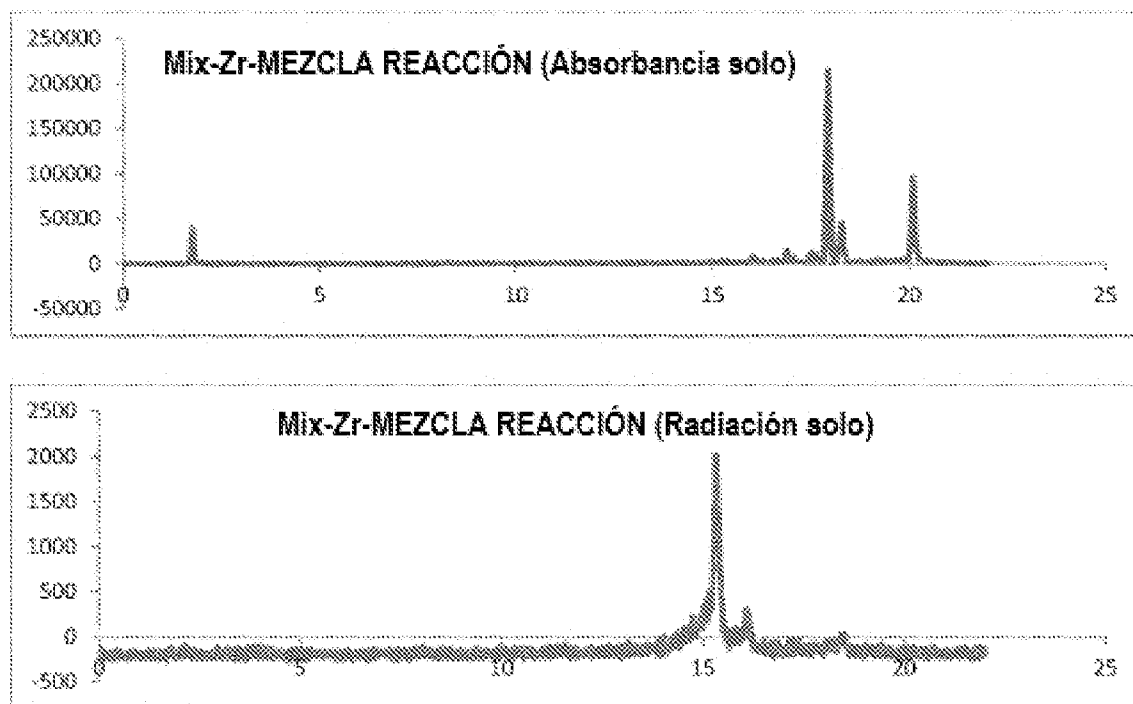


Figura 42

SER-4-138-BFOSqTaur-después-cetífuga-111015-400MHz-D2O_PROTON_01

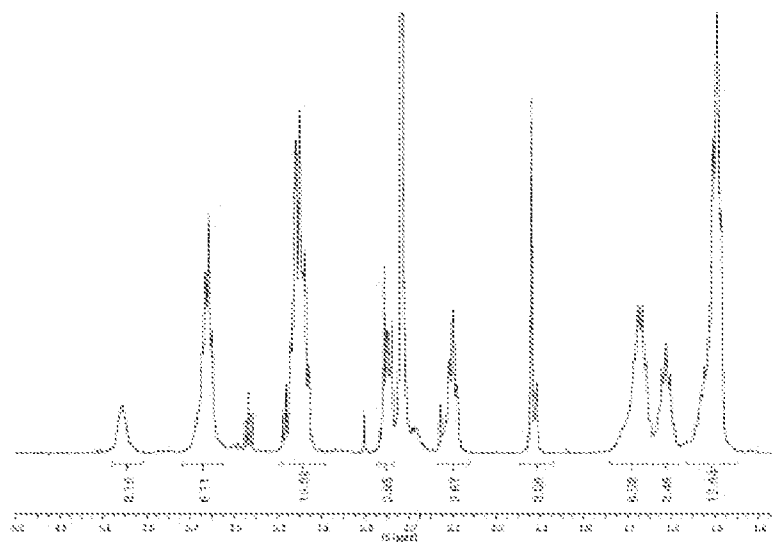


Figura 43

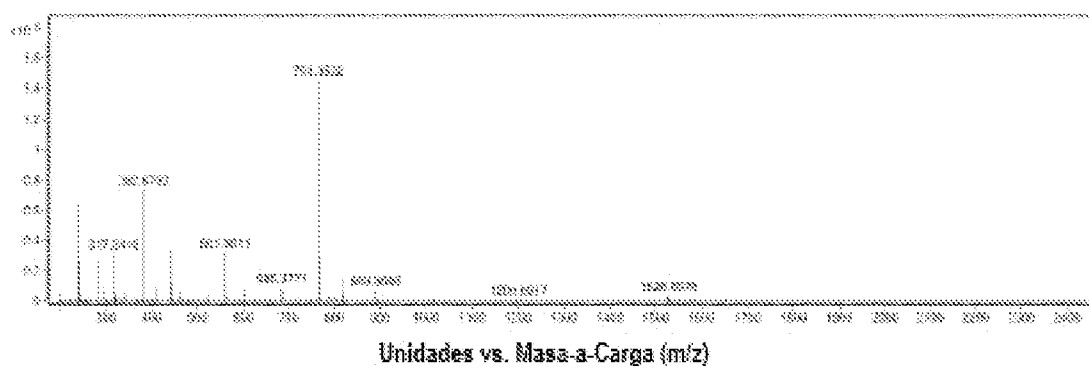


Figura 44

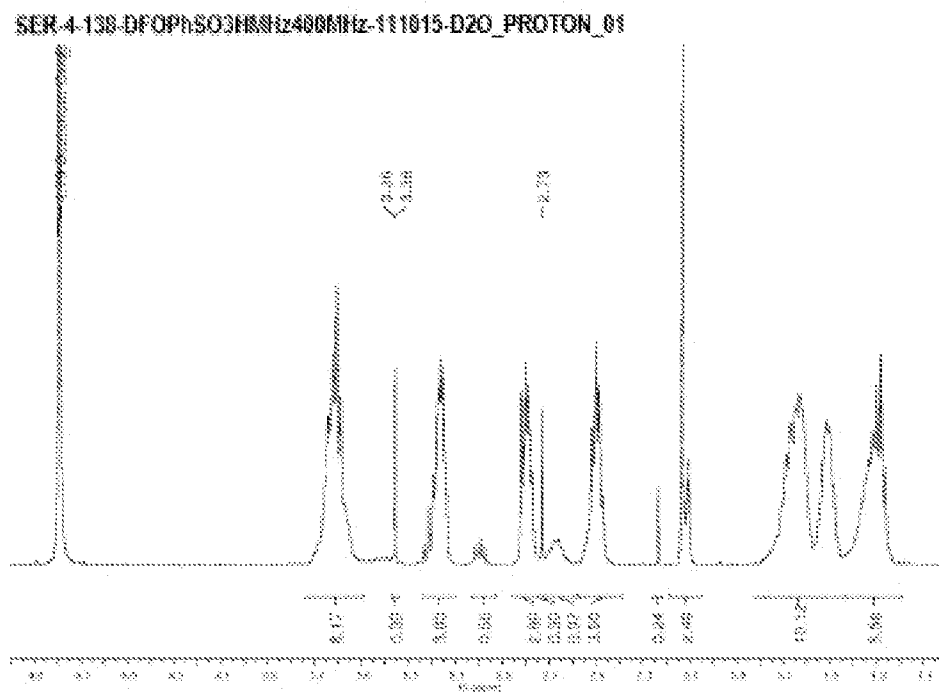


Figura 45

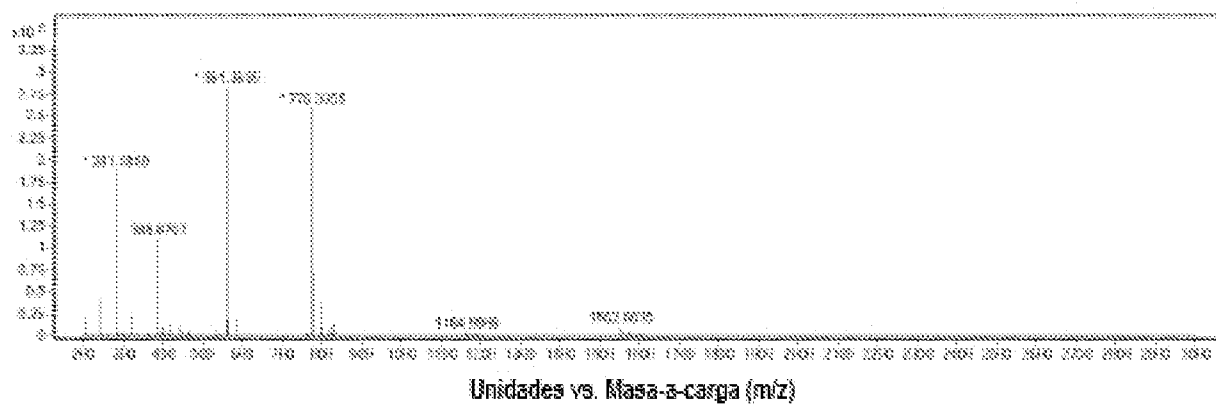


Figura 46

