

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES
(PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2016/058066 A1

(43) Data de Publicação Internacional
21 de Abril de 2016 (21.04.2016)

WIPO | PCT

(51) Classificação Internacional de Patentes :
C07F 5/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C01F 17/00 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2015/000118

(22) Data do Depósito Internacional :
30 de Julho de 2015 (30.07.2015)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
BR 10 2014 025660 1
15 de Outubro de 2014 (15.10.2014) BR

(71) Requerente : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS - UNICAMP [BR/BR]; Rua Roxo Moreira,
1831, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de
Barão Geraldo, Caixa Postal 6131, Campinas - SP (BR).

(72) Inventores : SIGOLI, Fernando Aparecido; Rua Cinco,
261, Bairro Betel, CEP: 13140-000 - Paulínia - SP (BR).
MONTEIRO, Jorge H.S.K; Rua Tereza Makarzel, 64,
Distrito de Barão Geraldo, CEP: 13084-065 - Campinas
-SP (BR). DE HOLLANDA, Luciana Maria;
Universidade Tocantins, Unit, Av. Murilo Dantas, 300 -
Farolândia, CEP 49032-490 - Aracaju - SE (BR). DE

BETTENCOURT-DIAS, Ana; 9635, Aidan Way, CEP
89521 - Reno - Nevada (US). LANCELLOTTI, Marcelo;
Rua Tunísia, 28, Parque das Nações, CEP: 13470-170 -
Americana - SP (BR). MACHADO, Daisy; Rua Silveira
Rizzardo, 271, JD. Campos Elíseos, CEP: 13060-854 -
Campinas - SP (BR).

(74) Mandatário : RIBEIRO, Octacílio Machado; Rua Roxo
Moreira, 1831, Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
Distrito de Barão Geraldo, Caixa Postal 6131, CEP 13083-
970 Campinas - SP (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : LANTHANIDE-BINDER COMPLEX, METHOD FOR PRODUCING THE LANTHANIDE-BINDER COMPLEXES,
BINDERS DERIVED FROM DIPICOLINIC ACID, AND USE OF THE LANTHANIDE-BINDER COMPLEXES

(54) Título : COMPLEXO LANTANÍDEO-LIGANTES; PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS LANTANÍDEO-
LIGANTES; LIGANTES DERIVADOS DO ÁCIDO DIPICOLÍNICO; E, USO DOS COMPLEXOS LANTANÍDEO-LIGANTES

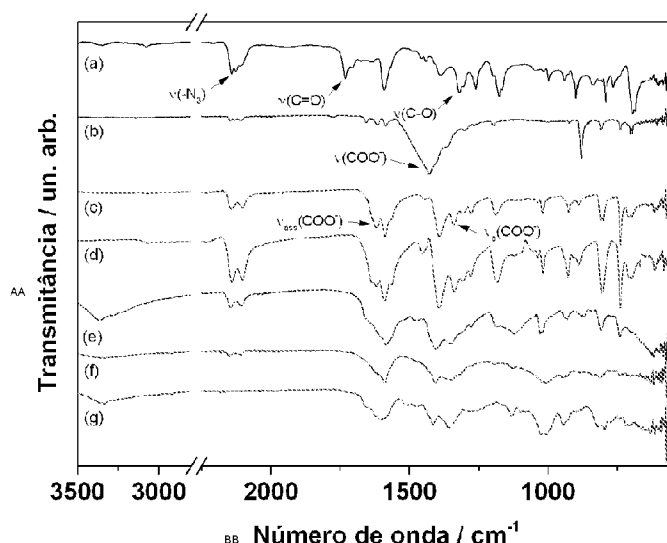


Figura 1

AA Transmittance/arb. unit
BB Wavenumber/cm⁻¹

(57) Abstract : The present invention pertains to
the field of organic binder and coordination
compound chemistry, specifically of lanthanide
complexes, methods for producing same and uses
thereof for imaging diagnostics and treatment of
soft tissue cancers belonging to the group formed
by pancreatic cancer, glioblastoma multiforme,
astrocytomas, oligodendrogliomas and
oligoastrocytomas.

(57) Resumo : A presente invenção pertence ao
campo da química de ligantes orgânicos e
compostos de coordenação, especificadamente de
complexo de lantanídeos, seus processos de
obtenção e usos no diagnóstico por imagem e
tratamento do câncer de tecidos moles pertencentes
ao grupo compreendido de: câncers de pâncreas,
glioblastoma multiforme, astrocitomas,
oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas.

WO 2016/058066 A1



SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,

CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

**COMPLEXOS LANTANÍDEO-LIGANTES; PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS
COMPLEXOS LANTANÍDEO-LIGANTES; LIGANTES DERIVADOS DO ÁCIDO
DIPICOLÍNICO; E, USOS DOS COMPLEXOS LANTANÍDEO-LIGANTES
CAMPO DA INVENÇÃO**

[1]A presente invenção pertence ao campo da química de ligantes orgânicos e compostos de coordenação, especificadamente de complexos de lantanídeos, seus processos de obtenção e usos.

ESTADO DA TÉCNICA

[2]O câncer é uma das patologias que mais preocupam a saúde pública mundial (NAGAHARA et al., 2010). Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS, o impacto global dessa doença, mais que dobrou nos últimos 30 anos. Estatísticas mundiais demonstraram que no ano de 2008 advieram aproximadamente 12 milhões de casos novos com 7,6 milhões de óbitos (WHO, 2009). No Brasil, as estimativas para o ano de 2010/2011 demonstraram que ocorreram aproximadamente 489.270 casos novos/ano, sendo a segunda principal doença com causa mortis conhecida (Inca, 2009).

[3]Dentre os principais tumores estudados destaca-se o glioblastoma multiforme (LIU et al., 2014) e o carcinoma de pâncreas (Inca, 2014), devido à sua agressividade e alta taxa de mortalidade.

[4]Assim, os gliomas são os tumores primários mais diagnosticados no sistema nervoso central (Liu et al., 2014). De acordo com a sua origem podemos dividi-los em astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas (LOUIS et al., 2007; OHGAKI et al., 2009; WELLER, 2011; LIU et al., 2014). Sendo que, os astrocitomas são os mais frequentemente

encontrados em pacientes na idade adulta (POLEDNAK et al., 1995a; WYBRANSKA et al., 2013).

[5] Já o carcinoma de pâncreas é o tipo de câncer mais comum neste órgão, atingindo 90% de todos os casos (Inca, 2014). Atualmente, corresponde à 5ª causa de morte por malignidade no ocidente. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) o colocaram como 2% de todos os tipos de câncer e 4% do total de mortes por câncer. É alta a taxa de mortalidade devido ao diagnóstico tardio e pela sua característica extremamente agressiva. A sobrevida média em 5 anos é menor que 0,4%, após o diagnóstico o tempo de vida em média é de 4 a 6 meses. Se o tumor é operável a sobrevida de vida média em 5 anos é menor que 20%, e em média de 13 a 20 meses de vida após a cirurgia (Inca, 2014). Atualmente as principais metodologias curativas são a ressecção cirúrgica, a quimioterapia e a radioterapia (Inca, 2014).

[6] Portanto novos tratamentos ou diagnósticos para esses dois tipos tumorais são bem-vindos e saudados cientificamente. Dentre as novas metodologias empregadas destaca-se a utilização de complexos de lantanídeos. Complexos com lantanídeos são utilizados como ferramenta diagnóstica em exames para ressonância magnética nuclear (ANTUNES et al., 2008). Como apresentam alto valor comercial, a busca por novos ligantes capazes de se ligar a regiões específicas é de grande interesse industrial e comercial.

[7] Dentre as várias aplicações dos materiais contendo íons lantanídeos destaca-se a aplicação como marcadores luminescentes em sistemas biológicos (MARTINS et al., 2005). A possibilidade de utilização de marcadores luminescentes para sistemas biológicos com certo grau de especificidade

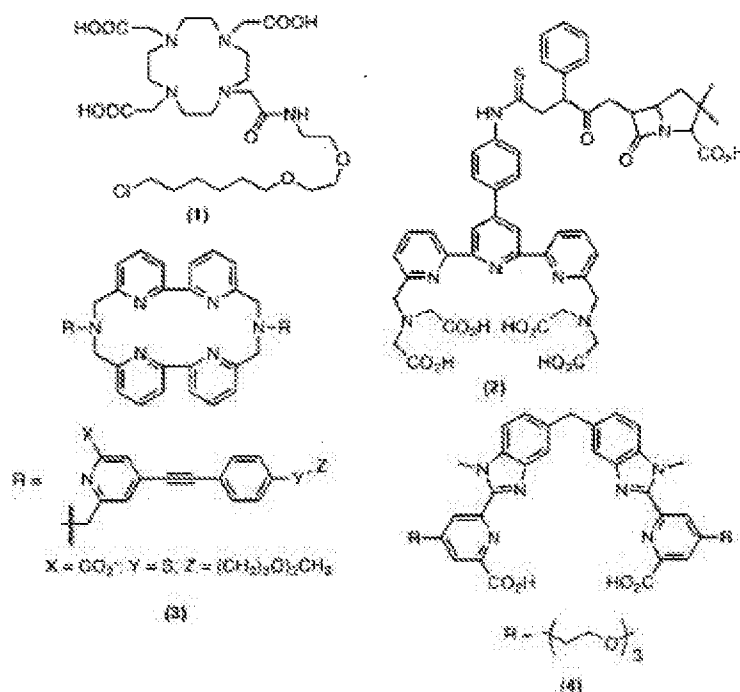
sempre foi alvo de inúmeros grupos de pesquisa, pois permite o rastreamento ou marcação de determinada proteína ou organela que se deseja estudar ou monitorar (MARTINS *et al.*, 2005).

[8] Para o sucesso de um marcador biológico este deve adentrar no meio celular, ou seja, atravessar a membrana celular sem prejuízos à mesma e, dependendo do que se deseja, não interagir com uma organela em específico. Complexos pequenos, sem carga e com caráter lipofílico têm mais chances de atravessar a membrana celular, geralmente complexos com grupos ionizáveis (por exemplo -COOH) só conseguem adentrar na célula através de difusão facilitada ou endocitose (RAJENDRAN; YAPICI; MILLER, 2014). Uma outra estratégia utilizada para garantir que o complexo adentre no meio celular é ancorá-lo em algum tipo de substrato que possua maior facilidade de adentrar no meio celular carregando o complexo. Porém o que se busca é que o complexo possa adentrar sem a necessidade de um tratamento prévio.

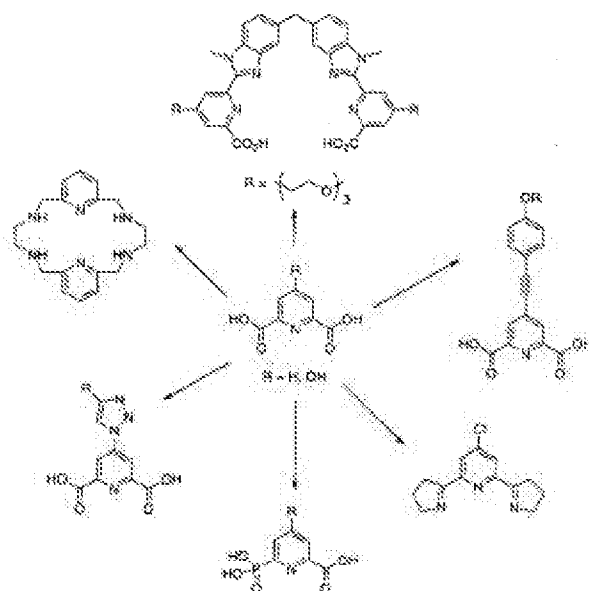
[9] Uma vez o complexo dentro da célula este deve interagir com o alvo de interesse, geralmente complexos com carga global positiva tendem a ser atraídos pela mitocôndria, pois esta possui potencial negativo em suas paredes celulares internas. Complexos com carga global negativa geralmente têm maior mobilidade dentro da célula (RAJENDRAN; YAPICI; MILLER, 2014).

[10] Dentre os ligantes mais utilizados em complexos de lantanídeos para este tipo de aplicação encontram-se: derivados do DOTA (1, STRAUCH *et al.*, 2011), derivados de terpiridinas (2, MIZUKAMI *et al.*, 2011), criptatos (3, BOURDOLLE *et al.*, 2011) e helicatos (4, CHAUVIN *et al.*,

2008), cujas fórmulas moleculares encontram-se abaixo.



[11] Para a síntese dos ligantes utiliza-se o ácido dipicolínico ou quelidâmico como molécula de partida. No esquema abaixo são vistas as moléculas obtidas partindo-se do ácido dipicolínico ($R = H$) ou do ácido quelidâmico ($R = OH$).



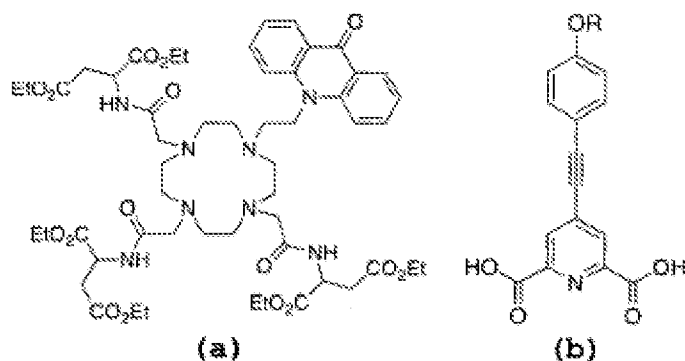
[12] Este reagente de partida é muito utilizado devido

à sua versatilidade e possibilidade de modificação, utilizando rotas orgânicas, tanto na cadeia lateral do ácido carboxílico quanto na posição para do anel piridínico (ANDRES; CHAUVIN, 2011; D'ALÉO et al., 2008; ANDRES; CHAUVIN, 2013; DEITERS et al., 2009; ANDRES; CHAUVIN, 2010; BETTENCOURT-DIAS et al., 2010; CHAMAS et al., 2010).

[13]No caso de modificações somente na posição para do anel piridínico a coordenação ao lantanídeo(III) pode se dar de modo tridentado envolvendo o nitrogênio do anel piridínico e os dois grupos carboxilatos de modo monodentado. BRAYSHAW et al., 1995, utilizaram a difração de raios X do monocristal para mostrar este tipo de coordenação onde se destaca a importância do contra íon que interage com os átomos de oxigênio não ligados ao lantanídeo de modo a formar uma estrutura polimérica, como no caso do complexo $Cs_3[Eu(dipic)_3]$.

[14]Utilizando-se condições adequadas de síntese força-se a coordenação dos grupos carboxilato de outras maneiras formando polímeros de coordenação onde há mais de um tipo de modo de coordenação dos grupos carboxilatos (HOU et al., 2011). Via de regra a modificação na posição para do ácido quelidâmico não influencia de maneira drástica o poliedro de coordenação e normalmente a simetria pontual do íon európio(III) é próxima de um grupo D_{3h} em complexos contendo ligantes derivados do ácido dipicolínico ou quelidâmico. A coordenação tridentada deste tipo de ligante também é importante para a síntese de complexos com potenciais aplicações como marcadores luminescentes por apresentar estequiometria 3:1 (L:Ln), o que confere número de coordenação igual a 9 e impede a coordenação de moléculas do

solvente, além de conferir boa estabilidade termodinâmica e boa solubilidade em sistemas biológicos. Desde o trabalho pioneiro publicado por LAKOWICZ et al., 2001 onde foi mostrado que os íons lantanídeos poderiam ser excitados através do processo de excitação multifóton e PISZCZEK et al., 2001 onde foi mostrado que cromóforos orgânicos podem intensificar a absorção por multifótons, muito se tem explorado em busca de novos ligantes capazes de aumentar a secção de absorção por dois ou três fótons nos complexos contendo európio(III) ou térbio(III). Muitos trabalhos reportaram a possibilidade de estender a conjugação do anel piridínico para deslocar a banda de excitação dos complexos para comprimentos de onda que possam ser eficientemente excitados pelos lasers utilizados em microscópios para o bioimageamento bem como a possibilidade de excitação por dois fótons (TPA). A excitação por dois fótons se mostra uma opção interessante, pois o material biológico tem baixa absorção próximo de 800 nm. D'ALÉO et al., 2008; PICOT et al., 2008; D'ALÉO et al., 2007; MAURY et al., 2013; ELISEEVA et al., 2010 mostraram que a extensão da conjugação do anel piridínico torna possível a excitação eficiente por dois fótons de complexos contendo európio(III) ou térbio(III). O planejamento de ligantes capazes de ter bandas de excitação próximo do visível ou excitação por multifótons segue, basicamente, duas linhas: (i) cromóforo conectado à unidade coordenante, porém sem conjugação eletrônica (vide abaixo em (a)) ou (ii) cromóforo conectado à unidade coordenante com conjugação eletrônica (vide abaixo em (b)).

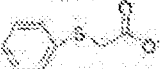
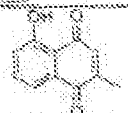
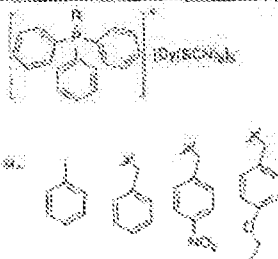
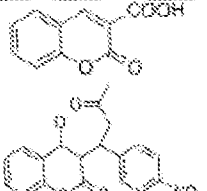


[15] Moléculas que apresentam absorção de energia em altos comprimentos de onda geralmente possuem estrutura eletrônica altamente conjugada e estados de transferência de carga com baixa energia. A estabilização do estado de transferência de carga é induzida, além da alta conjugação, pelo que se chama de estrutura *push-pull*, ou seja, presença de grupos elétron doadores e elétron receptores na estrutura da molécula. Neste caso, a coordenação do lantanídeo diretamente na antena estabiliza ainda mais os estados de transferência de carga pois o lantanídeo aumenta o efeito *push-pull*. WERTS et al. 1999 observou que a coordenação da cetona de Michler ao complexo $[\text{Eu}(\text{fod})_3]$ promovia o deslocamento batocrômico para a região do visível da banda de absorção, a qual possuía caráter solvatocrômico, o que é uma característica dos estados de transferência de carga. Entretanto, no trabalho os autores não conseguiram excluir a transferência de energia via triplete mas sugeriram que poderia haver um outro tipo de mecanismo de transferência de energia. Exemplos mais recentes mostram que o nível triplete pode não estar envolvido na transferência de energia mas é difícil excluir este mecanismo totalmente (ANDRES; CHAUVIN, 2013).

[16] Além da aplicação como marcador luminescente alguns

complexos de íons lantanídeos(III) podem apresentar atividade citotóxica contra células neoplásicas. REJI; PEARL; ROSY, 2013 reportaram complexos contendo európio(III) ou neodímio(III) com o ligante ácido feniltioacetato (Tabela 1**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) capaz de clivar o DNA e exibir atividade citotóxica contra células causadoras de câncer cervical (HeLa) e cólon (HCT116) em humanos. Os complexos se mostraram mais citotóxicos que o ligante isolado, o que mostra que os lantanídeos têm papel essencial na atividade citotóxica com valores de IC50 iguais a 47,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 45,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no caso do complexo contendo európio(III) para células HeLa e HCT116, respectivamente, e 43,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 28,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no caso do complexo contendo neodímio(III) para células HeLa e HCT116, respectivamente. Os valores de IC50 ainda são relativamente altos se comparados a fármacos comerciais utilizados para o tratamento de câncer cervical cujos valores são 1,5 - 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (estramustina), 22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (noscapina) e 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (cisplatina) ou câncer de cólon com IC50 igual a 29,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (etoposida). CHEN et al., 2011 reportaram atividade citotóxica de complexos contendo íons lantanídeos contra células causadoras de câncer no fígado (BEL7404) cuja taxa de inibição determinada foi de aproximadamente 50 % e IC50 aproximado de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, valor este bem inferior a fármacos convencionais como a cisplatina, cujo valor de IC50 é de aproximadamente 35 $\mu\text{mol L}^{-1}$. LI et al., 2012 reportaram atividade magnética e citotóxica de alguns complexos aniônicos contendo disprósio(III) e cátions derivados de fósforo (Tabela 1**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) contra alguns tipos de células causadoras de câncer

pancreático. Apesar do efeito citotóxico contra células cancerígenas, aparentemente os complexos são citotóxicos também para células saudáveis, não sendo portanto específicos. KOSTOVA; STEFANOVA, 2010a, 2010b reportaram atividade citotóxica de complexos contendo lantanídeos contra células causadoras de melanoma (B16) e fibrosarcoma (L929) em ratos. Os complexos apresentaram IC50 aproximado de 49,5; 57,5; 15,1; 21,9 μmolL^{-1} para os complexos contendo európio(III), praseodímio(III), lantânio(III) ou disprósio(III), respectivamente, contra células do tipo B16 e IC50 aproximado de 35,3; 61,2; 13,9; 21,4 μmolL^{-1} para os complexos contendo európio(III), praseodímio(III), lantânio(III) ou disprósio(III), respectivamente, contra células do tipo L929. Para todos os casos os complexos tiveram que ser dissolvidos em uma pequena quantidade de dimetilsulfoxido (DMSO) por não apresentarem solubilidade em sistema aquoso e todos os testes foram feitos *in vitro*. As estruturas dos ligantes e as células alvo de alguns dos complexos citados acima são mostrados na Tabela 1.

Ligante	Citotóxico contra
	Câncer cervical (HeLa) Câncer de colo (HCT116)
	Câncer de fígado (BEL7404)
	Câncer de pâncreas
	Melanoma (B16) Fibrosarcoma (L929)

[17]O estado da técnica antecipa amplamente a utilização de lantanídeos. Os documentos US 20090281290 descreve complexos de lantanídeo contendo ligantes do tipo pybox. WO 2011111607 descreve complexos de lantanídeos com emissão polarizada, e WO 2011057126 antecipa macrocíclicos sem centro metálico para o imageamento.

[18]Desde US2003138976 é conhecido o uso para detecção do ácido dipicolínico que é um subproduto da atividade bacteriana, além do uso da espectroscopia de luminescência tanto para detecção quanto para quantificação dos esporos bacterianos.

[19]WO200643090 antecipa que compostos de lantanídeos que apresentam atividade inibitória da RAF e B-RAF podem ser utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer, tais como câncer colorretal e melanoma. Já o WO200808493 descreve lantanídeos com atividade inibitória contra super produção de histamina e doenças autoimunes, bem como atividade antiproliferativa contra diversos tipos de câncer, tais como câncer das células pequenas do pulmão, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda, síndrome mielodiplástica, carcinoma colorretal e gástrico, glioblastoma e outros.

[20]Embora úteis, os documentos do estado da técnica não antecipam compostos derivados do ácido dipicolínico e/ou pybox modificado, com atividade no diagnóstico por imagem e/ou tratamento do câncer de tecidos moles.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[21]O primeiro objetivo da presente invenção é propor os complexos lantanídeo-ligantes (Ln-L), que apresentam um baixo efeito citotóxico à células saudáveis, solúveis em água e úteis no diagnóstico e/ou tratamento do câncer de tecidos

moles.

[22] Outro objetivo da invenção é propor um processo de obtenção dos complexos lantanídeo-ligantes (Ln-L).

[23] O terceiro objetivo da invenção é propor o uso dos complexos lantanídeo-ligantes (Ln-L) para o diagnóstico do câncer de tecidos moles.

[24] O quarto objetivo da invenção é propor o uso dos complexos lantanídeo-ligantes (Ln-L) para o tratamento do câncer de tecidos moles.

[25] Finalmente, é ainda um objetivo da presente invenção propor ligantes derivados do ácido dipicolínico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[26] Para se obter uma completa visualização dos objetivos da presente invenção, é necessária a leitura deste documento e a análise dos desenhos que o acompanham e aos quais se faz referências conforme segue abaixo.

[27] Figura 1 - Espectros vibracionais na região do infravermelho da série contendo o ligante Ia; (a) Ia na forma protonada; (b) = sal de sódio do ligante Ia; (c) = $\text{Cs}_3[\text{Eu}(\text{Ia})_3]$; (d) = $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{Ia})_3]$; (e) = $\text{Cs}_3[\text{Gd}(\text{Ia})_3]$; (f) = $\text{Cs}_3[\text{Tb}(\text{Ia})_3]$; (g) = $\text{K}_3[\text{Tb}(\text{Ia})_3]$.

[28] Figura 2 - Espectros vibracionais na região do infravermelho da série contendo o ligante Ib. (a) = Ib na forma protonada; (b) = sal de sódio do ligante Ib; (c) = $\text{Cs}_3[\text{Eu}(\text{Ib})_3]$; (d) = $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{Ib})_3]$; (e) = $\text{Cs}_3[\text{Gd}(\text{Ib})_3]$; (f) = $\text{Cs}_3[\text{Tb}(\text{Ib})_3]$; (g) = $\text{K}_3[\text{Tb}(\text{Ib})_3]$.

[29] Figura 3 - Espectros vibracionais na região do infravermelho da série contendo o ligante II: (a) = II; (b) = $[\text{Eu}(\text{II})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$; (c) = $[\text{Gd}(\text{II})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$; (d) = $[\text{Tb}(\text{II})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$.

[30]Figura 4 - células NG97 de glioblastoma utilizando meio celular contendo o complexo $K_3[Eu(L\text{Ib})_3]$ como marcador luminescente em diferentes tempos de incubação da célula ao complexo. (a) Ausência do complexo. (b) 3 h. (c) 6 h. (d) 12 h. (e) 24 h.

[31]Figura 5 - Viabilidade celular de células NIH/3T3 após incubação aos ligantes e seus respectivos complexos, determinada por MTT; (a) 24 h de incubação; (b) 48 h de incubação.

[32]Figura 6 - Viabilidade celular de células NIH/3T3 após incubação aos ligantes e seus respectivos complexos, determinada por VN; (a) 24 h de incubação; (b) 48 h de incubação.

[33]Figura 7 - Viabilidade celular de células NG97 após incubação aos ligantes e seus respectivos complexos, determinada por MTT; (a) 24 h de incubação; (b) 48 h de incubação.

[34]Figura 8 - Viabilidade celular de células NG97 após incubação aos ligantes e seus respectivos complexos, determinada por VN; (a) 24 h de incubação; (b) 48 h de incubação.

[35]Figura 9 - Viabilidade celular de células PANC-1 após incubação aos ligantes e seus respectivos complexos, determinada por MTT; (a) 24 h de incubação; (b) 48 h de incubação.

[36]Figura 10 - Viabilidade celular de células PANC1 após incubação aos ligantes e seus respectivos complexos, determinada por VN; (a) 24 h de incubação; (b) 48 h de incubação.

[37]Figura 11 - fotomicrografias do ensaio de

transposição da barreira hematoencefálica; (a) ausência do complexo $K_3[Eu(L\ Ib)_3]$; (b) presença do complexo $K_3[Eu(L\ Ib)_3]$ utilizando montagem mostrada em (a); (c) presença do complexo $K_3[Eu(L\ Ib)_3]$ utilizando montagem mostrada em (b).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

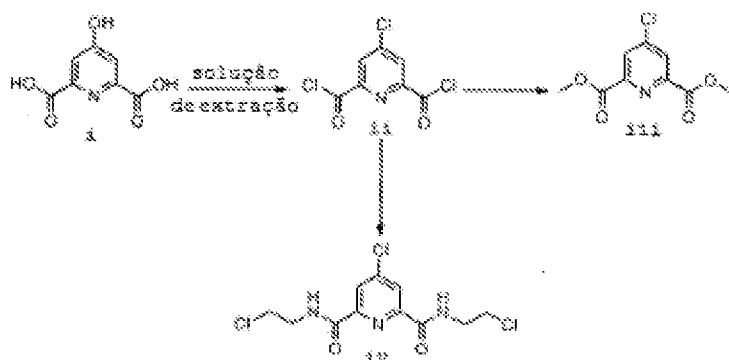
Síntese do ligante $DipicN_3$

[38]O ligante Ia ($DipicN_3$) é derivado do ácido dipicolínico de Fórmula Ia, onde R é N_3 .

[39]Inicialmente na etapa (a), o ácido quelidâmico monohidratado (i) é extraído em uma solução de extração contendo um sal e um catalisador, sob agitação e temperatura variável entre 70°C e 90°C, preferencialmente 80°C, durante um período entre 20 e 30h. O excesso de sal é removido da reação utilizando alto vácuo e sistema trap-by-trap com nitrogênio líquido, sendo obtido o composto intermediário (ii) que é sólido.

[40]Preferencialmente, o sal da solução de extração é o cloreto de tionila ($SOCl_2$) em um volume variável entre 5 e 15 mL, preferencialmente 10 mL. O catalisador é a dimetilformamida (DMF) em um volume variável entre 20 e 100 μ L, preferencialmente 40 μ L.

[41]Como pode ser observado na Equação (1), o composto intermediário (ii) obtido conforme acima, é utilizado para a produção de ambos os compostos intermediários (iii) e (iv).



Equação 1

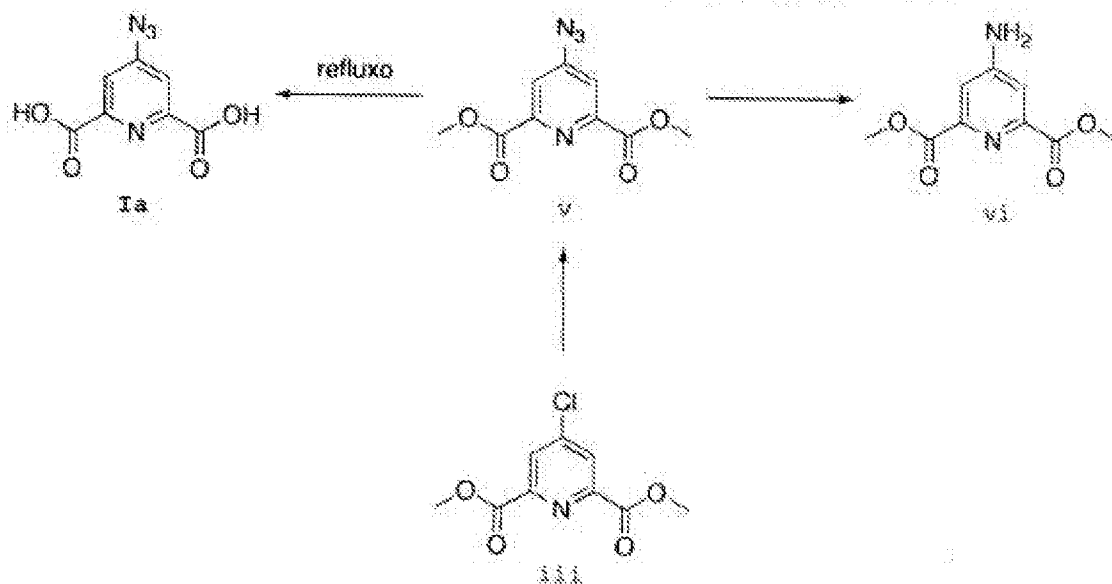
[42] Para a produção dos ligantes Ia, uma primeira fração do composto intermediário (ii) é reagida com um volume variável entre 10 e 30 mL de um álcool C1-C3, preferencialmente 20 mL, sob agitação vigorosa sendo formado um precipitado sólido, que é mantido sob agitação vigorosa durante entre 30 a 90 minutos à temperatura entre 20 e 25°C. Em seguida o álcool C1-C3 é removido sob pressão reduzida e o precipitado sólido é dissolvido com um solvente orgânico. Em seguida a fase orgânica é lavada com água e solução saturada de cloreto de sódio (2x). As fases orgânicas são combinadas, secas com um sal de sódio, tal como o Na₂SO₄, filtradas e o solvente removido sob pressão reduzida para obtenção do composto (iii).

[43] Preferencialmente, nesta etapa, o álcool C1-C3 é o metanol.

[44] Entre 10 e 15 mmol do composto intermediário (iii) é dissolvido com uma solução contendo entre 100 e 150 mmol de NaN₃ e DMF em um volume variável entre 10 e 30 mL, preferencialmente 15 mL, durante entre 20 e 30 h, preferencialmente 24h, sob agitação e aquecimento variável entre 60°C e 80°C, preferencialmente 70°C. Em seguida, a suspensão é refrigerada até atingir a temperatura entre 20°C

e 25°C. Um volume de água variável entre 100 e 1000 mL, preferencialmente 400 mL, é adicionado ao sistema e a suspensão é mantida sob agitação vigorosa até a precipitação do composto intermediário (v), que é removido da solução por filtração e lavado com água gelada.

[45] Em seguida, uma fração contendo entre 6 e 10 mmol do composto intermediário (v) é ressuspensa em uma solução contendo DMF em um volume variável entre 10 e 30 mL, preferencialmente 15 mL e entre 50 e 500 mg, preferencialmente 250 mg, de Pd/C (10% massa de Pd) sob agitação, a temperatura entre 20 e 25°C, durante entre 20 e 36 h, sob fluxo de hidrogênio obtendo-se assim uma solução contendo o composto intermediário (vi) (Equação 2).



Equação 2

[46] O ligante Ia é obtido pela diluição de entre 0,2 g e 1,5 g, preferencialmente 1 g, do composto intermediário (vi) é diluído em solução aquosa contendo NaOH cuja concentração esteja entre 0,5 e 3 mol L⁻¹, preferencialmente 2 mol L⁻¹, sob refluxo e agitação entre 6 e 15 h. Em seguida, é adicionada uma solução aquosa ácida de pH entre 1,5 e 2,5

para sua precipitação.

Ligante DipicN₃

[47]A invenção trata ainda dos ligantes derivados do ácido dipicolínico que apresentam a Fórmula I (Ia):

seus sais e solvatos; em que: R é N₃.

[48]Preferencialmente, o ligante derivado do ácido dipicolínico de Fórmula Ia é o 4-azidopiridina-2,6-dicarboxilato, seus sais e solvatos.

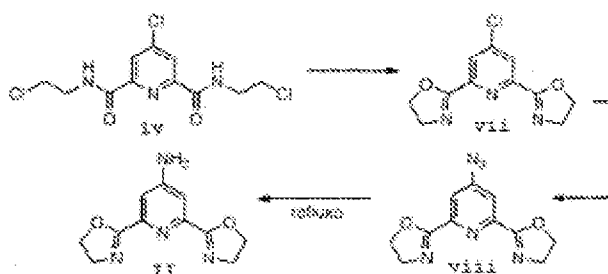
[49]O ligante de Fórmula Ia é útil na produção dos complexos lantanídeo-ligantes Ln-L.

Síntese do ligante PyboxNH₂

[50]Para a produção do ligante II (PyboxNH₂), inicialmente, uma segunda fração do composto intermediário (ii) é dissolvida com um solvente orgânico e transferida a um funil de adição. Em seguida o composto diluído é lentamente adicionado, em uma temperatura entre 0 e 2°C, à solução contendo uma entre 10 e 15 mmol de cloroetilamina protonada e entre 20,0 e 25,0 mmol de uma base forte em banho de gelo. Após completa adição, a temperatura da reação é elevada à temperatura entre 20 e 25°C, e a solução é agitada durante entre 90 e 180 minutos; em seguida o solvente orgânico é novamente adicionado.

[51]Em seguida a fase orgânica é lavada com água e uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. Após a lavagem as fases orgânicas são secas com um sal de sódio, tal como o Na₂SO₄, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida para obtenção do composto intermediário (iv).

[52]A Equação (3) indica as reações que levam à obtenção do ligante de Fórmula (II).



Equação 3

[53]A Equação 3 ocorre quando entre 3 e 6 mmol do composto intermediário (iv) é dissolvido em solvente orgânico e transferido a um funil de adição e a essa solução é adicionada lentamente a uma solução contendo NaH e THF a uma temperatura de 0°C. Em seguida, a temperatura é elevada até 25°C, e mantida sob agitação durante entre 20 e 36 horas. Após esse período, é adicionada água para remoção do excesso de NaH, e a fase orgânica é extraída com um solvente orgânico. Em seguida a fase orgânica é lavada com uma solução aquosa de cloreto de sódio e secada com um sal de sódio, tal como o Na₂SO₄, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida para obtenção do composto intermediário (vii).

[54]Entre 6,5 e 9 mmol do composto intermediário (vii) é dissolvido em um solvente orgânico, com subsequente adição de entre 70 e 85 mmol de NaN₃. A suspensão assim obtida é mantida sob agitação a uma temperatura de entre 60 e 80 °C durante 20 a 36 h. Ao final da reação, o solvente é removido sob pressão reduzida e o composto intermediário (viii) é extraído com a adição de CH₂Cl₂. O produto obtido é lavado com uma solução aquosa de cloreto de sódio e seco com um sal de sódio, tal como o Na₂SO₄, filtrado e o solvente é removido sob pressão reduzida.

[55]Para a obtenção do ligante II, entre 4 e 7 mmol do composto intermediário (viii) é dissolvido em um solvente

orgânico e uma solução entre 4,5 e 7 mmol de NaBH_4 diluído no mesmo solvente usado para dissolver o intermediário (vii). Essa solução é mantida sob agitação e refluxo durante entre 20 e 36 h. Em seguida o ligante II formado é filtrado e lavado com solvente puro e diluído em água para extração.

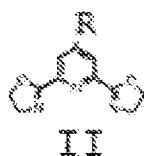
[56] O solvente orgânico usado neste processo é pertencente ao grupo consistido de clorofórmio, dimetilformamida (DMF) e tetrahidrofurano (THF). Nas etapas acima listadas, um único solvente ou todos os solventes podem ser usados independentemente, de acordo com a etapa.

[57] Desta forma, na etapa (a) são produzidos os ligantes de Fórmula I e II, onde preferencialmente R é N_3 ou NH_2 . Mais preferencialmente os ligantes de Fórmula I e II são o 4-azidopiridina-2,6-dicarboxilato, 4-aminopiridina-2,6-dicarboxilato, e 2,6-bis(4,5-dihidroxoxazol-2-il)piridina-4-amina.

[58] Ainda mais preferencialmente, os ligantes de Fórmula I e II são o 4-azidopiridina-2,6-dicarboxilato, 4-aminopiridina-2,6-dicarboxilato, e 2,2''-(4-aminopiridina-2,6-diil)bis(4,5-dihidroxoxazolina).

Ligante PyboxNH₂

[59] A invenção trata ainda dos ligantes derivados do ácido dipicolínico que apresentam a Fórmula II:



seus sais e solvatos, em que: R é NH_2 .

[60] Preferencialmente, o ligante derivado do ácido dipicolínico de Fórmula II é o 2,6-bis(4,5-dihidroxoxazol-2-

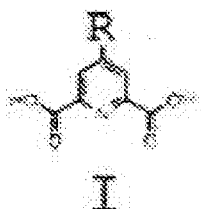
il)piridina-4-amina, seus sais e solvatos.

[61]O ligante de Fórmula II é útil na produção dos complexos lantanídeo-ligantes Ln-L.

Complexo DipicN₃

[62]A presente invenção se refere ao complexo lantanídeo-ligante(Ln-L), onde:

Ln é Eu³⁺, Gd³⁺ ou Tb³⁺; e L é um ligante de Fórmula I



seus sais e solvatos, em que: R é N₃.

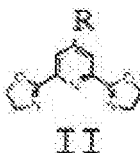
[63]O complexo Ln-L é Ln-4-azidopiridina-2,6-dicarboxilato, seus sais e solvatos.

[64]Os complexos Ln-L, seus sais e solvatos, são solúveis em água e luminescentes. Teste realizados com células PANC-1 e NG97 indicam que os Ln-L da presente invenção são úteis no diagnóstico e tratamento do câncer de tecidos moles, tais como o câncer de pâncreas, o glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas, e são poucos tóxicos às células não carcinogênicas.

Complexo PyboxNH₂

[65]A presente invenção se refere ao complexo lantanídeo-ligante (Ln-L), onde: Ln é lantanídeo, preferencialmente Eu³⁺, Gd³⁺ ou Tb³⁺; e L é um ligante de

Fórmula II



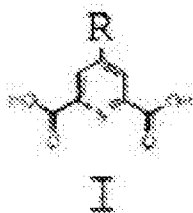
seus sais e solvatos, em que R é NH₂.

[66]O complexo Ln-L é o 2,2'-(4-aminopiridina-2,6-diil)-bis(4,5-dihidrooxazolína).

Processo de obtenção do complexo DipicN3

[67]O processo de produção de complexo lantanídeo-ligante (Ln-L) compreende as etapas de:

(a) Síntese dos ligantes (L); e,



seus sais e solvatos, em que: R é N3.

(b) Síntese dos complexos.

[68]Na etapa (b) a uma solução aquosa em pH entre 5 e 7, preferencialmente 6, contendo entre 1 e 5 mmol do ligante Ia é adicionada entre 0,1 e 1 mmol de um óxido de lantanídeo de fórmula geral Ln₂O₃, sendo mantida sob agitação, a uma temperatura entre 90 e 110°C entre 30 e 90 minutos. Ao final deste tempo, são obtidos os complexos Ln-L Ia, dependendo da solução de partida.

[69]Preferencialmente, nesta etapa no óxido de lantanídeo, Ln é lantanídeo, preferencialmente Eu³⁺, Gd³⁺ ou Tb³⁺.

Processo de obtenção do complexo PyboxNH₂

[70] Alternativamente, na etapa (b), para a obtenção do complexo Ln-L II entre 0,5 e 2 mmol de triflato de lantanídeo de fórmula $\text{Ln}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ é adicionada a uma solução 1:1 de solventes orgânicos contendo entre 1 e 5 mmol do ligante II, sendo mantido sob agitação a uma temperatura entre 40 e 70 °C, entre 2 e 6 h. Preferencialmente, a solução 1:1 de solventes orgânicos é uma solução contendo um álcool C1-C3 e diclorometano, e o lantanídeo é preferencialmente Eu^{3+} , Gd^{3+} ou Tb^{3+} .

[71] Mais preferencialmente, o álcool é o metanol e Ln é Eu^{3+} ou Tb^{3+} .

[72] Os complexos Ln-L Ia, Ln-L Ib e Ln-L II e seus sais e solvatos são solúveis em água, e úteis no diagnóstico e tratamento do câncer de tecidos moles, tais como o câncer de pâncreas, o glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas.

[73] É ainda um objeto da presente invenção o uso dos complexos Ln-L, seus sais e solvatos, no diagnóstico por imagem do câncer de tecidos moles pertencentes ao grupo compreendido de: câncer de pâncreas, glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas.

[74] Outro objeto da presente invenção se refere ao uso dos complexos Ln-L, seus sais e solvatos, para a produção de um medicamento voltado para o tratamento do câncer de tecidos moles pertencentes ao grupo compreendido de: câncer de pâncreas, glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas.

[75] O uso dos complexos Ln-L no diagnóstico e tratamento

do câncer de tecidos moles se dá pois os complexos Ln-L da invenção apresentam um elevado valor de **IC50** para células saudáveis e baixo valor de **IC50** para células neoplásicas, conforme pode ser observado na tabela 2 abaixo:

Compostos	IC50 / $\mu\text{mol L}^{-1}$			IC50 / $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	NIH/3T3	NG97	PANC1	NIH/3T3	NG97	PANC1
L Ia	> 961			> 200		
$\text{K}_3[\text{La}(\text{L Ia})_3]$	> 229			> 200		
$\text{K}_3[\text{Eu}(\text{L Ia})_3]$	> 225	172	217	> 200	153	193
$\text{K}_3[\text{Tb}(\text{L Ia})_3]$	> 224	116	> 224	> 200	104	> 200
L Ib	> 1100			> 200		
$\text{K}_3[\text{La}(\text{L Ib})_3]$	> 251			> 200		
$\text{K}_3[\text{Eu}(\text{L Ib})_3]$	> 247	111	235	> 200	90	190
$\text{K}_3[\text{Tb}(\text{L Ib})_3]$	> 245			> 200		
L II	> 861			> 200		
$[\text{La}(\text{L II})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$						
$[\text{Eu}(\text{L II})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$	> 154			> 200		
$[\text{Gd}(\text{L II})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$						
$[\text{Tb}(\text{L II})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$	> 154	79	> 154	> 200	103	> 200

Exemplos

Exemplo 1 - Síntese do composto intermediário (i) (dimetil-4-cloropiridina-2,6-dicarboxilato):

[76]O composto intermediário (i) foi preparado de acordo com procedimento adaptado de IGLESIAS et al., 2000. 3,0 g (16,4 mmol) de ácido quelidâmico monohidratado foi suspenso em 10 mL de cloreto de tionila (SOCl_2) contendo uma gota de DMF como catalisador. A suspensão foi agitada por 24 h sob refluxo, formando uma solução verde clara. A remoção do excesso de cloreto de tionila foi feita utilizando alto vácuo e sistema *trap-by-trap* com nitrogênio líquido. O sólido branco correspondente ao cloreto de ácido formado não foi isolado, e a este foi adicionado 12 mL de metanol sob agitação vigorosa. Imediatamente houve a formação de um precipitado branco o qual foi mantido em agitação vigorosa a temperatura ambiente por 1 h. Após 1 h o solvente foi removido sob pressão reduzida e o sólido branco dissolvido

em clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com água (2x) e solução saturada de cloreto de sódio (2x). As fases orgânicas são combinadas, secas com Na_2SO_4 , filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida para obtenção de um sólido branco. (Rendimento: 3,08 g; 82%).

Exemplo 2 - Síntese do composto intermediário (v) (dimetil 4-azidopiridina-2,6-dicarboxilato):

[77]O composto intermediário (v) foi sintetizado de acordo com procedimento adaptado de HUANG et al., 2003; CHAMAS et al., 2010). 3,0 g (13,1 mmol de (i) foi dissolvido em DMF e 8,494 g (131 mmol) de NaN_3 foi suspenso formando uma suspensão de cor amarela. A suspensão foi mantida em agitação e aquecimento por 24 h. Após este intervalo de tempo a suspensão foi resfriada até atingir temperatura ambiente e vertida em água e gelo. A agitação vigorosa foi mantida por alguns minutos até precipitação completa de um sólido branco que foi filtrado e lavado com várias porções de água gelada. (Rendimento: 1,81g; 57%).

Exemplo 3 - Síntese do composto intermediário (vi) (dimetil-4-aminopiridina-2,6-dicarboxilato):

[78]O composto (vi) foi sintetizado de acordo com procedimento adaptado da literatura (HUANG et al., 2003). 2,0 g (8,5 mmol) de (v) e 300 mg de Pd/C (10%) foram suspensos em DMF. A suspensão de cor preta foi agitada a temperatura ambiente e sob fluxo de hidrogênio por 24 h. O éster intermediário pode ou não ser isolado. O isolamento do éster é difícil, pois necessita-se passar a suspensão através de filtro contendo Celite. Como o solvente da reação é DMF a maior parte do produto fica retido no filtro de Celite. Desta forma não é recomendável que se isole o intermediário o que

não causa problemas para a próxima etapa uma vez que a conversão da azida em amino é total (verificado por TLC e ^1H -RMN). Porém foi isolado uma pequena parte deste intermediário para efeitos de caracterização.

Exemplo 4 - Síntese dos ligantes Ia (4-azidopiridina-2,6-dicarboxilato) e Ib (4-aminopiridina-2,6-dicarboxilato):

[79] Os ligantes Ia e Ib foram preparados da mesma maneira: 1,3 g dos respectivos ésteres (v ou vi) foram suspensos em solução aquosa contendo 8 mL de NaOH 2,5 mol L⁻¹. A suspensão foi agitada sob refluxo por 12 h. Ao final das 12 h verifica-se a completa solubilização do sólido, fato este que indica a hidrólise do éster gerando o sal de sódio do respectivo carboxilato. O ácido foi precipitado pela adição de solução aquosa 10 % de HCl até pH ~2. O sólido branco formado foi filtrado e lavado com água gelada. (Rendimento: 0,8 g; 71%).

Exemplo 5 - Síntese do composto intermediário (iv) (4-cloro-N², N⁶-bis(2-cloroetil)piridina-2,6-dicarboxamida):

[80] O composto iv foi sintetizado de acordo com procedimento descrito por de BETTENCOURT-DIAS, VISWANATHAN, ROLLET, 2007; NISHIYAMA, 1989. A primeira etapa que consiste na conversão de ácido carboxílico a cloreto de ácido já foi descrito para a molécula i. Após a remoção do excesso de cloreto de tionila o sólido branco foi dissolvido em clorofórmio e transferido a um funil de adição. A solução clorofórmica foi adicionada gota a gota a 0 °C a uma suspensão de 1,496 g (13,2 mmol) de 2-cloroetilamina protonada e 1,37 g (24,4 mmol) de KOH suspensos na menor quantidade de água possível. Após a completa adição o banho

de gelo foi retirado e a suspensão agitada à temperatura ambiente por 2 h. A suspensão foi diluída em clorofórmio lavada com água (2x) e solução aquosa de bicarbonato de sódio (2x). As fases orgânicas são combinadas, secas com Na_2SO_4 , filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. (Rendimento: 1,59 g; 76%).

Exemplo 6 - Síntese do composto intermediário (vii)
2,2'-(4-cloropiridina-2,6-diil)bis(4,5-dihidroxazolina):

[81]O composto (vii) foi sintetizado de acordo com procedimento descrito por de BETTENCOURT-DIAS, VISWANATHAN, ROLLET, 2007; NISHIYAMA, 1989. 1,5 g (4,6 mmol) do composto (iv) foi dissolvido em 10 mL de THF e transferido a um funil de adição. A solução foi adicionada gota a gota a uma suspensão de 1,05 g de NaH em THF a 0 °C. Após a completa adição o banho de gelo foi removido e a suspensão agitada à temperatura ambiente por 24 h. Ao fim das 24 h o excesso de NaH foi eliminado pela adição de água. A fase orgânica foi extraída com clorofórmio (3x). As fases orgânicas são combinadas, lavadas com solução aquosa saturada de cloreto de sódio (2x), secas com Na_2SO_4 , filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. (Rendimento: 1,05 g; 90%)

Exemplo 7 - Síntese do composto intermediário (viii)
2,2'-(4-azidopiridina-2,6-diil)bis(4,5-dihidroxazolina):

[82]O composto (viii) foi sintetizado de acordo com procedimento descrito na literatura (HUANG et al., 2003). 2,0 g (7,9 mmol) do composto (vii) foram dissolvidos em 15 mL de DMF, a esta solução foi adicionado 5,122 g (79 mmol) de NaN_3 , formando uma suspensão de cor amarela. A suspensão foi mantida sob agitação e aquecimento a 70 °C por 24 h. Ao final das 24 h o solvente foi removido sob pressão reduzida

e o produto extraído com diclorometano. A fase orgânica foi lavada com água (2x), as fases combinadas, secas com Na_2SO_4 , filtradas e o solvente removido sob pressão reduzida. (Rendimento: 1,81 g; 88%)

Exemplo 8 - Síntese do ligante II (2,2'-(4-aminopiridina-2,6-diil)bis(4,5-dihidrooxazolina).

[83]O composto II foi sintetizado utilizando método adaptado de PRESTON, GALLUCCI, PARQUETTE, 2005. 1,5 g (5,8 mmol) do composto (viii) foi dissolvido em THF, a esta solução foi suspenso 227 mg (6 mmol) NaBH_4 . A suspensão de cor marrom foi mantida sob agitação e refluxo por 24 h. O precipitado formado foi filtrado lavado com THF e solução aquosa de THF (50 % v/v). (Rendimento: 0,55 g; 41%).

Exemplo 9 - Complexos lantanídeo ligantes Ia e Ib:

[84]Os complexos foram sintetizados de acordo com procedimento adaptado de BRAYSHAW et al., 1995. 0,5 mmol de Ln_2O_3 ($\text{Ln} = \text{La}^{3+}$, Eu^{3+} , Gd^{3+} ou Tb^{3+}) foi adicionado a uma suspensão de água contendo 3 mmol de L (L = Ia ou Ib). A suspensão foi mantida em agitação a 100 °C por 1 h, seguido do ajuste do pH com pequenas porções de M_2CO_3 (M = K^+ ou Cs^+). A formação do complexo foi evidenciada pela completa dissolução da suspensão formando uma solução transparente. A solução foi filtrada, o solvente evaporado e o sólido seco sob vácuo. Para a série de complexos contendo o ligante Ib monocristais aptos para difração de raios X foram obtidos através da difusão lenta de metanol em solução aquosa dos complexos.

Exemplo 10 - Complexos lantanídeo ligante II:

[85]1 mmol de $\text{Ln}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ ($\text{Ln} = \text{La}^{3+}$, Eu^{3+} , Gd^{3+} ou Tb^{3+}) foi adicionado a uma solução diclorometano:metanol (1:1), em

volume, contendo 3 mmol de L (L = Ib II). O sistema foi mantido em agitação e aquecimento de 50 °C por 4 h. A solução de coloração marrom escuro foi filtrada, o solvente evaporado e o sólido recolhido e armazenado em dessecador.

Exemplo 11 - caracterização dos complexos Ia, Ib e II:

[86] Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos na forma de pó em um espectrofotômetro FT-IR Bomem FTLA 2000, no intervalo espectral de 3500 a 550 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} . Os deslocamentos químicos dos espectros de ^1H -RMN foram obtidos em solução utilizando solventes deuterados em espectrômetro Varian 400 ou 500 MHz. Todos os espectros de massas foram obtidos em solução nos modos positivo ou negativo no equipamento Waters Micromass ZQ quadrupole.

[87] Os espectros de emissão e de excitação foram obtidos a 77 K e 298 K, respectivamente, utilizando-se espectrofluorímetro Fluorolog-3 (Horiba FL3-22iHR320), com monocromador duplo na excitação (1200 gr/mm, 330 nm blaze) e duplo na emissão (1200 gr/mm, 500 nm blaze) como fonte de excitação foi utilizada lâmpada contínua de xenônio de 450 W de potência *ozone free*. O espectro de excitação foi obtido na faixa 250 - 500 nm e corrigido em tempo real de acordo com a intensidade da lâmpada e o sistema óptico do monocromador de excitação utilizando diodo de silício como referência. Os espectros de emissão foram obtidos na faixa 450 - 750 nm utilizando modo de detecção *front face* (22,5 °) para sólidos ou *right angle* (90 °) para solução. Todos os espectros foram corrigidos de acordo com o sistema óptico do monocromador de emissão e a resposta da fotomultiplicadora (Hamamatsu R928P). Os valores de rendimento quântico para os

complexos de európio(III) e térbio(III) foram obtidos com as amostras em solução de concentração igual a $1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ em relação aos padrões de európio ($\text{Cs}_3[\text{Eu}(\text{Ia})_3]$, $\phi \sim 24\%$) ou térbio ($\text{Cs}_3[\text{Tb}(\text{Ia})_3]$, $\phi \sim 22\%$). As excitações foram escolhidas de modo que o valor da absorção no comprimento de onda obedecesse a condição: $A \leq 0,05$. Os espectros de emissão ou excitação foram corrigidos em tempo real de acordo com a intensidade da lâmpada e o sistema óptico do monocromador de emissão (no caso dos espectros de emissão) ou excitação (no caso dos espectros de excitação) utilizando diodo de silício como referência. Os tempos de vida do estado emissor $^3\text{D}_0$ do európio(III) e $^3\text{D}_4$ do térbio(III) nos complexos foram obtidos pelas curvas de decaimento de emissão com excitação na banda do ligante com o fosforímetro Horiba Jobin Yvon, modelo FL-1040 e lâmpada pulsada.

[88] Os espectros de infravermelho foram obtidos com intenção de verificar a coordenação do metal pelos ligantes. Para todas as séries de complexos contendo o mesmo ligante e diferentes íons lantanídeos o perfil dos espectros obtidos é similar. Na Figura 1 é apresentado o espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante Ia na forma protonada e desprotonada bem como os respectivos complexos contendo Eu^{3+} , Gd^{3+} e Tb^{3+} . A atribuição dos principais modos vibracionais está mostrada na Tabela 1.

Composto	$\nu(\sim\text{N}_2) /$ cm^{-1}	$\nu(\text{C}=\text{O}) /$ cm^{-1}	$\nu_{\text{asim}}(\text{COO}^-) /$ cm^{-1}	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-) /$ cm^{-1}	$\nu(\text{C}-\text{O}) /$ cm^{-1}
Ia	2144 e 2103	1729	-	-	1317 e 1305
Na_3Ia	2144 e 2103	-	1540 - 1373	-	-
$\text{Cs}_3[\text{Eu}(\text{Ia})_3]$	2144 e 2103	-	1624	1335	-

$K_3[Eu(Ia)_3]$	2144 e 2103	-	1630	1335	-
$Cs_3[Gd(Ia)_3]$	2144 e 2103	-	1640	1350	-
$Cs_3[Tb(Ia)_3]$	2144 e 2103	-	1629	1350	-
$K_3[Tb(Ia)_3]$	2144 e 2103	-	1647	1350	-

[89] Na Figura 2 é apresentado o espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante Ib na forma protonada e desprotonada bem como os respectivos complexos contendo Eu^{3+} , Gd^{3+} e Tb^{3+} . A atribuição dos principais modos vibracionais está mostrada na Tabela 2 abaixo.

Composto	$\nu(N-H)$ / cm^{-1}	$\nu(C=O)$ / cm^{-1}	$\nu_{as}(COO^-)$ / cm^{-1}	$\nu_s(COO^-)$ / cm^{-1}	$\nu(C-O)$ / cm^{-1}
Ib	3359 e 3327	1707	-	-	1352 e 1334
Na_2Ib	-	-	1525 - 1334	-	-
$Cs_3[Eu(Ib)_3]$	3349	-	1635	1334	-
$K_3[Eu(Ib)_3]$	3349	-	1635	1354	-
$Cs_3[Gd(Ib)_3]$	3349	-	1635	1354	-
$Cs_3[Tb(Ib)_3]$	3349	-	1635	1354	-
$K_3[Tb(Ib)_3]$	3349	-	1635	1354	-

[90] Tanto a série de complexos contendo os ligantes Ia ou Ib apresentam o mesmo comportamento frente à técnica de caracterização utilizando absorção vibracional na região do infravermelho. É amplamente conhecido na literatura que complexos contendo ligantes derivados do ácido dipicolínico se ligam de forma monodentada com relação ao grupo carboxilato, também pode haver a possibilidade de interação do contra íon com o oxigênio não ligado ao lantanídeo conectando unidades vizinhas em uma espécie de "ponte". Os valores obtidos nas Tabelas 1 e 2 mostram que há coordenação

pelo grupo carboxilato, é difícil fazer uma comparação dos valores de $\Delta\nu$ com o sal do ligante devido a mistura de bandas do estiramento C=C e C=N anel piridinico e os estiramentos assimétrico e simétrico do grupo carboxilato.

[91] Na Figura 3 é apresentado o espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante II bem como os respectivos complexos contendo Eu^{3+} , Gd^{3+} e Tb^{3+} . A atribuição dos principais modos vibracionais está mostrada na Tabela 3 abaixo.

Composto	$\nu(\text{N-H})$ / cm^{-1}	$\nu(\text{C=N})_{\text{oxazolina}}$ / cm^{-1}	$\nu(\text{C=C}) +$ $\nu(\text{C=N})$ / / cm^{-1}	$\nu(\text{C-O})$ / / cm^{-1}	$\nu(\text{SO}_3^-)$ / cm^{-1}
Ib	*	1662	1616 ~ 1552	1359 e 1314	-
$[\text{Eu}(\text{II})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$	3343	1662	1614 ~ 1574	1388 e 1320	1031
$[\text{Gd}(\text{II})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$	3341	1644	1614 ~ 1574	1388 ~ 1315	1031
$[\text{Tb}(\text{II})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$	3349	1644	1614 ~ 1574	1382 e 1357	1031

[92] Neste caso o espectro de absorção vibracional na região do infravermelho não forneceu informações relevantes a respeito do modo de coordenação. Só foi possível constatar vibrações relativas ao grupo SO_3^- devido à presença do grupo triflato, o que é um forte indicativo da complexação.

Exemplo 12 - Aplicação dos complexos como marcadores luminescentes:

[93] O complexo $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{L Ib})_3]$ testado como marcador luminescente de células NG97, pois apresentou melhor valor de rendimento quântico e também luminescência quando excitado em 405 nm. O outro motivo que levou à escolha do complexo de európio(III) é que sua emissão se localiza na região do vermelho, onde há baixa intensidade de emissão do

material biológico. As imagens de microscopia foram obtidas na ausência do complexo, além de utilizando-se concentração do complexo igual a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ e tempos de incubação da célula ao complexo iguais a 3, 6, 12 e 24 h respectivamente.

[94] Na Figura 4 podem ser observadas células NG97 de glioblastoma crescidas em meio celular contendo o complexo $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{L Ib})_3]$ como marcador luminescente em diferentes tempos de incubação da célula ao complexo. (a) Ausência do complexo. (b) 3 h. (c) 6 h. (d) 12 h. (e) 24 h. Em todos os casos a primeira coluna refere-se à imagem somente das células, a segunda coluna à emissão do complexo e a terceira coluna à sobreposição das duas imagens.

Exemplo 12 - citotoxicidade dos complexos frente a células saudáveis e neoplásicas:

[95] Células PANC-1 (ATCC® CRL-1469™, carcinoma epitelioide de ducto pancreático); NG97 (astrocitoma tipo III e IV) e NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™, fibroblasto embrionário de *Mus musculus*) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (BSA, Cultilab, BR) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina, Cultilab, BR). As células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm^2 ou em placas de 60 cm^2 , na densidade de 2×10^4 células mL^{-1} e incubadas a 37 °C sob atmosfera com 5 % de CO_2 .

[96] A viabilidade celular é avaliada através da medida da capacidade das células de reduzir o MTT (3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio) a formazan. O formazan é um pigmento insolúvel que é extraído das células e quantificado espectrofotometricamente em $\lambda = 570 \text{ nm}$. A redução do MTT é catalisada principalmente pelas desidrogenases mitocondriais e também do citoplasma.

Portanto, a alteração da função mitocondrial poderá ser detectada através da variação da capacidade de redução do MTT.

[97]As células foram plaqueadas na densidade de 10×10^3 células mL^{-1} em placas de 96 poços e incubadas a 37°C , 5% de CO_2 por 24 h. O meio foi substituído pelos compostos testes diluídos em meio suplementado. Após 24 e 48 h de incubação, o meio de tratamento será removido, os poços serão lavados com tampão salina tamponado com fosfato (BSA) e adicionado meio sem soro contendo o corante MTT ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Após incubação por 3 h a 37°C , o meio será retirado cuidadosamente e adicionado 100 μL de etanol para solubilização do formazan. As placas serão agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada poço será lida no leitor de placas em $\lambda = 570 \text{ nm}$. Os valores serão expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle, onde as células não serão expostas aos agentes testes.

Exemplo 13 - Viabilidade Celular Através da Incorporação do Vermelho Neutro:

[98]A viabilidade celular é avaliada através da medida da capacidade das células de captar o vermelho neutro (VN: hidrocloreto de amino-m-dimetilamino-2-metil-fenazina). As células são fixadas e o VN intracelular é extraído e quantificado espectrofotometricamente em $\lambda = 540 \text{ nm}$. A captação do VN é realizada pelos lisossomos e então, este teste reflete a integridade da membrana dos lisossomos e consequentemente, um indicativo da viabilidade celular.

[99]Após a exposição às diferentes concentrações dos compostos, as células serão lavadas com PBS e serão adicionados 100 μL de meio sem soro contendo $50 \mu\text{mol mL}^{-1}$ do

corante vermelho neutro. Após 3 h de incubação em estufa úmida a 37 °C contendo 5% de CO₂, as células serão lavadas com solução de fixação de formol/cálcio (formol 4% acrescido de CaCl₂ 1%) por 2 min e o corante captado pelos lisossomos será extraído com solução de extração de ácido acético 1%/etanol 50%. As placas serão agitadas por 10 min e a absorbância correspondente a cada poço será lida no leitor de placas em $\lambda = 540$ nm. A viabilidade celular será expressa em porcentagem em relação ao controle.

[100] A grande vantagem dos complexos Ln-L da presente invenção é sua solubilidade em sistemas aquosos e capacidade de funcionar como marcador luminescente. Porém para que um marcador seja utilizado este não deve possuir atividade citotóxica. Os complexos K₃[Ln(LIa)₃], K₃[Ln(L Ib)₃] e [Ln(L II)₃](CF₃SO₃)₃ bem como os ligantes L Ia, L Ib e L II tiveram sua citotoxicidade testada contra células sadias (NIH/3T3 - Figura 5 e 6), e células neo-plásicas (NG97 - Figura 7 e 8 - e PANC1 - Figura 9 e 10).

[101] Em face dos resultados obtidos fica claro que o ligante por si só não apresenta nenhum tipo de atividade citotóxica em relação a células normais (NIH/3T3) ou neoplásicas (NG97 e PANC1). Sendo de suma importância a presença do lantanídeo para que o composto apresente algum tipo de atividade citotóxica. Atividade esta que é altamente específica contra células NG97 e PANC1 sendo que células normais são minimamente afetadas (Figuras 5 - 10). Este resultado confirma a suspeita inicial levantada nas imagens da marcação luminescente pelo complexo K₃[Eu(L Ib)₃] de células do tipo NG97. É interessante observar que os complexos K₃[Ln(LIa)₃] e [Ln(LII)₃](CF₃SO₃)₃ apresentaram

atividade relativamente maior que os complexos $K_3[Ln(L\text{Ib})_3]$. Seria esperado que ambos os ligantes LII e LIII apresentassem atividade semelhante uma vez que ambos contêm grupo amina na posição para do anel piridinico. Há, porém, uma única diferença entre estes dois complexos no que se refere a carga do íon complexo. O complexo que apresenta maior atividade, o qual contém o ligante L II em sua esfera de coordenação, apresenta carga do íon complexo positiva. Sabe-se que a carga é um fator importante no meio celular o que pode indicar que a carga global positiva interaja com alguma porção ou organela específica da célula que cause maior morte celular quando comparado ao íon complexo com carga negativa.

[102] Um parâmetro importante quando se deseja comparar a atividade citotóxica de potenciais agentes anti neoplásicos é o valor do IC_{50} . O IC_{50} é o valor de concentração suficiente para morte de 50 % da cultura celular. É desejado que um composto possua elevado valor de IC_{50} para células saudáveis e baixo para células neoplásicas.

[103] Em alguns casos não foi possível determinar o valor de IC_{50} pois este não foi atingido com a máxima concentração testada ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). Observa-se que os valores de IC_{50} são extremamente elevados para células saudáveis o que é um bom sinal porém são relativamente altos para as células neoplásicas, uma vez que busca-se valores na faixa de $8 - 20 \mu\text{mol L}^{-1}$ para que os compostos sejam usados comercialmente. Porém considerando-se que células neoplásicas NG97 e PANC1 dificilmente são afetadas pela maioria dos fármacos o resultado obtido neste trabalho possui relevância, pois os complexos apresentados neste trabalho possuem: alta solubilidade em água, possibilidade de atravessar a parede

celular sem auxílio de um transportador, possibilidade de ser utilizado como marcador luminescente, especificidade contra células neoplásicas do tipo NG97 e PANC1 e baixa citotoxicidade contra células saudáveis.

Exemplo 15 - Ensaio de Transposição da Barreira Hematoencefálica:

[104] Quando se busca um composto capaz de marcar ou apresentar atividade anti neoplásica contra tumores localizados no cérebro é importante que este composto seja capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica. Para verificação da capacidade de atravessar a membrana hemato-encefálica foi feito ensaio utilizando procedimento conhecido pelos versados na área, o qual consiste basicamente em reproduzir a barreira hemato-encefálica e verificar a capacidade ou não do composto de atravessar a mesma.

[105] As células endoteliais HUVEC (ATCC® CRL-1730™, endotélio vascular de veia umbilical humana) foram plaqueadas em transwell para placas de 24 poços com poro de 3,0 µm. Após as células HUVEC atingirem a confluência o meio da parte superior da transwell foi substituído por meio contendo 200 µmol L⁻¹ do complexo K₃[Eu(LIb)₃] e a mesma foi colocada em placa de 24 poços que continha no fundo laminula com a linhagem NG97 aderida. Após 24 horas as laminulas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos a temperatura ambiente, seguida de lavagem com PBS e posterior fixação em lâmina por glicerol 70%. As lâminas foram analisadas em microscópio Upright LSM780-NLO.

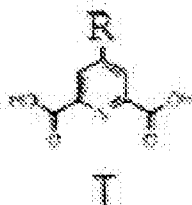
[106] Para este ensaio foi utilizada solução contendo o complexo K₃[Eu(L Ib)₃] com concentração igual a 200 µmol L⁻¹ e tempo de 24 h. Foram feitas imagens da laminula contendo

as células NG97 no fundo do sistema utilizando microscópio confocal e excitação em 405 nm, Figura 11.

[107] A luminescência detectada nas Figuras 11(b) e (c) só podem ser oriundas da emissão do complexo $K3[Eu(L\ Ib)3]$, pois as células do tipo NG97 não apresentam emissão intensa nessa região do espectro (Figura 4(a)). Estes resultados indicam que o complexo $K3[Eu(L\ Ib)3]$ podem atravessar a barreira hemato-encefálica quando constituída somente por células HUVEC ou por uma dupla camada contendo células HUVEC e NG97. A análise das imagens feitas após 24 h da adição do complexo $K3[Eu(L\ Ib)3]$ mostra que as células ainda possuem seu contorno bem definido quando comparadas ao padrão (Figura 4(a)) o que mostra que o complexo de fato deve transpor algum tipo de barreira pois do contrário as células teriam perdido seu contorno relativo quando comparado ao padrão. É possível ainda observar que o complexo, neste estágio, tende a se acumular fora do núcleo, com alguns pontos de maior acúmulo, Figura 11(b) e Figura 11(c).

REIVINDICAÇÕES:

1 - Complexo lantanídeo-ligante (Ln-L), caracterizado por Ln ser lantanídeo; e, L ser um ligante de Fórmula I (Ia):



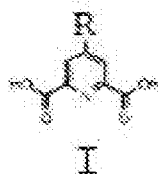
seus sais e solvatos; em que R é N₃.

2 - Complexos lantanídeo-ligantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por lantanídeo ser preferencialmente Eu³⁺, Gd³⁺ ou Tb³⁺

3 - Complexos lantanídeo-ligantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por Ln-L ser Ln-4-azidopiridina-2,6-dicarboxilato; seus sais e solvatos.

4 - Processo de produção de complexo lantanídeo-ligante (Ln-L), caracterizado por compreender as etapas de:

(a) Síntese do ligante (L) de Fórmula I (Ia):



onde R é N₃; e

(b) Síntese dos complexos.

5 - Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de na etapa (a), o ácido quelidâmico monohidratado (i) ser extraído em uma solução de extração contendo um sal e um catalisador, sob agitação e temperatura variável entre 70°C e 90°C, preferencialmente 80°C, e

refluxo, durante um período entre 20 e 30h; o excesso de sal ser removido da reação utilizando alto vácuo e sistema trap-by-trap com nitrogênio líquido, sendo obtido o composto intermediário (ii).

6 - Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de o sal da solução de extração ser o cloreto de tionila (SOCl_2) e o catalisador ser a dimetilformamida (DMF).

7 - Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de uma primeira fração do composto intermediário (ii) ser reagida com um álcool C1-C3 sob agitação vigorosa durante preferencialmente entre 30 a 90 minutos à temperatura preferencialmente entre 20 e 25°C; em seguida o álcool C1-C3 ser removido sob pressão reduzida e o precipitado sólido ser dissolvido com um solvente orgânico; a fase orgânica ser lavada com água e solução saturada de cloreto de sódio por duas vezes; as fases orgânicas serem combinadas, secas com Na_2SO_4 , filtradas e o solvente removido sob pressão reduzida para obtenção do composto (iii).

8 - Processo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de o álcool C1-C3 ser o metanol.

9 - Processo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de entre preferencialmente 10 e 15 mmol do composto intermediário (iii) ser dissolvido com uma solução contendo entre preferencialmente 100 e 150 mmol de NaN_3 e DMF durante entre preferencialmente 20 e 30 h, sob agitação e aquecimento; a suspensão formada ser refrigerada até atingir a temperatura entre preferencialmente 20 e 25°C e mantida sob refrigeração e agitação vigorosa até a precipitação do composto intermediário (v) que é removido da

solução por filtração e, em seguida, lavado preferencialmente com água gelada.

10 - Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de uma fração contendo entre 6 e 10 mmol do composto intermediário (v) ser ressuspensa em uma solução contendo DMF e entre 50 e 500 mg, preferencialmente 250 mg, de Pd/C (10% massa de Pd), sob agitação, a temperatura entre preferencialmente 20 e 25°C, durante entre preferencialmente 20 e 36 h, sob fluxo de hidrogênio para a obtenção da solução contendo o composto intermediário (vi).

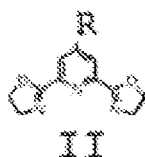
11 - Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato ligante Ia ser obtido pela diluição de entre preferencialmente 0,2 g e 1,5 g do composto intermediário (vi) em solução aquosa contendo entre preferencialmente 0,5 e 3 molL⁻¹ de NaOH, sob refluxo e agitação durante entre preferencialmente 6 e 15 h; em seguida, ser adicionado uma solução aquosa ácida de pH entre preferencialmente 1.5 e 2.5.

12 - Processo, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato ligante Ib ser obtido pela diluição de entre 0,2g e 1,5g, preferencialmente 1g, do composto intermediário (v) em solução aquosa contendo entre preferencialmente 0,5 e 3 molL⁻¹, preferencialmente 2 molL⁻¹ de NaOH, sob refluxo e agitação durante entre preferencialmente 6 e 15 h; em seguida, ser adicionado uma solução aquosa ácida de pH entre preferencialmente 1.5 e 2.5.

13 - Processo, de acordo com a reivindicação 4 **caracterizado** pelo fato de os ligantes de Fórmula I serem o 4-azidopiridina-2,6-dicarboxilato e, o 4-aminopiridina-2,6-

dicarboxilato.

14 - Complexo lantanídeo-ligante caracterizados por Ln ser lantanídeo; e L ser um ligante de Fórmula II:

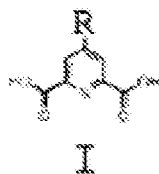


seus sais e solvatos; em que R é NH₂.

15 - Complexo lantanídeo-ligantes, de acordo com a reivindicação 14, caracterizados por lantanídeo ser preferencialmente Eu³⁺, Gd³⁺ ou Tb³⁺

16 - Complexo lantanídeo-ligantes, de acordo com a reivindicação 14, caracterizados por Ln-L ser o 2,2'-(4-aminopiridina-2,6-diil)bis(4,5-dihidrooxazolina).

17 - Ligante caracterizados por apresentarem a de Fórmula I (Ia):

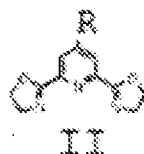


seus sais e solvatos; em que R é N₃.

18 - Ligante, de acordo com a reivindicação 17, caracterizador por ser o 4-azidopiridina-2,6-dicarboxilato, seus sais e solvatos.

19 - Processo de produção de complexo lantanídeo-ligante caracterizado por compreender as etapas de:

(a) Síntese do ligante (L) de Fórmula II:



(b) Síntese do complexo.

20 - Processo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de uma segunda fração do composto intermediário (ii) ser dissolvida com um solvente orgânico e transferida a um funil de adição; o composto diluído ser lentamente adicionado, a uma temperatura entre 0 e 2°C à solução contendo uma entre preferencialmente 10 e 15 mmol de cloroetilamina protonada e entre preferencialmente 20,0 e 25,0 mmol de uma base forte em banho de gelo; após completa adição, a temperatura da reação ser elevada à temperatura entre preferencialmente 20 e 25°C, e a solução ser agitada durante entre preferencialmente 90 e 180 minutos; em seguida o solvente orgânico ser novamente adicionado.

21 - Processo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de a fase orgânica ser lavada com água e uma solução aquosa de bicarbonato de sódio; Após a lavagem as fases orgânicas são secas com um sal de sódio, tal como o Na_2SO_4 , filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida para obtenção do composto intermediário (iv).

22 - Processo, de acordo com a reivindicação 21 caracterizado por entre preferencialmente 3 e 6 mmol do composto intermediário (iv) ser dissolvido em solvente orgânico e transferido a um funil de adição; em seguida essa solução ser adicionada lentamente a uma solução contendo NaH e THF a uma temperatura de 0°C; a temperatura ser elevada

até entre preferencialmente 20 e 25°C, e mantida sob agitação durante entre preferencialmente 20 e 36 horas; após esse período, ser adicionada água para remoção do excesso de NaH e, a fase orgânica ser extraída com um solvente orgânico; lavada com uma solução aquosa de cloreto de sódio e secada com Na₂SO₄, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida para obtenção do composto intermediário (vii).

23 - Processo, de acordo com a reivindicação 19 **caracterizado** por entre preferencialmente 6,5 e 9 mmol do composto intermediário (vii) ser dissolvido em um solvente orgânico, com subsequente adição de entre preferencialmente 70 e 85 mmol de NaN₃; a suspensão ser mantida sob agitação a uma temperatura de entre preferencialmente 60 e 80 °C durante 20 a 36 h; o solvente ser removido sob pressão reduzida e o composto intermediário (viii) ser extraído com a adição de CH₂Cl₂.

24 - Processo, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo fato de o ligante II ser produzido dissolvendo entre preferencialmente 4 e 7 mmol do composto intermediário (viii) em um solvente orgânico e uma solução entre preferencialmente 4,5 e 7 mmol de NaBH₄ diluído no mesmo solvente usado para dissolver o intermediário (vii); a solução ser mantida sob agitação e refluxo durante entre preferencialmente 20 e 36 h; em seguida o ligante II formado ser filtrado e lavado com solvente puro e diluído em água para extração.

25 - Processo, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado** pelo fato de o solvente orgânico ser pertencente ao grupo consistido de clorofórmio, dimetilformamida e tetrahydrofurano.

26 - Processo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por na etapa (b) a uma solução aquosa contendo entre preferencialmente 1 e 5 mmol de um dos ligantes Ia e Ib ser adicionada entre preferencialmente 0,1 e 1 mmol de um óxido de lantanídeo de fórmula geral Ln_2O_3 , sendo mantida sob agitação, a uma temperatura entre preferencialmente 90 e 110°C durante entre preferencialmente 30 e 90 minutos.

27 - Processo, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de o óxido de lantanídeo, Ln ser lantanídeo, preferencialmente Eu^{3+} , Gd^{3+} ou Tb^{3+} ; mais preferencialmente Ln ser Eu^{3+} ou Tb^{3+} .

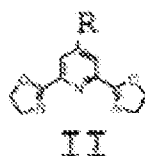
28 - Processo, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por na etapa (b) para a obtenção do sendo do complexo Ln-L II, entre preferencialmente 0,5 e 2 mmol de triflato de lantanídeo de fórmula $\text{Ln}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ ser adicionada a uma solução 1:1 de solventes orgânicos contendo entre preferencialmente 1 e 5 mmol do ligante II, sendo mantido sob agitação a uma temperatura entre preferencialmente 40 e 70 °C, durante entre preferencialmente 2 e 6 h, sendo obtido o complexo Ln-LII.

29 - Processo, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de a solução 1:1 de solventes orgânicos ser uma solução contendo um álcool C1-C3 e diclorometano, e o lantanídeo ser Eu^{3+} , Gd^{3+} ou Tb^{3+} .

30 - Processo, de acordo com a reivindicação 29 caracterizado pelo fato de o álcool ser o metanol e Ln ser Eu^{3+} ou Tb^{3+} .

31 - Processo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo complexo Ln-L II ser o Ln-2,2'-(4-aminopiridina-2,6-di-il)bis(4,5-dihidrooxazolina).

32 - Ligante caracterizados por apresentarem a de Fórmula II:



seus sais e solvatos; em que R é NH₂.

33 - Ligante, de acordo com a reivindicação 32, caracterizador por ser o 2,2'-(4-aminopiridina-2,6-diil)bis(4,5-dihidrooxazolina), seus sais e solvatos.

34 - Uso dos complexos Ln-L, seus sais e solvatos conforme descrito nas reivindicações 1 a 3 caracterizado por ser para o diagnóstico por imagem do câncer de tecidos moles pertencentes ao grupo compreendido de: câncer de pâncreas, glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas.

35 - Uso dos complexos Ln-L, seus sais e solvatos conforme descrito nas reivindicações 14 a 16 caracterizado por ser para o diagnóstico por imagem do câncer de tecidos moles pertencentes ao grupo compreendido de: câncer de pâncreas, glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas.

36 - Uso dos complexos Ln-L, seus sais e solvatos conforme descrito nas reivindicações 1 a 3 caracterizado por ser para a produção de um medicamento voltado para o tratamento do câncer de tecidos moles pertencentes ao grupo compreendido de: câncer de pâncreas, glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas.

37 - Uso dos complexos Ln-L, seus sais e solvatos

conforme descrito nas reivindicações 14 a 16 caracterizado por ser para a produção de um medicamento voltado para o tratamento do câncer de tecidos moles pertencentes ao grupo compreendido de: câncer de pâncreas, glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas.

38 - Uso do ligante DipicNH_2 caracterizado por ser para o diagnóstico por imagem do câncer de tecidos moles pertencentes ao grupo compreendido de: câncer de pâncreas, glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas.

39 - Uso do ligante DipicNH_2 caracterizado por ser para a produção de um medicamento voltado para o tratamento do câncer de tecidos moles pertencentes ao grupo compreendido de: câncer de pâncreas, glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas.

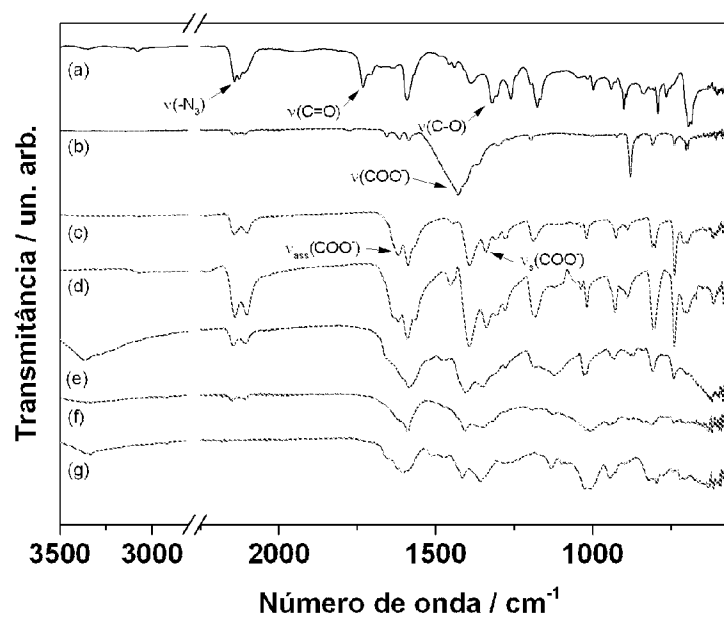


Figura 1

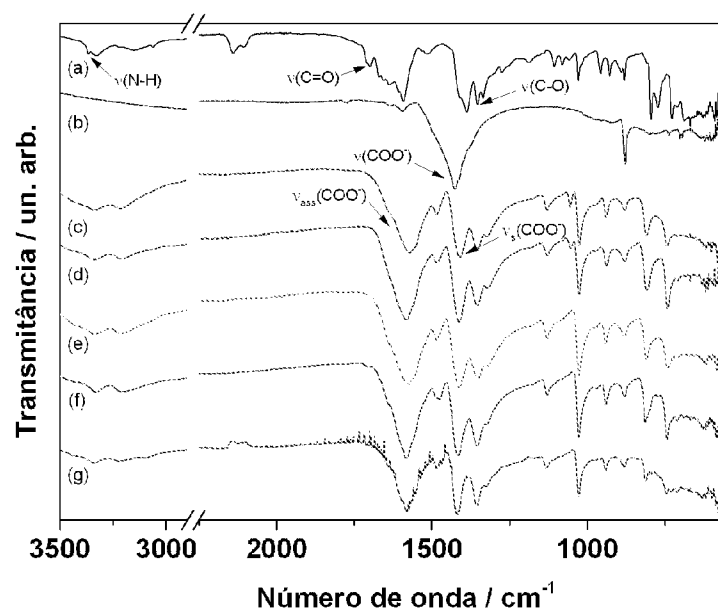


Figura 2

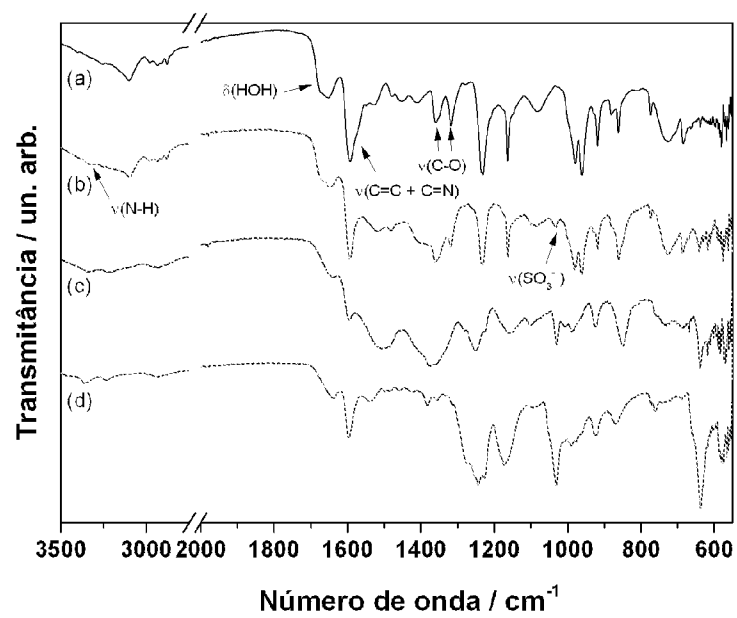


Figura 3

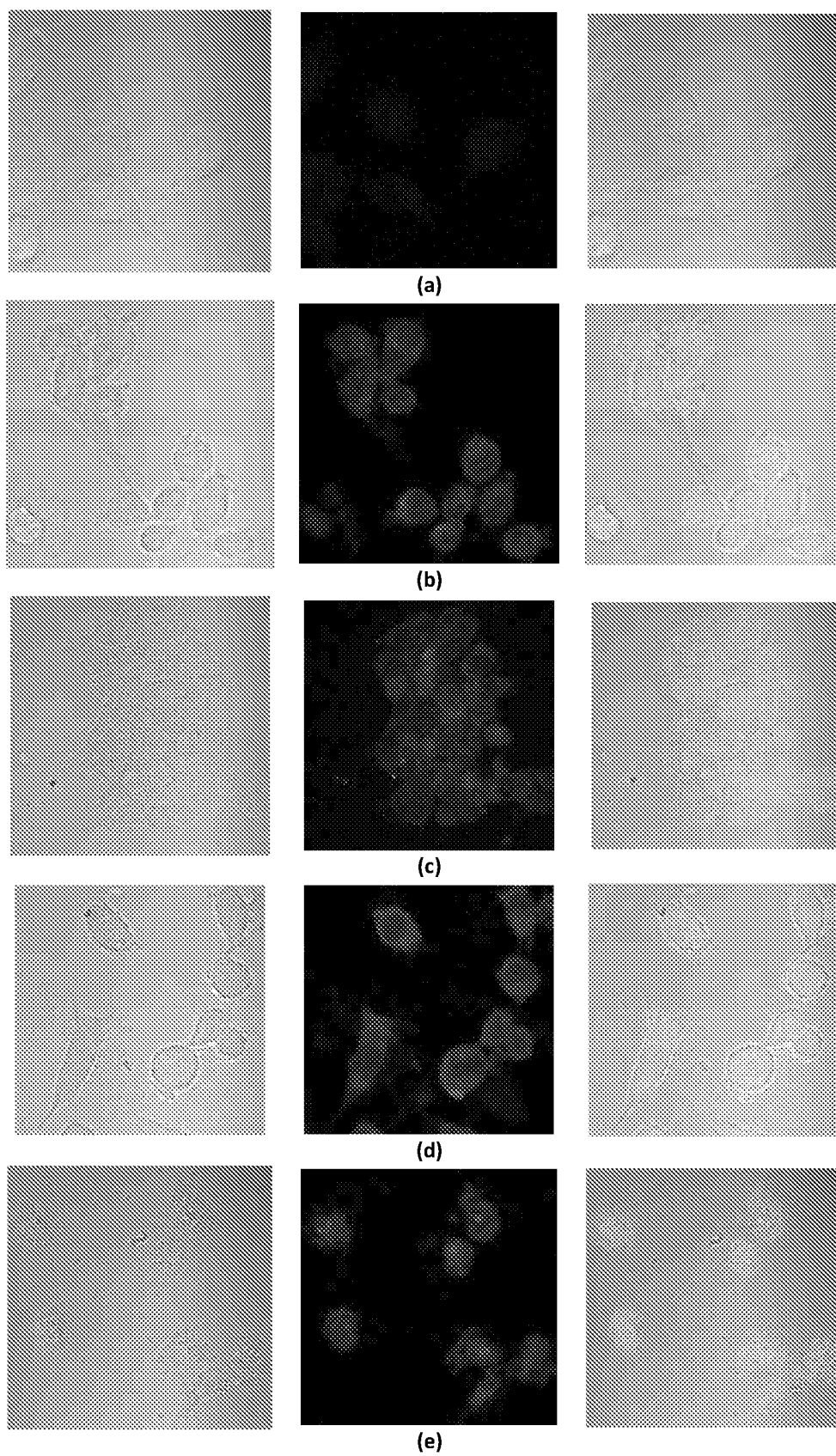


Figura 4

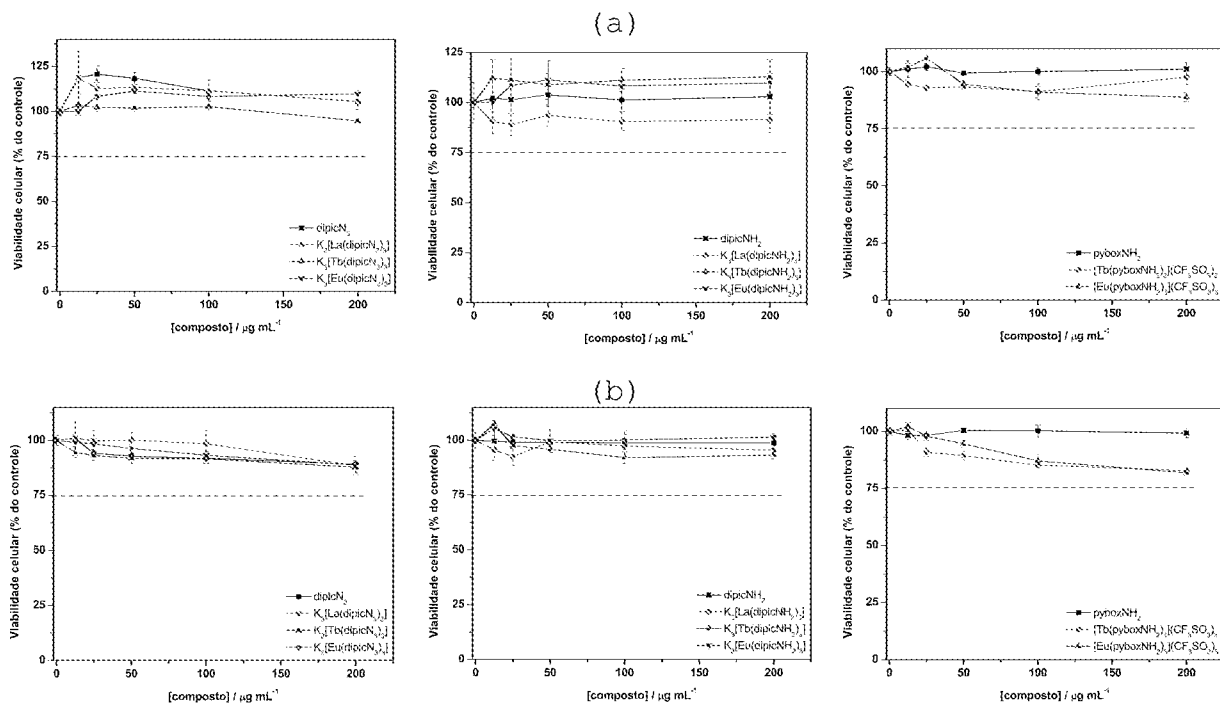


Figura 5

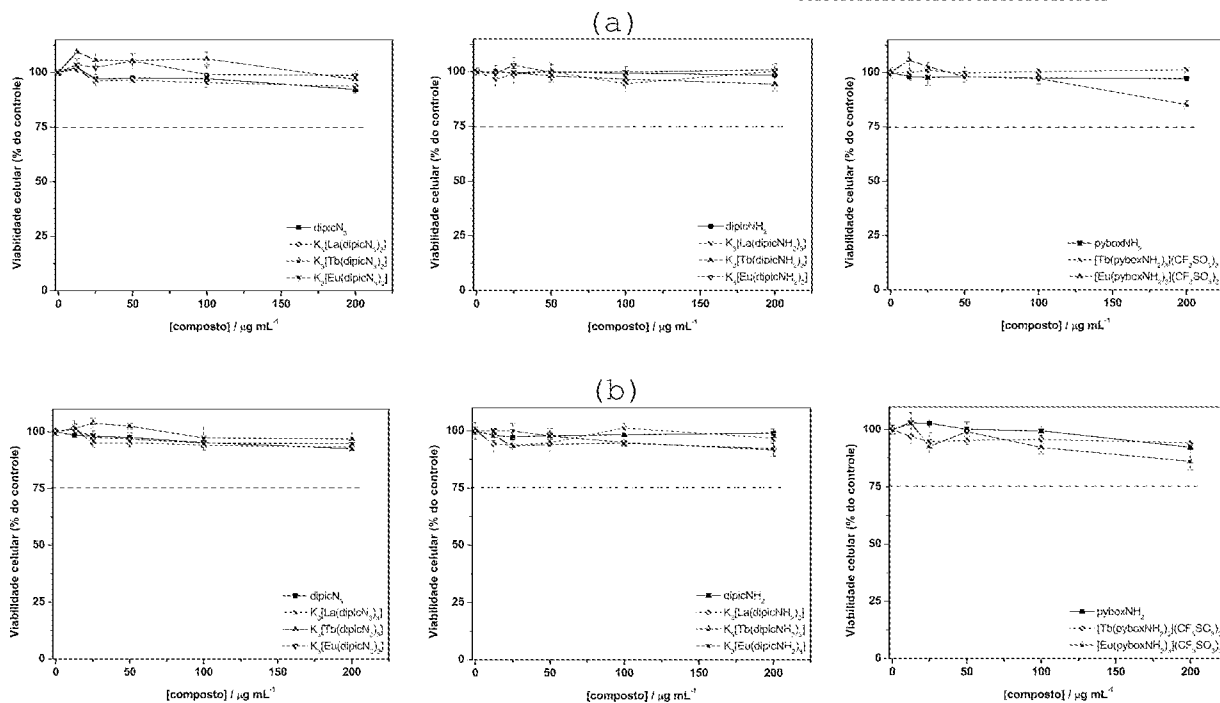


Figura 6

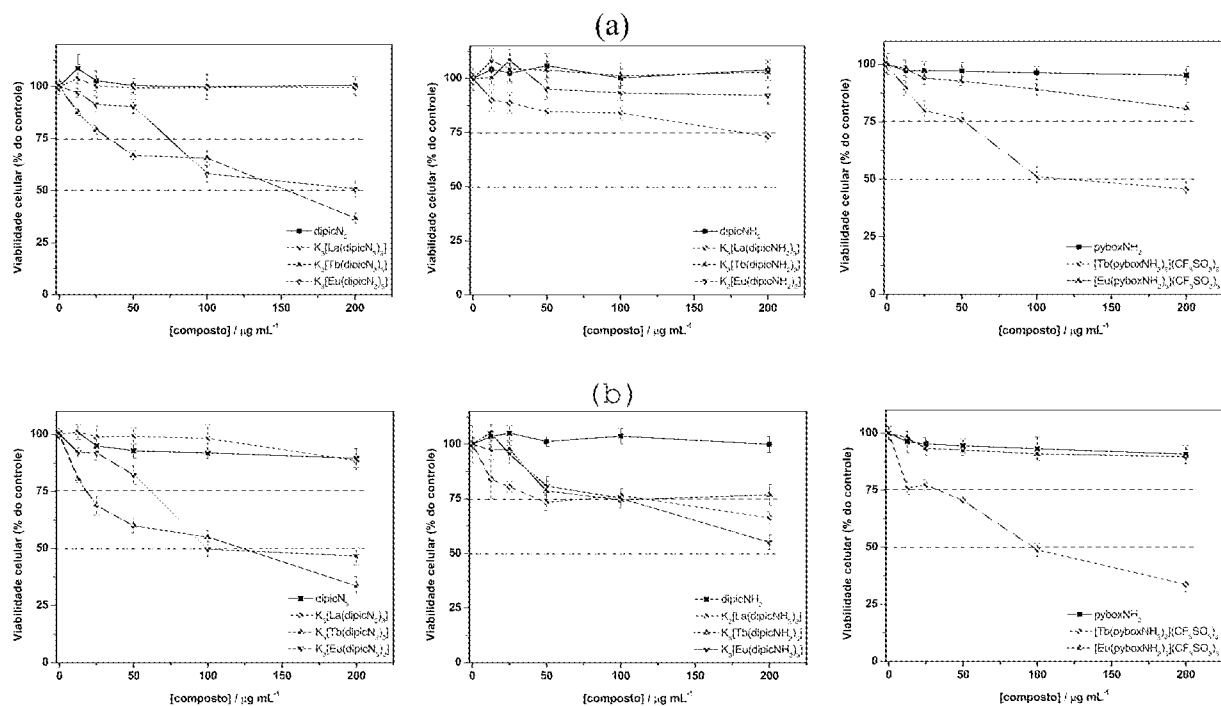


Figura 7

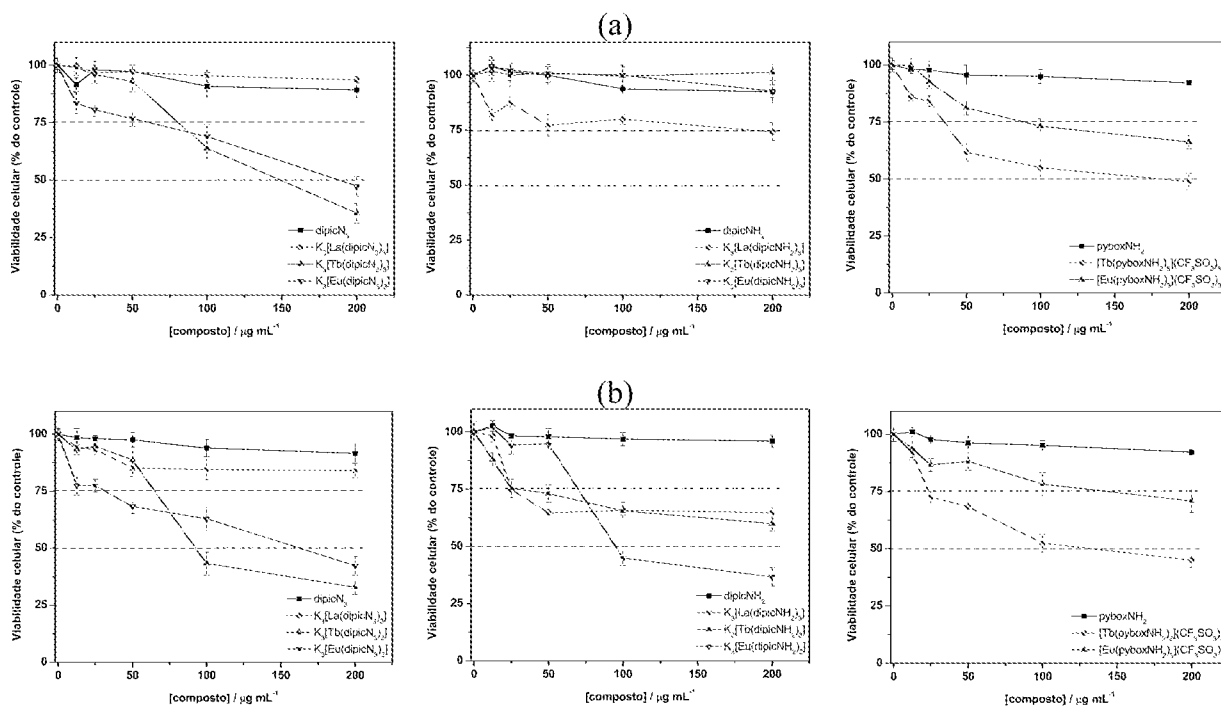


Figura 8

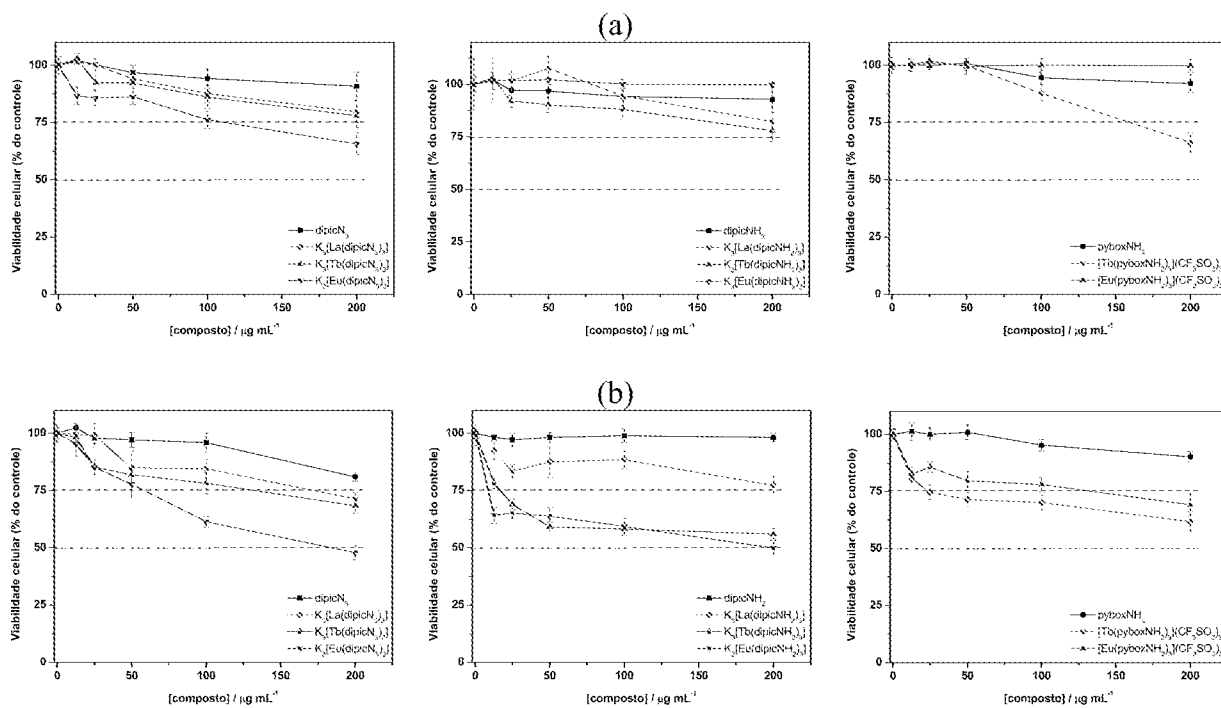


Figura 9

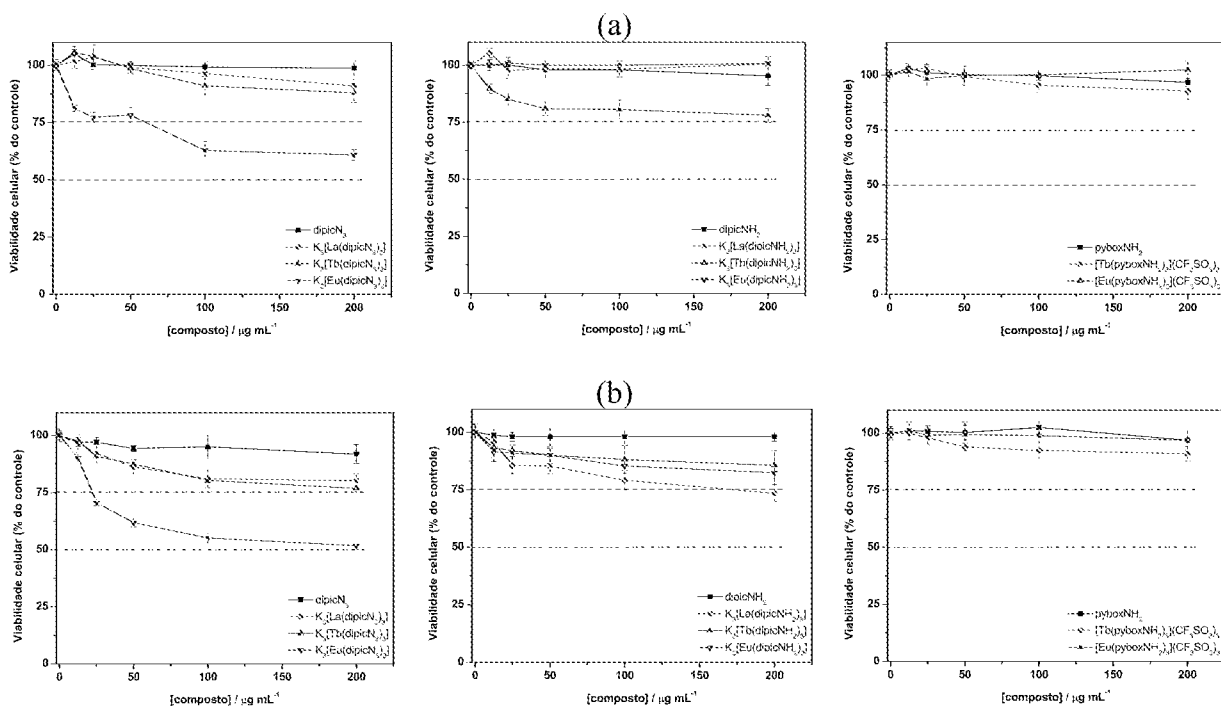


Figura 10

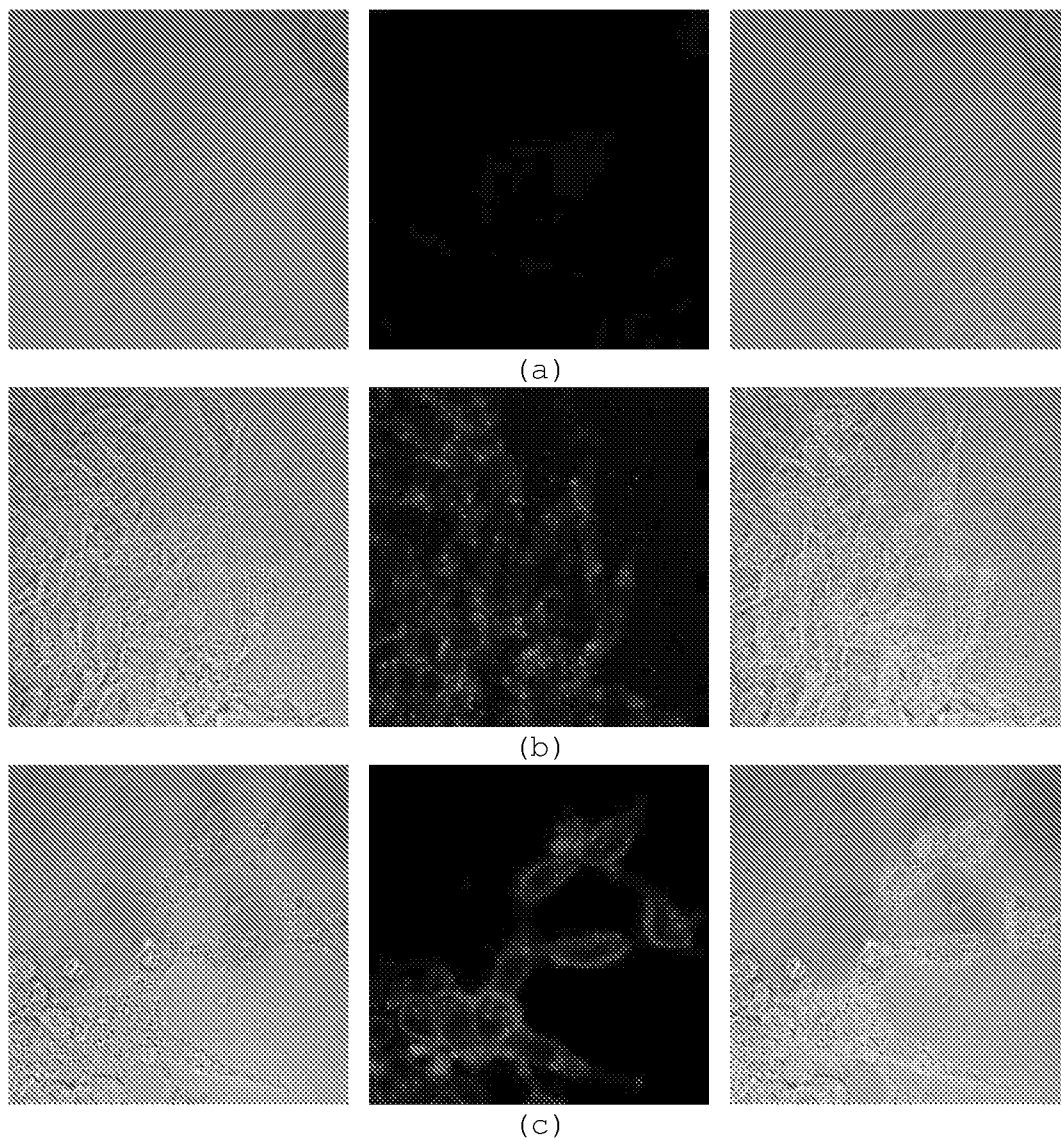


Figura 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2015/000118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07F5/00 (2006.01), C01F17/00 (2006.01), A61P35/00 (2006.01),

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07F5; C01F17; A61P35

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Banco de Patentes Brasileiro (SINPI), Periódicos Capes, Google

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Espacenet, WPI, Index Chemicus, Chemical Abstracts, Integrity, Epodoc

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012077792 A1 (UNIV SINGAPORE [SG]) 29 March 2012 (2012-03-29) The whole document -----	14 a 16, 32, 33, 35, 37, 38, 39
X	US 2009281290 A1 (UNIV SYRACUSE [US]) 12 November 2009 (2009-11-12) The whole document -----	35, 37, 38, 39
X	Zein El Abidine Chamas, Xianmin Guo, Jean-Louis Canet, Arnaud Gautier, Damien Boyer and Rachid Mahiou, Clicked dipicolinic antennae for lanthanide luminescent probes, Dalton Trans., 2010, 39, 7091–7097. The whole document -----	17,18
A	Claire Gaillard, Pierre Adumeau, Jean-Louis Canet, Arnaud Gautier, Damien Boyer, Claude Beaudoin, Cédric Hesling, Laurent Morel and Rachid Mahiou, Monodisperse silica nanoparticles doped with dipicolinic acid-based luminescent lanthanide(III) complexes for bio-labelling, J. Mater. Chem. B, 2013, 1, 4306–4312. -----	1 to 39



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16/09/2015

Date of mailing of the international search report

20/10/2015

Name and mailing address of the ISA/BR


**INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL**
Rua Sao Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ
Facsimile No. **+55 21 3037-3663**

Authorized officer

Luiz Eduardo Kaercher

Telephone No.

+55 21 3037-3493/3742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2015/000118

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Fumihiro Ito, Tomoko Nakamura, Satoko Yorita, Hiroshi Danjo, Kentaro Yamaguchi, Ionic probe attachment ionization mass spectrometry, Tetrahedron Letters 50 (2009) 6252–6255. -----	1 to 39
A	Fumihiro Ito, Shin Ando, Masato Iuchi, Tomoko Nakamura, Satoko Yorita and Kentaro Yamaguchi, N-Labeled ionic probes for bioanalytical mass spectrometry, Org. Biomol. Chem., 2010, 8, 4408–4413. -----	1 to 39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2015/000118

US 2012077792 A1	2012-03-29	US 8691851 B2	2014-04-08
		SG 175012 A1	2011-11-28
		WO 2010114493 A1	2010-10-07
-----	-----	-----	-----
US 2009281290 A1	2009-11-12	US 8889839 B2	2014-11-18
-----	-----	-----	-----

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2015/000118

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

C07F5/00 (2006.01), C01F17/00 (2006.01), A61P35/00 (2006.01),

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C07F5; C01F17; A61P35

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Banco de Patentes Brasileiro (SINPI), Periódicos Capes, Google

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

Espacenet, WPI, Index Chemicus, Chemical Abstracts, Integrity, Epodoc

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	US 2012077792 A1 (UNIV SINGAPORE [SG]) 29 março 2012 (2012-03-29) Todo o documento	14 a 16, 32, 33, 35, 37, 38, 39
X	US 2009281290 A1 (UNIV SYRACUSE [US]) 12 novembro 2009 (2009-11-12) Todo o documento	35, 37, 38, 39
X	Zein El Abidine Chamas, Xianmin Guo, Jean-Louis Canet, Arnaud Gautier, Damien Boyer and Rachid Mahiou, Clicked dipicolinic antennae for lanthanide luminescent probes, Dalton Trans., 2010, 39, 7091–7097. Todo o documento	17,18
A	Claire Gaillard, Pierre Adumeau, Jean-Louis Canet, Arnaud Gautier, Damien Boyer, Claude Beaudoin, Cédric Hesling, Laurent Morel and Rachid Mahiou, Monodisperse silica nanoparticles doped with dipicolinic acid-based luminescent lanthanide(III) complexes for bio-labelling, J. Mater. Chem. B, 2013, 1, 4306–4312.	1 a 39

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C☒ Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

“A” documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

“E” pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

“L” documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

“O” documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

“P” documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

“T” documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

“X” documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

“Y” documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

“&” documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

16/09/2015

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

20/10/2015

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua São Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Nº de fax: +55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

Luiz Eduardo Kaercher

Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
A	Fumihiro Ito, Tomoko Nakamura, Satoko Yorita, Hiroshi Danjo, Kentaro Yamaguchi, Ionic probe attachment ionization mass spectrometry, Tetrahedron Letters 50 (2009) 6252–6255. -----	1 a 39
A	Fumihiro Ito, Shin Ando, Masato Iuchi, Tomoko Nakamura, Satoko Yorita and Kentaro Yamaguchi, N-Labeled ionic probes for bioanalytical mass spectrometry, Org. Biomol. Chem., 2010, 8, 4408–4413. -----	1 a 39

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2015/000118

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
US 2012077792 A1	2012-03-29	US 8691851 B2	2014-04-08
		SG 175012 A1	2011-11-28
		WO 2010114493 A1	2010-10-07
-----	-----	-----	-----
US 2009281290 A1	2009-11-12	US 8889839 B2	2014-11-18
-----	-----	-----	-----