

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 793**

51 Int. Cl.:

**C07B 59/00** (2006.01)

**C07D 241/44** (2006.01)

**C07D 403/12** (2006.01)

**C07F 7/22** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2013** **PCT/IB2013/053106**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013** **WO2013160808**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013** **E 13725814 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016** **EP 2841402**

54 Título: **Derivados de quinoxalina marcados como productos radiofarmacéuticos multimodales y sus precursores**

30 Prioridad:

**24.04.2012 EP 12165413**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.06.2017**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
LABORATOIRES CYCLOPHARMA (33.3%) y  
UNIVERSITE D'AUVERGNE CLERMONT I (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CHEZAL, JEAN-MICHEL;  
RBAH-VIDAL, LATIFA;  
BILLAUD, EMILIE;  
AUZELOUX, PHILIPPE;  
MADELMONT, JEAN-CLAUDE;  
VIDAL, AURÉLIEN;  
MIOT-NOIRAUT, ELISABETH;  
PAPON, JANINE y  
MAISONIAL, AURÉLIE**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 616 793 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

Derivados de quinoxalina marcados como productos radiofarmacéuticos multimodales y sus precursores

**[0001]** La presente invención se refiere a nuevos análogos aromáticos y heteroaromáticos de halobenzamidas, y en particular derivados de quinoxalina, que una vez marcados con isótopos radiactivos adecuados son útiles como productos radiofarmacéuticos para el diagnóstico mediante tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT) o tomografía por emisión de positrones (PET) o para la terapia con radionucleidos dirigida de melanoma. La presente invención se refiere también a su procedimiento de síntesis y también a su correspondiente utilización y procedimientos en la formación de imágenes y radioterapia.

**[0002]** El melanoma es uno de los tumores de piel más peligrosos con una incidencia cada vez mayor. Éste es un cáncer altamente invasivo, el desarrollo del cual es rápidamente fatal en la fase metastásica. La supervivencia a los 5 años no excede el 14%, excepto en el caso en el que el grosor del tumor es inferior a 0,76 mm. En el caso en el que la lesión es superior a este grosor, este tumor produce metástasis de manera impredecible y silenciosa. Esta es la razón por la que existe actualmente una investigación en marcha para un procedimiento de investigación que hace posible la evaluación temprana tanto de la extensión local como de la extensión distante del tumor. Además, durante la última década, se han experimentado una serie de productos radiofarmacéuticos seleccionados por su potencial afinidad a melanina, pero pocos han tenido un desarrollo clínico satisfactorio.

**[0003]** La detección temprana es crucial para el pronóstico. El único procedimiento actualmente valioso para la estadificación del melanoma primario sigue siendo la biopsia del ganglio linfático centinela, que es mucho más sensible. La utilidad diagnóstica y clínica de la formación de imágenes por PET/CT con [<sup>18</sup>F]FDG es mejor para los pacientes con estadios más avanzados de la enfermedad.

**[0004]** Varios sistemas de reconocimiento bioquímico que incorporan una gran cantidad de radionucleidos para el diagnóstico también se han evaluado para la detección precoz en la formación de imágenes por SPECT o PET de metástasis de melanoma, como ejemplo colorante de azul de metileno con [<sup>123</sup>I], análogos de α-MSH marcados radioactivamente con flúor-18, tecnecio-99m, indio-111, itrio-86 o cobre-64, radioligandos σ1, tales como [<sup>18</sup>F]-1-(3-fluoropropil)-4-(4-cianofenoximetil)piperidina, análogos de timidina o DOPA y varios yodobenzamidas marcadas radioactivamente.

**[0005]** Si el melanoma se diagnostica temprano (estadio I o II), el tratamiento más eficaz sigue siendo la cirugía. Las lesiones localizadas malignas, en el que el grosor del tumor es <1,5 mm, pueden curarse mediante resección total. En este caso, las tasas de éxito se acercan a una supervivencia del 90% a los 5 años. Por desgracia, para los tumores descubiertos cuando la lesión de la piel ya es gruesa o ulcerada, como en caso de un aumento del riesgo de enfermedad metastásica (estadio III o IV), el pronóstico es muy malo. De hecho, la tasa de supervivencia media es de alrededor de 6 meses y las tasas de éxito sólo alcanzan el 5% de supervivencia a los 5 años, debido a la falta de terapias eficaces para el melanoma maligno metastásico. Para las terapias adyuvantes postoperatorias, se describieron resultados beneficiosos sólo para interferón-α, que es el más comúnmente utilizado para disminuir el riesgo de recurrencia. Sin embargo, las dosis altas administradas normalmente causan una toxicidad sustancial. La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos ha aprobado sólo tres agentes para el tratamiento del melanoma en estadio IV: dacarbazina, la interleucina-2 y el ipilimumab. Dacarbazina es un agente alquilante a menudo utilizado para la quimioterapia. La tasa de respuesta global con este tratamiento único es de alrededor de 22% y la duración mediana de respuesta es de 4 a 6 meses. También se ha desarrollado el análogo oral de la dacarbazina, la temozolomida. La tasa de respuesta con este agente alquilante citotóxico es comparable con la obtenida anteriormente. La interleucina-2 es una hormona recombinante del sistema inmunológico descrito originalmente como un factor de crecimiento que deriva de células T. La tasa de respuesta obtenida con esta terapia sigue siendo baja (16%) y el tratamiento se asocia a menudo con efectos tóxicos significativos debido a las altas dosis administradas. Más recientemente, un anticuerpo completamente humano (ipilimumab) que se une a CTLA-4, utilizado solo o en combinación con vacunas, IL2 o quimioterapia, demostró intervalos de tasa de respuesta global similares del 13 al 22%. Sin embargo, ninguno de estos fármacos ha demostrado prolongar significativamente la supervivencia de los pacientes en estadio IV. Además, la radioterapia de haces externos no se puede considerar como una alternativa, ya que el melanoma se describe como radioresistente. Varios ensayos clínicos están en curso con el fin de encontrar nuevos tratamientos eficaces para el melanoma metastásico, en los campos de la quimioterapia, la radioterapia o inmunoterapia, y las terapias combinadas (como bioquimioterapia por ejemplo). En este momento, no se ha demostrado ningún beneficio real en términos de supervivencia global.

**[0006]** Se debe explicar que los productos radiofarmacéuticos comprenden dos componentes funcionales, uno de ellos radiactivo y el otro no radiactivo. El componente radiactivo hace posible la detección del producto en el contexto del diagnóstico y constituye el agente activo en el caso de uso terapéutico. Es un radionucleido con propiedades físicas apropiadas. El componente no radiactivo, por su parte, es una molécula o trazador, opcionalmente biológico, destinado a acumularse en el órgano diana, en el contexto de la presente invención, en el melanoma, y asegurar la absorción de radiactividad por este último. Este componente no radiactivo es determinante para el comportamiento biológico del producto radiofarmacéutico en el cuerpo, en particular con respecto a la especificidad y el perfil farmacocinético.

[0007] El documento EP 458 886 describe compuestos de uso en el diagnóstico y tratamiento del melanoma maligno. De estas moléculas, la *N*-(2-dietilaminoetil)-4-yodobenzamida (BZA) forma en particular el objeto de estudios más detallados, así como la *N*-(2-dietilaminoetil)-2-yodobenzamida (BZA2), en la aplicación de imágenes médicas y más particularmente para la detección escintigráfica de melanoma ocular primario y metástasis de melanomas cutáneos y oculares. BZA2, marcado radioactivamente con yodo-123, es objeto de un ensayo clínico para la obtención de imágenes de metástasis de melanoma por SPECT.

[0008] El documento de US 5.911.970 describe, por su parte, entre otras cosas, otros compuestos derivados de benzamida que presentan una alta especificidad y afinidad para los receptores sigma de la superficie celular de células cancerosas.

[0009] El documento WO 2005/089815 describe algunos derivados de benzamida radiohalogenados y su uso potencial para el diagnóstico de tumores y la terapia de tumores de melanoma.

[0010] El documento WO2009/095872 da a conocer análogos aromáticos y heteroaromáticos de halobenzamidas en la misma solicitud.

[0011] Por tanto, existe, por un lado, la necesidad de disponer de un trazador específico que posibilite, desde el momento del diagnóstico, llevar a cabo una evaluación de la extensión de la enfermedad y, a continuación, posteriormente, el seguimiento y estudios de dosimetría. Dicho trazador debe posibilitar ventajosamente el diagnóstico diferencial de melanoma ocular, lesión primaria, que a menudo es difícil de identificar.

[0012] Por otra parte, tal como se expone anteriormente, los tratamientos permanecen inoperantes con respecto al melanoma diseminado y es esencial el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas específicas para el tratamiento de melanoma.

[0013] Existe, además, una necesidad de encontrar nuevas moléculas, que dependiendo del radioisótopo que se introduce en las mismas, son capaces de formar un radiotrazador utilizable para el diagnóstico utilizando la formación de imágenes por PET o SPECT y capaces de formar un agente para la terapia con radionucleidos dirigidos.

[0014] Existe, por último, la necesidad de radiotrazadores multimodales que amplíen el ámbito de las técnicas de formación de imágenes en el campo del diagnóstico del melanoma, y más particularmente, la necesidad de nuevos trazadores que encuentren potencial aplicación en la formación de imágenes por PET con flúor-18.

[0015] En la actualidad, el flúor-18, más allá de sus características físicas y nucleares adecuadas, aparece como el radioisótopo emisor de positrones más atractivo para la química de productos radiofarmacéuticos y la formación de imágenes con PET, parte de este interés creciente continuo es probablemente debido a la utilización con éxito en oncología clínica de [<sup>18</sup>F]FDG, el producto radiofarmacéutico para PET más ampliamente utilizado. Brevemente, el flúor-18 muestra propiedades de desintegración y emisión simples con una gran abundancia de positrones del 97%. En comparación con los otros radionucleidos emisores de positrones convencionales de corta duración de carbono-11, nitrógeno-13 y oxígeno-15, el flúor-18 tiene una energía relativamente baja de positrones (máximo de 635 keV) y el intervalo linear de positrones más corto en el tejido (2,3 mm), lo que resulta en la más alta resolución en imágenes con PET. Su vida media (109,8 min) es lo suficientemente larga para dar acceso a los protocolos de formación de imágenes relativamente prolongados en comparación con lo que es posible con carbono-11, por lo tanto, facilitando los estudios cinéticos y análisis de metabolitos en plasma de alta calidad. Además, desde un punto de vista químico, el flúor-18 permite estrategias sintéticas de múltiples etapas que se pueden extender durante horas. Finalmente, el flúor-18 se puede producir de forma fiable y de manera rutinaria a nivel multi-Curie utilizando la reacción nuclear (p, n) bien caracterizada en un agua diana enriquecida en oxígeno-18 en ciclotrones biomédicos ampliamente implementados de un haz de protones de energía relativamente baja (por ejemplo, 18 MeV).

[0016] En conclusión, el uso de un trazador específico, marcado radioactivamente por flúor 18, en la formación de imágenes por PET podría conducir a un aumento de la sensibilidad de esta técnica, en comparación con [<sup>18</sup>F]FDG, especialmente para el diagnóstico del melanoma de la etapa I (ocular) o II y el diagnóstico diferencial con otros tumores. El uso de la formación de imágenes por PET es complementario a la formación de imágenes por SPECT, e incluso en algunos contextos, la formación de imágenes por PET, y más particularmente, la formación de imágenes por PET con flúor 18, en comparación con SPECT, permite mejores rendimientos en términos de calidad de imagen o cuantificación de la captación, en particular, para la dosimetría.

[0017] De este modo, el objeto de la presente invención es el reconocimiento de lesiones de melanoma mediante el desarrollo de moléculas que, administradas al cuerpo, harán posible vectorizar un radioisótopo. Por tanto, la presente invención se refiere a dos campos de aplicación, en particular, la formación de imágenes y terapia con radionucleidos dirigidos, dependiendo de la naturaleza del marcaje.

[0018] Además, los compuestos según la presente invención son ventajosos tanto para su uso en la formación de

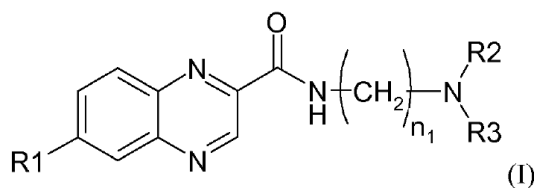
imágenes, es decir, para el diagnóstico de melanoma maligno, como en la terapia con radionucleidos dirigidos, reconociendo más particularmente lesiones secundarias y lesiones oculares primarias. Una de las principales ventajas de los compuestos según la presente invención reside precisamente en su potencialidad mixta o propiedad de bimodalidad. En otras palabras, según las variaciones químicas en cuestión, sus respectivos comportamientos en el cuerpo los destina más particularmente para su uso en formación de imágenes médicas, para su uso en la terapia con radionucleidos dirigidos u otros, y estos compuestos pueden demostrar ser particularmente atractivos cuando son capaces para utilizarse tanto en la formación de imágenes médicas como en la terapia con radionucleidos. Dichas moléculas dotadas de dicho potencialidad bimodal son de particular interés.

**[0019]** Con este fin, los compuestos de la presente invención comprenden todos al menos un átomo de flúor, de manera que estén más particularmente dirigidos a una aplicación en la formación de imágenes por PET cuando dicho al menos un átomo de flúor está marcado en flúor-18, pero también comprenden otro radionucleido y/o halógeno que les permite alcanzar otra potencialidad de formación de imágenes de melanoma (por ejemplo SPECT) y/o una propiedad terapéutica contra el melanoma.

**[0020]** Por último, algunos de los compuestos correspondientes a la fórmula general de los compuestos según la presente invención, cuando están sin marcar, pueden también mostrar una actividad antitumoral intrínseca. Por lo tanto, en este caso específico, se puede decir que el componente no radiactivo definido anteriormente puede jugar, además de su papel del reconocimiento de las lesiones de melanoma y/o de la promoción de la absorción de la radiactividad, un papel de agente citotóxico *per se*. Sin embargo, incluso si algunos compuestos de la presente invención pueden mostrar una potencialidad de quimioterapia, es claramente la actividad a través de marcaje por un isótopo radiactivo a lo que se dirige la presente invención.

**[0021]** Además, algunos de los compuestos abarcados dentro del alcance de la fórmula (I) son precursores de los compuestos marcados radioactivamente.

**[0022]** Según un primer aspecto, un objeto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



en la que

R1 representa Sn(R)3, B(OH)2, B(OR)2, un átomo de halógeno, NO2, un radionucleido o un grupo -N+(R)3, en el que R es un grupo alquilo (C1-C6),

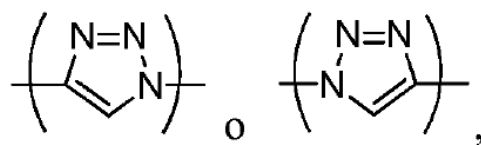
n1 es un número entero que varía de 1 a 4,

R2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C6),

R3 representa:

- un grupo -(CH2CH2O)n2-(CH2)n3-X, en el que n2 es un número entero que varía de 1 a 12 y n3 es un número entero que varía de 1 a 4, o

- un grupo -(CH2CH2O)n4-(CH2)n5-Y, representando n4 un número entero que varía de 0 a 12, representando n5 un número entero de 1 a 4, y representando Y un grupo -C=C-H, -N3 o un grupo -Ar-(CH2)n6-(OCH2CH2)n7-X, siendo Ar



representando n6 un número entero que varía de 1 a 4 y n7 un número entero que varía de 0 a 12, y X representa un átomo de halógeno, un radionucleido o un grupo -OSO2R', en el que R' es un grupo CF3, CH, *t*-Bu, Ph, *p*-NO2-Ph, *p*-BrPh o *p*-CH3Ph, y sus sales de adición con ácidos farmacéuticamente aceptables.

**[0023]** Los siguientes grupos: un halógeno, con la exclusión de flúor, o un grupo -OSO2R', en el que R' es un grupo CF3, CH3, *t*-Bu, Ph, *p*-NO2Ph, *p*-BrPh o *p*-CH3Ph, son grupos precursores de un átomo de flúor opcionalmente marcado.

**[0024]** Los siguientes grupos: un halógeno, Sn(R)3, B(OH)2, B(OR)2, en el que R es un grupo alquilo (C1-C6), son un grupo precursor de un átomo de yodo opcionalmente marcado.

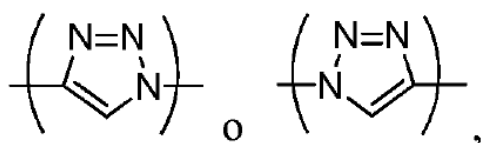
[0025] Según una realización particular, la presente invención está dirigida a un compuesto de fórmula (I) tal como se define anteriormente, en el que R2 es un grupo etilo.

[0026] Según otra realización particular, la presente invención está dirigida a un compuesto de fórmula (1), tal como se define anteriormente, en el que n1 es 2.

[0027] Según otra realización particular, la presente invención está dirigida a un compuesto de fórmula (I), tal como se define anteriormente, en el que R1 es un átomo de yodo, un radionucleido, o Sn(R)3, en el que R es un grupo alquilo (C1-C6), y más particularmente R1 es un átomo de yodo.

[0028] Según otra realización particular, la presente invención está dirigida a un compuesto de fórmula (I), tal como se define anteriormente, en el que R3 representa:

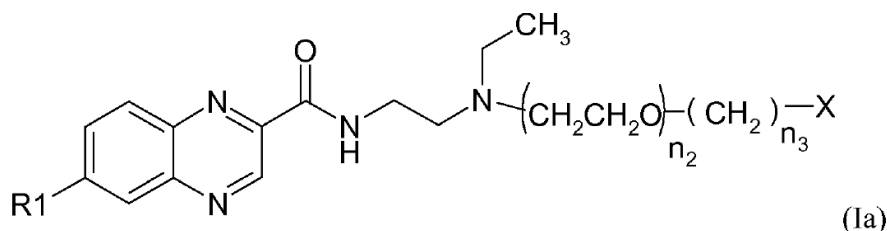
- un grupo  $-(CH_2CH_2O)_{n_2}-(CH_2)_2-X$ , en el que n2 es un número entero que varía de 3 a 7,
- un grupo  $-CH_2-Y$ , representando Y un grupo  $-C=C-H$ ,  $-N_3$  o  $-Ar-(CH_2)_{n_6}-X$ , siendo Ar



n6 representa un número entero que varía de 1 a 4, y

X es un átomo de halógeno, un radionucleido o un grupo  $-OSO_2R'$ , en el que R' es un grupo  $CF_3$ ,  $CH_3$ , *t*-Bu, Ph, *p*-NO<sub>2</sub>Ph, *p*-BrPh o *p*-CH<sub>3</sub>Ph.

[0029] Según otra realización particular, la presente invención está dirigida a un compuesto de fórmula (Ia)



en la que

R1 representa Sn(R)3, B(OH)2, B(OR)2, halógeno, NO<sub>2</sub>, un radionucleido o un grupo  $-N^+(R)_3$ , en el que R es un grupo alquilo (C1-C6),

n2 es un número entero que varía de 1 a 12,

n3 es un número entero que varía de 1 a 4, y

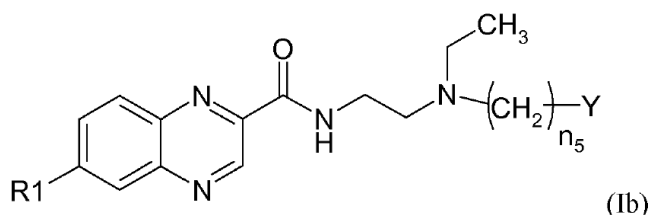
X es un átomo de halógeno, un radionucleido o un grupo  $-OSO_2R'$ , en el que R' es un grupo  $CF_3$ ,  $CH_3$ , *t*-Bu, Ph, *p*-NO<sub>2</sub>Ph, *p*-BrPh o *p*-CH<sub>3</sub>Ph.

y sus sales de adición con ácidos farmacéuticamente aceptables.

[0030] Según dicha realización particular, la presente invención se refiere más particularmente a los compuestos de fórmula (Ia), en la que n2 varía entre 3 y 7 y n3 es 2.

[0031] Según dicha misma realización particular, la presente invención se dirige más particularmente a los compuestos de fórmula (Ia), en los que R1 representa un átomo de yodo, un átomo de yodo opcionalmente marcado o Sn(R)3, en el que R es un grupo alquilo (C1-C6), y más particularmente R1 representa un átomo de yodo, y X representa un átomo de flúor opcionalmente marcado o un grupo  $-OSO_2R'$ , en el que R' es un grupo  $CF_3$ , *t*-Bu o  $CH_3$ , y más particularmente un grupo  $CH_3$ .

[0032] Según otra realización particular, la presente invención está dirigida a un compuesto de fórmula (Ib)

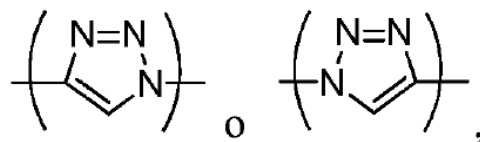


en la que

R1 representa  $\text{Sn}(\text{R})_3$ ,  $\text{B}(\text{OH})_2$ ,  $\text{B}(\text{OR})_2$ , un átomo de halógeno,  $\text{NO}_2$ , un radionucleido o un grupo  $-\text{N}^+(\text{R})_3$ , en el que R es un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ),

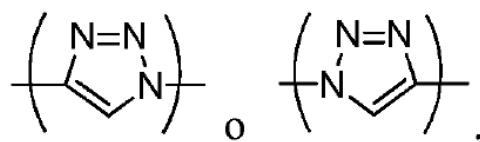
$n_5$  es un número entero que varía de 1 a 4, e

Y representa un grupo  $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$ ,  $-\text{N}_3$  o un grupo  $-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_{n_6}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{n_7}-\text{X}$ , siendo Ar



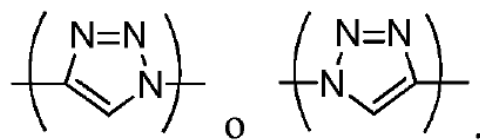
representando  $n_6$  un número entero que varía de 1 a 4 y  $n_7$  un número entero que varía de 0 a 12, y X un halógeno, un radionucleido o un grupo  $-\text{OSO}_2\text{R}'$ , en el que  $\text{R}'$  es un grupo  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $t\text{-Bu}$ , Ph,  $p\text{-NO}_2\text{-Ph}$ ,  $p\text{-BrPh}$  o  $p\text{-CH}_3\text{Ph}$ , y sus sales de adición con ácidos farmacéuticamente aceptables.

[0033] Según dicha realización particular, la presente invención está dirigida más particularmente a los compuestos de fórmula (Ib), en los que  $n_5$  es 1 e Y representa un grupo  $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$ ,  $-\text{N}_3$  o un grupo  $-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_{n_6}-\text{X}$ , siendo Ar



representando  $n_6$  un número entero que varía de 1 a 4 y X un halógeno, un radionucleido o un grupo  $-\text{OSO}_2\text{R}'$ , en el que  $\text{R}'$  es un grupo  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $t\text{-Bu}$ , Ph,  $p\text{-NO}_2\text{-Ph}$ ,  $p\text{-BrPh}$  o  $p\text{-CH}_3\text{Ph}$ .

[0034] Según dicha realización particular, la presente invención está dirigida más particularmente a los compuestos de fórmula (Ib), en los que R1 representa un átomo de yodo, un radionucleido o  $\text{Sn}(\text{R})_3$ , en el que R es un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ), y más particularmente R1 representa un átomo de yodo, e Y representa un grupo  $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$  o un grupo  $-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_{n_6}-\text{X}$ , siendo Ar



representando  $n_6$  un número entero que varía de 1 a 4 y representando X un átomo de flúor opcionalmente marcado o un grupo  $-\text{OSO}_2\text{R}'$ , en el que  $\text{R}'$  es un grupo  $\text{CF}_3$  o un grupo  $\text{CH}_3$ , y más particularmente un grupo  $\text{CH}_3$ .

[0035] Además las fórmulas (I), (Ia) y (Ib) abarcan los propios radiotrazadores, que son los agentes para formación de imágenes y/o para la terapia con radionucleidos dirigidos de melanoma que típicamente abarcan no sólo un radioisótopo, sino también los precursores correspondientes, más particularmente los compuestos que aún no están marcados, es decir, sus precursores no marcados radioactivamente.

[0036] Según otro aspecto, la invención se dirige a compuestos marcados de fórmula (I), (Ia) o (Ib).

[0037] La siguiente tabla presenta varias combinaciones posibles de significado para R1 y X:

| R1                                                                          | X                        |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| I                                                                           | F                        |
| I                                                                           | $^{18}\text{F}$          |
| $\text{Sn}(\text{R})_3$                                                     | F                        |
| cualquier isótopo de I, tal como $^{131}\text{I}$ e $^{125}\text{I}$        | F                        |
| I                                                                           | $-\text{OSO}_2\text{R}'$ |
| halógeno distinto de I                                                      | F                        |
| $^{76}\text{Br}$ , $^{77}\text{Br}$ , $^{210}\text{At}$ , $^{211}\text{At}$ | F                        |

[0038] Según otro aspecto, un objeto de la invención es un producto elegido entre los compuestos de fórmula (I), (Ia)

o (Ib) y, en particular, un compuesto marcado de fórmula (I), (Ia) o (Ib), tal como se define anteriormente para el diagnóstico y/o el tratamiento de melanoma.

**[0039]** En el contexto de la presente invención, el término:

- "halógeno" se entiende que significa cloro, flúor, bromo, yodo o astatino,
- "alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)" tal como se utiliza aquí se refiere a hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> saturado normal, secundario o terciario. Algunos ejemplos son, pero no se limitan a, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-metil-1-propilo (*i*-Bu), 2-butilo (*s*-Bu), 2-metil-2-propilo (*t*-Bu). En una realización particular, el término también incluye el grupo haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), que es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) que lleva al menos un halógeno,
- "Ph" significa un grupo fenilo.

**[0040]** En el sentido de la presente invención, el término "radionucleido" se entiende que significa un isótopo de origen natural o artificial que muestra propiedades radiactivas. El radionucleido puede ser un radioisótopo elegido entre yodo-123, yodo-124, yodo-125, yodo-131, bromo-75, bromo-76, bromo-77, flúor-18, astato-210 o astato-211.

**[0041]** Según una realización particular, R1 y X pueden, de forma independiente y preferiblemente, no representar simultáneamente un radionucleido seleccionado entre yodo-123, yodo-124, yodo-125, yodo-131, astato-211 y flúor-18.

**[0042]** Además, el término "marcado", tal como se utiliza en el presente documento, significa "marcado radioactivamente" y se dirige más precisamente a un compuesto que comprende al menos un radionucleido, es decir, un nucleido radiactivo.

**[0043]** Según una realización específica, el compuesto de fórmula (I), (Ia) o (Ib) comprende al menos un átomo de yodo y, más particularmente, dicho átomo de yodo está comprendido en el grupo R1.

**[0044]** Las siguientes realizaciones particulares forman parte de la presente invención, que pueden considerarse de forma independiente o que se pueden combinar juntos, estando comprendidas sus sales de adición con ácidos farmacéuticamente aceptables:

- el compuesto de fórmula (I), (Ia) o (Ib), en el que R1 representa un átomo de yodo opcionalmente marcado o Sn(R)<sub>3</sub>, en el que R es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), y más particularmente R1 representa un átomo de yodo opcionalmente marcado,
- el compuesto de fórmula (I), (Ia) o (Ib), en el que n<sub>1</sub> es 2, y
- el compuesto de fórmula (I), (Ia) o (Ib), en el que R2 es un grupo etilo.

**[0045]** Según una realización preferida de la presente invención, el compuesto se elige entre:

- *N*-(12-etil-1-fluoro-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(1)**,
- *N*-(12-etil-1-metanosulfonilo-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(2)**,
- *N*-(12-etil-1-fluoro-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-(tributilestannil)quinoxalina-2-carboxamida **(4)**,
- *N*-(24-etil-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxa-24-azahexacosan-26-il)-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(5)**,
- *N*-(24-etil-1-metanosulfonilo-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxa-24-azahexacosan-26-il)-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(6)**,
- *N*-[2-[(*N*-etil)-[[1-(2,3)triazol-4-il]metil]amino]etil]-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(7)**,
- *N*-[2-[(*N*-etil)-(*N*-prop-2-inil)amino]etil]-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(8)**,
- y sus sales farmacéuticamente aceptables, más en particular sus clorhidratos, o bases.

**[0046]** Los compuestos de fórmulas (I), (Ia) y (Ib) pueden comprender uno o más átomos de carbono asimétricos. De este modo, pueden existir en forma de enantiómeros o de diastereoisómeros. Estos enantiómeros, diastereoisómeros y sus mezclas, incluyendo las mezclas racémicas, forman parte de la invención.

**[0047]** Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas (I), (Ia) y (Ib) incluyen las sales de adición con ácidos farmacéuticamente aceptables, tales como ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, bromhídrico, fosfórico o ácido sulfúrico y orgánicos, tales como ácido acético, trifluoroacético, propiónico, oxálico, succínico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, glutámico, benzoico, toluenosulfónico, metanosulfónico, esteárico y láctico.

**[0048]** Los compuestos de fórmulas (I), (Ia) y (Ib) o sus sales pueden formar solvatos (en particular, hidratos); la invención incluye tales solvatos.

**[0049]** Un aspecto adicional de la invención se refiere a un compuesto marcado radioactivamente de fórmula (I), (Ia) o (Ib), tal como se describen anteriormente, en el que dicho marcaje radiactivo se produce mediante un radionucleido que puede ser un radioisótopo elegido entre yodo-123, yodo-124, yodo-125, yodo-131, bromo-75, bromo-76, bromo-77, flúor-18, astato-210 o astato-211, y en particular se selecciona entre flúor-18, yodo-123, yodo-124, yodo-125 y yodo-131.

**[0050]** Cuando los compuestos según la presente invención de fórmulas (I), (Ia) y (Ib) se utilizan para fines de

formación de imágenes médicas, uno de R1 y X es preferiblemente un radionucleido que posee emisión  $\gamma$  o  $\beta^+$  que puede detectarse según las técnicas de formación de imágenes radiológicas convencionales, por ejemplo formación de imágenes escintigráficas mediante tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT) o tomografía por emisión de positrones (PET)

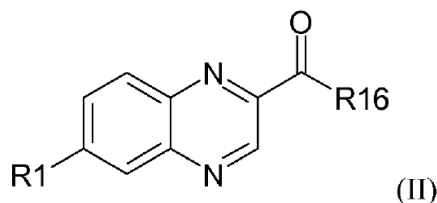
**[0051]** Dicho radionucleido que posee emisión  $\gamma$  o  $\beta^+$  muestra ventajosamente una energía óptima para la medición por medio de una cámara  $\gamma$  o cámara PET. Se pueden citar, en particular, como radionucleidos aceptables para la formación de imágenes médicas, yodo-123, yodo-124, yodo-125, yodo-131, bromo-75, bromo-76, bromo-77 y flúor-18.

**[0052]** El yodo-123 es particularmente adecuado para el diagnóstico escintigráfico con SPECT y flúor-18 o yodo-124 para el diagnóstico escintigráfico con PET.

**[0053]** Cuando se utilizan los compuestos de la invención de las fórmulas (I), (Ia) y (Ib) con fines terapéuticos, R1 es preferiblemente un radionucleido que posee emisión  $\gamma$ ,  $\beta^+$  o electrones Auger. Los radionucleidos adecuados en este contexto, capaces de proporcionar un efecto citotóxico, se pueden elegir entre yodo-131, yodo-125, astato-210 y astato-211.

**[0054]** El yodo-131 es particularmente adecuado para una aplicación en el tratamiento de melanoma en la terapia con radionucleidos dirigidos. Además, el yodo-125, debido a su emisión de electrones Auger, puede utilizarse en radioterapia dirigida a condición de que se internalice en la célula.

**[0055]** Los compuestos según las fórmulas generales (I), (Ia) y (Ib) se pueden preparar mediante condensación de un compuesto según la fórmula general (II)



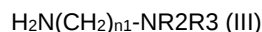
en la que:

R1 es como se ha definido anteriormente,  
R16 es un grupo -OH, un halógeno, un grupo -OR17 o un grupo -OCOR18,  
en el que

R17 es un alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), un grupo arilo o heteroarilo, por ejemplo seleccionado entre benceno, pentafluorobenceno, p-nitrobenceno, triazol, benzotriazol, 7-azabenzotriazol y succinimida y más particularmente es un alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o un grupo p-nitrofenilo,

R18 es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), un arilo o un alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), tal como etoxi por ejemplo,

con una diamina, según la fórmula general (III)



en la que:

n1, R2 son como se han definido anteriormente y R3 es como se ha definido anteriormente y se ha ampliado aún más a los grupos en los que X es un OR", significando R" un grupo protector de alcohol, tal como terc-butildimetilsililo (TBDMS).

**[0056]** La condensación del compuesto (II) con diamina puede realizarse según procedimientos generales descritos por Montalbeti, CAGN (III); Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. Tetrahedron 2005, 61, 10827-10852.

**[0057]** Preferiblemente, la formación del enlace amida entre un éster (II) y una diamina (III) se puede lograr en presencia o no de trimetilaluminio a reflujo de disolventes anhidros, tales como diclorometano, tolueno o cualquier otro disolvente apropiado. Esta condensación también se puede lograr a temperatura ambiente en tetrahidrofurano, en el caso de éster de p-nitrofenilo activado.

**[0058]** Preferiblemente, la formación del enlace amida entre un haluro de acilo (II), en particular un cloruro de acilo (II), y una diamina (III) se puede lograr en cualquier disolvente inerte seco, en presencia o no de una amina terciaria no nucleófila como base para atrapar el HCl formado. Estas reacciones también se pueden acelerar en presencia de piridina, N, N-dimetilaminopiridina o zinc metálico utilizados como catalizador.

[0059] Estos procedimientos de síntesis forman parte de la presente invención.

[0060] Las diaminas, según la fórmula general (III), tal como se define anteriormente, se puede preparar preferiblemente a través de productos intermedios que contienen un grupo protector en la amina primaria.

[0061] El término "grupo protector" para el grupo amino funcional descrito anteriormente se describe en Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons (1991), la totalidad de las enseñanzas de la cual se incorpora en esta solicitud por referencia. La persona experta en la técnica puede seleccionar, usando no más que experimentación de rutina, los grupos protectores adecuados para utilizar en la síntesis descrita, incluyendo grupos protectores distintos de los descritos a continuación, así como las condiciones para la aplicación y eliminación de los grupos protectores.

[0062] Según una realización particular, el grupo protector puede ser un grupo ftalimida o un grupo terc-butoxicarbonilo (Boc). En este caso, las diaminas, según la fórmula general (III), se pueden obtener después de la eliminación del grupo protector y la liberación de la amina primaria, a temperatura ambiente o a reflujo, mediante hidrólisis ácida de los correspondientes compuestos intermedios, que contienen una ftalimida o un grupo Boc o derivados de ftalimida mediante la reacción de los compuestos con una solución acuosa o etanólica de hidrazina.

[0063] Los compuestos de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) en las que R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> es un hidrógeno, se pueden preparar preferiblemente mediante condensación de la amina (III) con un éster (II) en el que R<sub>17</sub> es un grupo *p*-nitrofenilo. Esta reacción se puede llevar a cabo preferiblemente en tetrahidrofurano a temperatura ambiente.

[0064] Los compuestos de fórmula (II), en la que R<sub>16</sub> es un grupo -OH o un grupo -OR<sub>17</sub>, se pueden sintetizar según los procedimientos descritos en WO2009/95872.

[0065] Los compuestos de partida de fórmula (III) están disponibles comercialmente o se describen en la bibliografía, o pueden sintetizarse según procedimientos que se describen en la misma o que son conocidos por el experto en la materia.

[0066] La radioyodación de compuestos, según las fórmulas generales (I), (Ia) y (Ib), mediante yodo-123, yodo-124, yodo-125 o yodo-131, se puede realizar utilizando varios procedimientos diferentes (Dewandjee, M. K. Radioiodination: theory, practice, and biomedical application. Kluwer Academic Publishers, Norwell, USA, 1992). Por ejemplo, puede lograrse mediante un intercambio, en condiciones ácidas, entre la molécula yodada no radiactiva y un haluro alcalino radioactivo. El intercambio se puede llevar a cabo, por ejemplo a una temperatura en un intervalo de 100 a 200°C, utilizando una solución acuosa de compuestos, según las fórmulas generales (I), (Ia) o (Ib) y un haluro radiactivo tal como [<sup>125</sup>I] NaI en medio tamponado o en ácido acético, en presencia o no de catalizadores, tales como, por ejemplo, sulfato de cobre (II). El radiomarcaje puede realizarse también entre un precursor de trialkilestannano de compuestos, según la fórmula general (I), (Ia) o (Ib) y un haluro alcalino, tal como [<sup>125</sup>I]NaI o [<sup>131</sup>I]NaI en presencia de un agente oxidante como la cloramina-T, ácido peracético, peróxido de hidrógeno o en presencia o no de un ácido, tal como ácido clorhídrico, ácido acético o una solución tampón de ácido, preferiblemente a temperatura ambiente y en un disolvente apropiado.

[0067] Las estrategias de radiofluoración y la naturaleza de la fuente de flúor-18 para la fluoración nucleófila con [<sup>18</sup>F].

[0068] El marcaje con flúor-18 del compuesto según las fórmulas generales (I), (Ia), o (Ib) se puede realizar mediante sustituciones nucleófilas con [<sup>18</sup>F]fluoruro, a fin de maximizar las radiactividades específicas. Las sustituciones nucleófilas (alifáticas y aromáticas) con [<sup>18</sup>F]fluoruro se llevará a cabo en general sobre un precursor inmediato de la molécula diana (marcaje directo mediante un proceso de una sola etapa) o sobre un precursor indirecto, seguido de una o más etapas químicas que condicen trazador radiactivo diana.

[0069] No hay restricción particular en la naturaleza de las fuentes de [<sup>18</sup>F]fluoruro para utilizar en esta reacción, y cualquier fuente de [<sup>18</sup>F]fluoruro usado convencionalmente en reacciones de este tipo puede usarse igualmente aquí, siempre que no tenga ningún efecto adverso sobre otras partes de la molécula. Ejemplos de fuentes adecuadas de [<sup>18</sup>F]fluoruros incluyen: [<sup>18</sup>F]fluoruros de metal alcalino, tales como [<sup>18</sup>F]fluoruro de sodio, [<sup>18</sup>F]fluoruro de potasio, [<sup>18</sup>F]fluoruro de cesio; [<sup>18</sup>F]fluoruro de amonio, [<sup>18</sup>F]fluoruros de tetraalkilamonio, tales como [<sup>18</sup>F]fluoruro de tetrabutilamonio. De estos, se prefieren los [<sup>18</sup>F]fluoruros de metal alcalino, y en particular el [<sup>18</sup>F]fluoruro de potasio. La fuente de [<sup>18</sup>F]fluoruros puede activarse mediante la presencia de un ligando capaz de formar complejos con la contraespecie catiónica de la fuente de [<sup>18</sup>F]fluoruros. El ligando puede ser, en particular, un ligando multidentado cíclico o policíclico. Entre los ejemplos de ligandos adecuados se incluyen, en particular, éteres corona, tales como 1,4,7,10,13-pentaoxaciclooctadecano (18C6) o criptandos, tales como 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo [8,8,8]hexacosano comercializado bajo el nombre K222®. Preferiblemente, la fuente de [<sup>18</sup>F]fluoruro es un complejo de criptato-<sup>18</sup>F]fluoruro de metal alcalino, en particular un complejo de criptato-<sup>18</sup>F]fluoruro de potasio, preferiblemente [<sup>18</sup>F]fluoruro de potasio-4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8,8,8]hexacosano ([<sup>18</sup>F]KF/K222®). El complejo [<sup>18</sup>F]KF/K222® se puede preparar mediante cualquiera de los procedimientos convencionales, por ejemplo tal como se describe en Dollé, F.; Dolci, L.; Valette, H.; Hinnen, F.; Vaufrey, F.;

Guenther, I.; Fuseau, C.; Coulon, C.; Bottlaender, M.; Crouzel, C. Synthesis and Nicotinic Acetylcholine Receptor in vivo Binding Properties of 2-Fluoro-3-[2(S)-2-azetidylmethoxy]pyridine: A New Positron Emission Tomography Ligand for Nicotinic Receptors. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 2251-2259.

#### 5 Ejemplo típico 1: [<sup>18</sup>F]fluoración nucleófila en una etapa

**[0070]** La vía más simple propuesta para el marcaje con flúor-18 de derivados de [<sup>18</sup>F]fluoroalquilo (compuestos de fórmula (I), (Ia)) es un proceso radioquímico de una sola etapa, que implica una sustitución directa de un átomo apropiado o grupo (una parte saliente) por [<sup>18</sup>F]flúor.

**[0071]** Los mejores grupos salientes son las bases más débiles, lo que es coherente con el principio de que las especies estables forman mejores grupos salientes. El yoduro es generalmente el mejor grupo saliente de los haluros y el fluoruro el más malo. Los grupos éster sulfónico, tales como el triflato (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), tosilato (p-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), mesilato (CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), brosilato (p-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nosilato (m-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), o terc-butilsulfonato (t-BuSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) son mejores grupos salientes que los haluros, lo que lleva al siguiente orden jerárquico: RSO<sub>3</sub>>I>Br>Cl>F. Naturalmente, el flúor, a pesar de su excelente capacidad como un grupo saliente, rara vez se utiliza en la química de flúor-18 debido a la dilución isotópica obvia, lo que lleva a una baja radiactividad específica.

**[0072]** Las sustituciones nucleófilas alifáticas se llevan a cabo en general bajo condiciones básicas o neutras, con una gran variedad de disolventes posibles. De hecho, los efectos del disolvente en reacciones de tipo SN<sub>2</sub> dependen de la dispersión de la carga en el estado de transición en comparación con la de los reactivos. Sin embargo, en radiofluoraciones con [<sup>18</sup>F]fluoruro la solubilidad de los reactivos parece desempeñar un papel más importante en la elección del disolvente que los efectos del solvente sobre las velocidades de reacción. Los disolventes más comunes son los apróticos polares, tales como acetonitrilo, en el que la sal de [<sup>18</sup>F]fluoruro ([<sup>18</sup>F]KF, [<sup>18</sup>F]CsF, [<sup>18</sup>F]Bu<sub>4</sub>NF o complejo [<sup>18</sup>F]KF/K222®, por ejemplo) y los precursores orgánicos para el marcaje muestran buena solubilidad. A menudo, la reacción se realiza a la temperatura de reflujo del disolvente durante unos minutos.

#### Ejemplo típico 2:

**[0073]** Proceso de dos etapas que implica una [<sup>18</sup>F]fluoración nucleófila seguida de una etapa de (multi)desprotección.

**[0074]** Una vía típica también propuesta a menudo para el marcaje con flúor-18 o derivados de [<sup>18</sup>F]fluoroalquilo (compuestos de fórmulas (I), (Ia) o (Ib)) es un proceso radioquímico de dos etapas, que implica primero una sustitución directa de un átomo o grupo apropiado (una parte saliente) por [<sup>18</sup>F]fluoruro (tal como se ha descrito anteriormente), seguido de una etapa de (multi)desprotección. La etapa de (multi)desprotección se realiza generalmente en condiciones básicas o ácidas y depende de la naturaleza química de los grupos protectores. Puede ser necesario el calentamiento de la mezcla de reacción durante unos minutos.

#### Ejemplo típico 3:

**[0075]** Proceso de dos etapas que implica una [<sup>18</sup>F]fluoración nucleófila seguida de una etapa de acoplamiento.

**[0076]** Una vía robusta y fiable propuesta a menudo para el marcaje con flúor-18 de los compuestos de fórmulas (I), o (Ib) es un proceso radioquímico de dos etapas, que implica primero la preparación de un reactivo [<sup>18</sup>F] apropiado con azido, alquino, halógeno o mejor sulfonilo. La radiosíntesis de azido, alquino, n-bromo-, n-tosilo- y n-mesiloxy-1-[<sup>18</sup>F]fluoroalcanos (n = 1-3) a partir de los correspondientes alcanos bifuncionales mediante sustitución nucleófila alifática con [<sup>18</sup>F]fluoruro añadido no portador como, por ejemplo, su complejo [<sup>18</sup>F]KF/K222® activado. A continuación, el acoplamiento con alquino ((I), (Ib)) es la segunda etapa.

Réf: Ackermann et al, *J. Label Comp. Radiopharm* 2011, 54, 260-266, Glaser et al, *Bioconjugate Chem*, 2007, 18, 989-993, Smith et al, *J. Med. Chem.* 2008, 51, 8057-8067.

#### Ejemplo típico 4:

**[0077]** [<sup>18</sup>F]fluoración nucleófila de una etapa en la serie aromática, es decir, en el caso en el que el precursor está ligado a un anillo aromático, por ejemplo R1 es NO<sub>2</sub> o un átomo de halógeno.

**[0078]** La vía más simple propuesta para el marcaje con flúor-18 de los derivados de [<sup>18</sup>F]fluoroarilo es un proceso radioquímico de una sola etapa, que implica una sustitución directa de un átomo o grupo apropiado (una parte saliente) por [<sup>18</sup>F]fluoruro.

**[0079]** Los grupos salientes incluyen los halógenos y en particular el grupo nitro (con el siguiente orden aceptado de disminución de la capacidad como grupo saliente: F> NO<sub>2</sub>> Cl> Br e I). Sin embargo, esto depende en gran medida de la naturaleza del nucleófilo y del [<sup>18</sup>F]fluoruro, el grupo de trimetilamonio es a menudo una mejor alternativa, cuando está disponible. De hecho, las sales de ariltrimetilamonio, que son relativamente estables y fáciles de manipular, tienden a ser más reactivas que los compuestos con un grupo saliente neutro y por lo general requieren

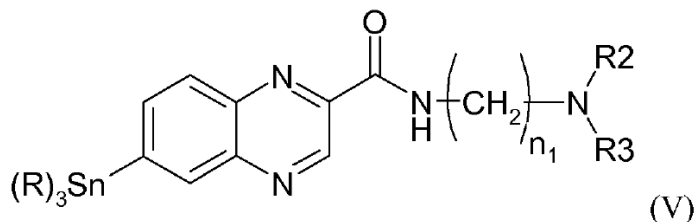
condiciones más suaves y producen mayores rendimientos radioquímicos en la sustitución con  $[^{18}\text{F}]$ fluoruro. También son particularmente convenientes debido a su separación superior del producto de reacción, el  $[^{18}\text{F}]$ fluoruro de arilo neutro, usando HPLC o un cartucho de SPE, debido a las grandes diferencias en las propiedades físico-químicas. La posible reacción secundaria que consiste en la fluorodesmetilación en el grupo trimetilamonio, que conduce a  $[^{18}\text{F}]$ fluorometano volátil, es un factor limitante en el uso de este grupo saliente. Una vez más, el flúor, a pesar de su excelente capacidad como grupo saliente, rara vez se utiliza en la química de flúor-18 debido a la dilución isotópica obvia, lo que lleva a una baja radiactividad específica.

**[0080]** Las radiofluoraciones nucleófilas aromáticas se realizan normalmente en disolventes polares apróticos, tales como DMSO, sulfolano o dimetilacetamida, y a menudo en condiciones básicas (debido, por ejemplo, a la presencia de Kryptofix-222®/carbonato de potasio). La finalización de la incorporación de  $[^{18}\text{F}]$ fluoruro a menudo requiere temperaturas de moderadas a altas (100°C-170°C) durante diez a treinta minutos. La tecnología de microondas puede ser una aplicación exitosa aquí dando lugar a mejores rendimientos y tiempos de reacción más cortos.

**[0081]** La presente invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto marcado radioactivamente con  $[^{18}\text{F}]$  según las fórmulas generales (I), (Ia) o (Ib) que comprende al menos las etapas de i) hacer reaccionar un precursor dedicado para el marcaje con una fuente de  $[^{18}\text{F}]$ fluoruro en un disolvente apropiado y, opcionalmente, ii) recuperar el compuesto marcado radioactivamente con  $[^{18}\text{F}]$  obtenido según las fórmulas generales (I), (Ia) o (Ib).

**[0082]** El procedimiento para preparar los compuestos marcados radioactivamente con  $[^{18}\text{F}]$  de fórmulas generales (I), (Ia) o (Ib) puede tener lugar en un amplio intervalo de temperaturas, y temperaturas de reacción precisas no son críticas para la invención. En general, es conveniente llevar a cabo las reacciones a una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente 150°C. El tiempo requerido para la reacción también puede variar ampliamente, dependiendo de muchos factores, en particular las temperaturas de reacción y la naturaleza de los reactivos. Sin embargo, siempre que las reacciones se efectúen en las condiciones preferidas descritas anteriormente, normalmente será suficiente un periodo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 15 minutos. El compuesto marcado radioactivamente con  $[^{18}\text{F}]$  de fórmula general (I), (Ia) o (Ib) preparado de este modo puede recuperarse de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden recuperarse mediante filtración sobre una columna de separación prerellena. Además, el producto, si se desea, puede purificarse adicionalmente mediante diversas técnicas bien conocidas, tales como técnicas de cromatografía, en particular cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

**[0083]** Los compuestos precursores trialquilestannano de los compuestos de fórmulas (I), (Ia) y (Ib) también forman parte de la presente invención. Se refieren como compuestos de fórmula (V):



en la que  $n_1$ , R, R2 y R3 tienen el mismo significado que anteriormente.

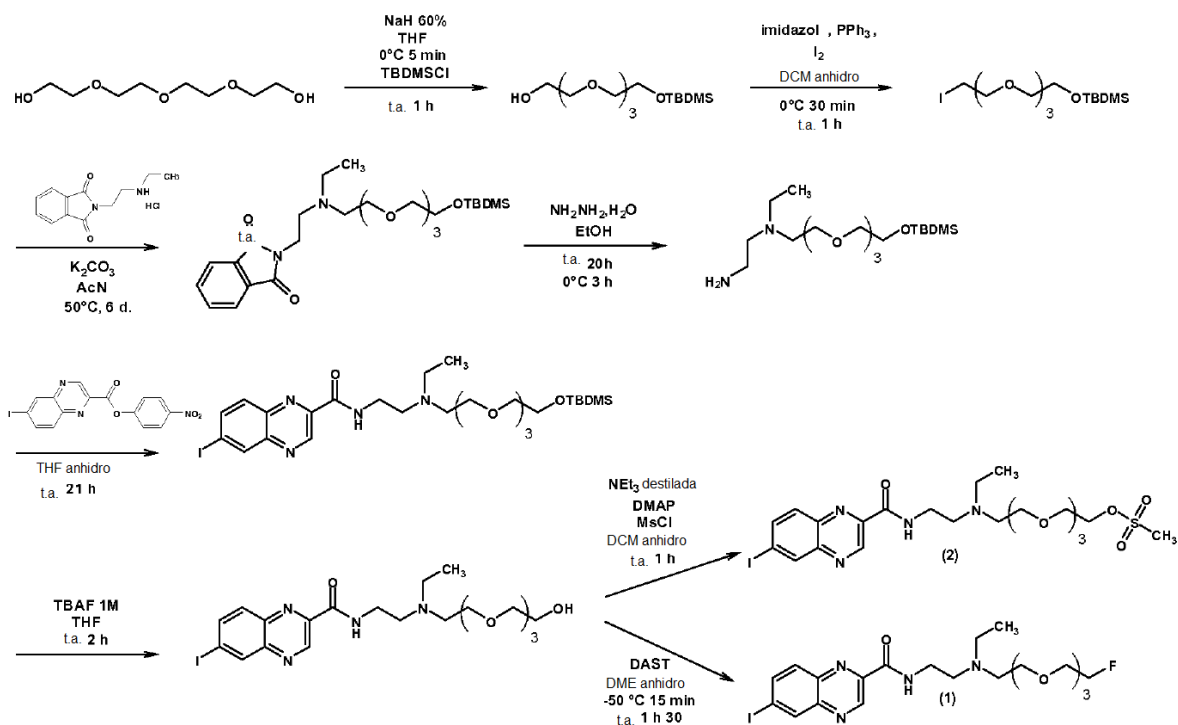
**[0084]** Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

**[0085]** Todos los reactivos y disolventes se adquirieron en los siguientes proveedores comerciales: Sigma Aldrich, Acros Organics, Carlo Erba y SDS. Todos los disolventes se secaron usando técnicas comunes. A menos que se indique lo contrario, las reacciones sensibles a la humedad se llevaron a cabo en atmósfera de argón seco. La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó sobre placas 60 F254 de gel de sílice o placas 60 F254 de óxido de aluminio neutro (Merck o SDS) y se visualizó con luz UV y/o se reveló con yodo, ninhidrina o permanganato de potasio. La cromatografía flash (FC) se realizó en fase normal 60A de gel de sílice, óxido de aluminio 90 estandarizado de 35-70  $\mu\text{m}$  (Merck o SDS) o de óxido de aluminio neutro, 63-200  $\mu\text{m}$  (Merck, análisis de adsorción de columna cromatográfica según Brockmann). Los puntos de fusión no corregidos (pf) se registraron en un aparato electrotérmico IA9300 (capilar) o un aparato de Reichert-Jung-Köffler. Los espectros de RMN (400 o 200 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 o 50 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) se registraron en un instrumento Bruker Avance400 o 200; los espectros de RMN  $^{19}\text{F}$  (470 MHz) se registraron en un aparato Bruker DRX 500 utilizando tetrafluorotolueno como referencia interna (-63 ppm).  $\delta$  se expresaron en ppm. Los espectros infrarrojos (IR) se registraron en un FTIR Nicolet Impact 410, un FT Vector 22 o un Nicolet IS10 con el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros de masas en el modo de impacto de electrones se obtuvieron en un instrumento 5989A (Agilent Technologies) o un cromatógrafo de HP5890 serie II acoplado al espectrómetro de masas HP5985B. El análisis de las muestras se realizó en  $\text{CH}_3\text{CN}$  a una concentración final de 1 pmol/ $\mu\text{l}$ . Los espectros de masas de ionización con electroespray (ESI-MS) se registraron en espectrómetros TSQ 7000 Thermoquest Finnigan (Les Ulis, Francia) o Esquire-LC (Bruker Daltonics,

Wissenbourg, Francia) espectrómetros. El análisis de las muestras se realizó en CH<sub>3</sub>CN a una concentración final de 1 pmol/μl, CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v, que contiene HCOOH al 1%) o CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v, que contiene HCOOH al 1%) en modo positivo y CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v, que contiene NH<sub>4</sub>OH al 1%) en el modo negativo, a una concentración final de 8 a 12 pmol/μl. Cada espectro ESI-MS se registró mediante un promedio de 10 espectros. Los microanálisis se realizaron por el Laboratorio Analítico del CNRS (Vernaison, Francia) para los elementos indicados.

**EJEMPLO 1:** Síntesis de *N*-(12-etil-1-metanosulfonilo-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (2) (Precursor de [<sup>18</sup>F]1) y *N*-(12-etil-1-fluoro-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (1).

[0086]



**Etap 1: Síntesis de 2,2,3,3-tetrametil-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-ol.** Se agitó una solución de hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 2,94 g, 73,5 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (135 ml) a temperatura ambiente durante 5 min bajo argón. Se añadió gota a gota tetraetilenglicol seco (8,80 ml, 51,0 mmol) a 0°C y la mezcla de reacción se agitó durante 5 min antes de la adición de cloruro de terc-butildimetilsililo (12,00 g, 79,6 mmol). Después de volver a temperatura ambiente, la mezcla resultante se agitó durante 1 h y la reacción se inactivó mediante la adición de agua (150 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3x100 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron sucesivamente con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (150 ml) y solución acuosa saturada de cloruro sódico (150 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía (SiO<sub>2</sub> pad, EtOAc/pentano, 75/25, v/v a continuación, 50/50, v/v y, finalmente, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 98/2, v/v) para producir el compuesto esperado (6,42 g, 20,8 mmol) como un aceite amarillo. Rendimiento 41%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/pentano, 75/25, v/v) 0,16. IR (ATR accesorio de diamante) ν 778, 837, 1109, 1255, 1472, 2859, 2930, 3300-3600 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0,05 (s, 6H), 0,88 (s, 9H), 2,63 (s ancho, 1H), 3,65 (m, 16H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) -5,2 (2C), 26,0 (3C), 61,8, 62,8, 70,4-70,7 (4C), 72,6, 72,7. MS m/z 309 (1, [M+H]<sup>+</sup>), 163 (26), 147 (22), 133 (23), 119 (46), 103 (55), 89 (100), 87 (9), 75 (93), 73 (61), 59 (29).

**Etap 2: Síntesis de 15-yodo-2,2,3,3-tetrametil-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecano.** A una solución agitada de alcohol obtenida en la etapa anterior (5,00 g, 16,2 mmol) en diclorometano anhidro (150 ml) se le añadieron sucesivamente imidazol (1,44 g, 21,1 mmol), trifenilfosfina (5,53 g, 21,1 mmol) y yodo (5,35 g, 21,1 mmol) a 0°C en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos, a continuación a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió una solución de bisulfito de sodio acuoso al 10% (170 ml) y la mezcla se agitó enérgicamente durante 2 minutos. Después de la decantación, se recogió la capa orgánica y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (3x80 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El sólido obtenido se suspendió en n-pentano (150 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 45 min antes de la filtración. El precipitado se lavó con n-pentano (30 ml). El filtrado se evaporó al vacío y el residuo

oleoso se purificó por cromatografía (SiO<sub>2</sub> pad, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 98/2, v/v) para producir el compuesto esperado como un aceite amarillo pálido (5,62 g, 13,4 mmol). Rendimiento 83%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 98/2, v/v) 0,25. IR (ATR accesorio de diamante)  $\nu$  778, 837, 1109, 1256, 1472, 2858, 2928 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0,04 (s, 6H), 0,87 (s, 9H), 3,24 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 3,53 (t, 2H, J = 5,4 Hz), 3,64 (m, 8H), 3,73 (m, 4H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -5,2 (2C), 3,0, 18,4, 26,0 (3C), 62,8, 70,3-70,8 (4C), 72,1, 72,7. MS m/z 361 (3), 155 (100).

**Etapla 3: Síntesis de N-(16-etil-2,2,3,3-tetrametil-4,7,10,13-tetraoxa-16-aza-3-silaoctadecan-18-il)ftalimida.** A una solución agitada de N-[2-(etilamino)etil]-1H-ftalimida (3,04 g, 12,0 mmol) (Jones, J. Med. Chem., 1973, 16, 537-542) en acetonitrilo anhidro (80 ml) se añadieron sucesivamente carbonato de potasio (1,65 g, 12,0 mmol) y el compuesto obtenido en la etapa anterior (5,00 g, 12,0 mmol) en atmósfera de argón. La mezcla se calentó a 50°C durante 6 días. De vuelta a la temperatura ambiente, se añadió una solución de carbonato de sodio acuoso saturado (200 ml) y la solución resultante se extrajo con diclorometano (3x150 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo oleoso se purificó por cromatografía (SiO<sub>2</sub>, EtOAc) para proporcionar el compuesto esperado (4,38 g, 8,61 mmol) como un aceite amarillo pálido. Rendimiento 72%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, EtOAc) 0,25. IR (NaCl)  $\nu$  837, 1105, 1254, 1396, 1468, 1592, 1713, 2858, 2900 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0,04 (s, 6H), 0,87 (s, 9H), 0,97 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,61 (q, 2H, 7,1 Hz), 2,74 (m, 4H), 3,57 (m, 12H), 3,76 (m, 4H), 7,70 (m, 2H), 7,80 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -5,2 (2C), 12,0, 18,4, 26,0 (3C), 36,2, 48,4, 51,5, 53,0, 62,8, 69,8, 70,5, 70,6, 70,7, 70,8, 72,7, 123,2 (2C), 132,3 (2C), 133,9 (2C), 168,4 (2C). ESI-MS m/z 509,4 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapla 4: Síntesis de N-16-etil-2,2,3,3-tetrametil-4,7,10,13-tetraoxa-16-aza-3-silaoctadecan-18-amina.** A una solución agitada del compuesto de la etapa precedente (1,50 g, 2,95 mmol) en etanol (150 ml) se añadió monohidrato de hidrazina (1,43 ml, 29,5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h y se enfrió a 0°C durante 3 h. El precipitado blanco se filtró y se lavó con etanol enfriado con hielo (50 ml) y diclorometano (50 ml) y el filtrado se evaporó al vacío. El residuo se suspendió en diclorometano (20 ml) y el precipitado remanente se filtró de nuevo y se lavó con diclorometano (20 ml). Las últimas etapas se repitieron hasta que no apareció más sólido blanco después de la evaporación del filtrado. Se obtuvo el compuesto esperado (1,11 g, 2,95 mmol) como un aceite de color amarillo pálido y se utilizó sin purificación adicional. Rendimiento cuantitativo. R<sub>f</sub> (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 8/2, v/v) 0,32. IR (ATR accesorio de diamante)  $\nu$  834, 1107, 1252, 1472, 1574, 2857, 2929, 3100-3300 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0,05 (s, 6H), 0,88 (s, 9H), 1,01 (t, 3H, 7,1 Hz), 2,68 (m, 8H), 3,55 (m, 12H), 3,72 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -5,2 (2C), 11,9, 26,0 (3C), 39,7, 48,8, 52,7, 56,4, 62,8, 70,5 (5C), 72,7.

**Etapla 5: Síntesis de N-(16-etil-2,2,3,3-tetrametil-4,7,10,13-tetraoxa-16-aza-3-silaoctadecan-18-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida.** A una suspensión agitada de éster de 6-yodoquinoxalin-2-carboxilato de 4-nitrofenilo activado (305 mg, 0,72 mmol) (Denoyer, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2008, 875, 411-418) en tetrahidrofurano anhidro (7 ml) se añadió una solución del compuesto obtenido en la etapa anterior (430 mg, 1,14 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (8 ml) en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 21 h y, a continuación, el disolvente se evaporó al vacío. El residuo obtenido se disolvió en diclorometano (15 ml) y se añadió una solución de hidróxido de sodio acuoso 1 N (45 ml). Después de la decantación, la capa acuosa se extrajo con diclorometano (3x15 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con una solución de carbonato de sodio acuoso al 5% (2x45 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. A continuación, se cromatografió el residuo oleoso (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 9/1, v/v) para proporcionar el compuesto esperado (459 mg, 0,70 mmol) como un aceite amarillo pálido. Rendimiento 96%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 9/1, v/v) 0,30. IR (NaCl)  $\nu$  834, 1108, 1253, 1353, 1387, 1472, 1523, 1592, 1676, 1714, 2857, 2928, 3025, 3300-3400 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0,04 (s, 6H), 0,87 (s, 9H), 1,08 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,78 (m, 6H), 3,60 (m, 16H), 7,82 (d, 1H, 8,8 Hz), 8,07 (dd, 1H, J = 1,8, 8,8 Hz), 8,46 (m, 1H), 8,60 (d, 1H, 1,8 Hz), 9,63 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -5,2 (2C), 12,1, 18,4, 26,0 (3C), 37,4, 48,7, 52,9, 53,0, 62,7, 70,7 (5C), 72,7, 98,0, 130,9, 138,6, 139,7 (2C), 144,2, 144,4, 144,7, 163,0. ESI-MS m/z 661,3 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapla 6: Síntesis de N-(12-etil-1-hidroxi-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida.** A una solución agitada del compuesto obtenido en la etapa anterior (173 mg, 0,26 mmol) en tetrahidrofurano (8 ml) se añadió una solución 1 M de fluoruro de tetrabutilamonio en tetrahidrofurano (393  $\mu$ l, 0,39 mmol). La mezcla se agitó a continuación a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se inactivó mediante la adición de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (80 ml), seguido de agua destilada (40 ml) y, a continuación, acetato de etilo (40 ml). Después de la decantación, la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x40 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con solución acuosa saturada de cloruro sódico (40 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo obtenido se sometió a cromatografía (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5 a 80/20, v/v) para producir el compuesto esperado (132 mg, 0,24 mmol) como un aceite amarillo pálido. Rendimiento 93%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 80/20, v/v) 0,26. IR (NaCl)  $\nu$  1125, 1353, 1473, 1527, 1592, 1671, 2871, 3300-3400 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 1,10 (t, 3H, 7,1 Hz), 2,82 (m, 6H), 3,60 (m, 16H), 7,83 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 8,06 (dd, 1H, J = 1,8, 8,8 Hz), 8,57 (m, 1H), 8,59 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 9,62 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 11,7, 37,3, 48,9, 52,9, 53,1, 61,7, 69,7, 70,3-70,6 (4C), 72,7, 98,0, 130,9, 138,6, 139,7 (2C), 144,2, 144,4, 144,7, 163,2. ESI-MS m/z 547,2 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapla 7: Síntesis de N-(12-etil-1-fluoro-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida**

(1). A una solución del compuesto obtenido en la etapa anterior (100 mg, 183  $\mu$ mol) en dimetoxietano anhidro (800  $\mu$ l) se añadió trifluoruro de (dietilamino)azufre (49  $\mu$ l, 366  $\mu$ mol) a -50°C en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a -50°C durante 15 minutos, a continuación a temperatura ambiente durante 90 min, y se vertió en una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (10 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3X10 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH, 85/15/0,5, v/v/v) para producir el compuesto (1) como un aceite amarillo (68 mg, 120  $\mu$ mol). Rendimiento del 68%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/EtOH, 85/15, v/v) 0,30. IR (ATR accesorio de diamante)  $\nu$  1046, 1107, 1352, 1473, 1523, 1592, 1669, 2868, 2916, 3300-3400 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 1,07 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,65 (q, 2H, 7,1 Hz), 2,77 (m, 4H), 3,61 (m, 12H), 3,69 (m, 2H), 4,53 (td, 2H, <sup>2</sup>J<sub>H-F</sub> = 47,7 Hz, 4,1 Hz), 7,81 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 8,07 (dd, 1H, 1,8, 8,8 Hz), 8,42 (m, 1H), 8,60 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 9,63 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 11,5, 37,1, 48,9, 52,8 (2C), 70,8 (6C), 83,2 (<sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 169 Hz), 98,1, 131,0, 138,6, 139,5, 139,7, 144,1, 144,4, 144,7, 163,3. RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -223,1. ESI-MS m/z 549,2 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapla 8: Síntesis de N-(12-etil-1-metanosulfonilo-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (2).** A una solución del compuesto obtenido en la etapa 6 (80 mg, 0,146 mmol), trietilamina destilada (25  $\mu$ l, 0,176 mmol, 1,2 eq.), y 4-(dimetilamino)piridina (1,8 mg, 14,6  $\mu$ mol) en diclorometano anhidro (2,5 ml) se añadió cloruro de metanosulfonilo (14  $\mu$ l, 0,176 mmol) en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h antes de la adición de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (25 ml). Después de la decantación, la capa acuosa se extrajo con diclorometano (3x25 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> -> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 9/1, v/v) para producir el compuesto (2) (85 mg, 0,136 mmol) como un aceite amarillo. Rendimiento 93%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 9/1, v/v) 0,37. IR (ATR accesorio de diamante)  $\nu$  751, 917, 1106, 1171, 1349, 1473, 1525, 1592, 1668, 2849, 2916, 3300-3400 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 1,12 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,85 (m, 6H), 3,06 (s, 3H), 3,60 (m, 12H), 3,73 (m, 2H), 4,36 (m, 2H), 7,83 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 8,06 (dd, 1H, J = 1,8, 8,8 Hz), 8,53 (m, 1H), 8,60 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 9,62 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 11,7, 37,2, 37,8, 48,9, 52,9, 53,0, 69,1, 69,3, 70,5 (5C), 98,1, 130,9, 138,6, 139,6, 139,8, 144,1, 144,4, 144,7, 163,2. ESI-MS m/z 625,3 [M+H]<sup>+</sup>.

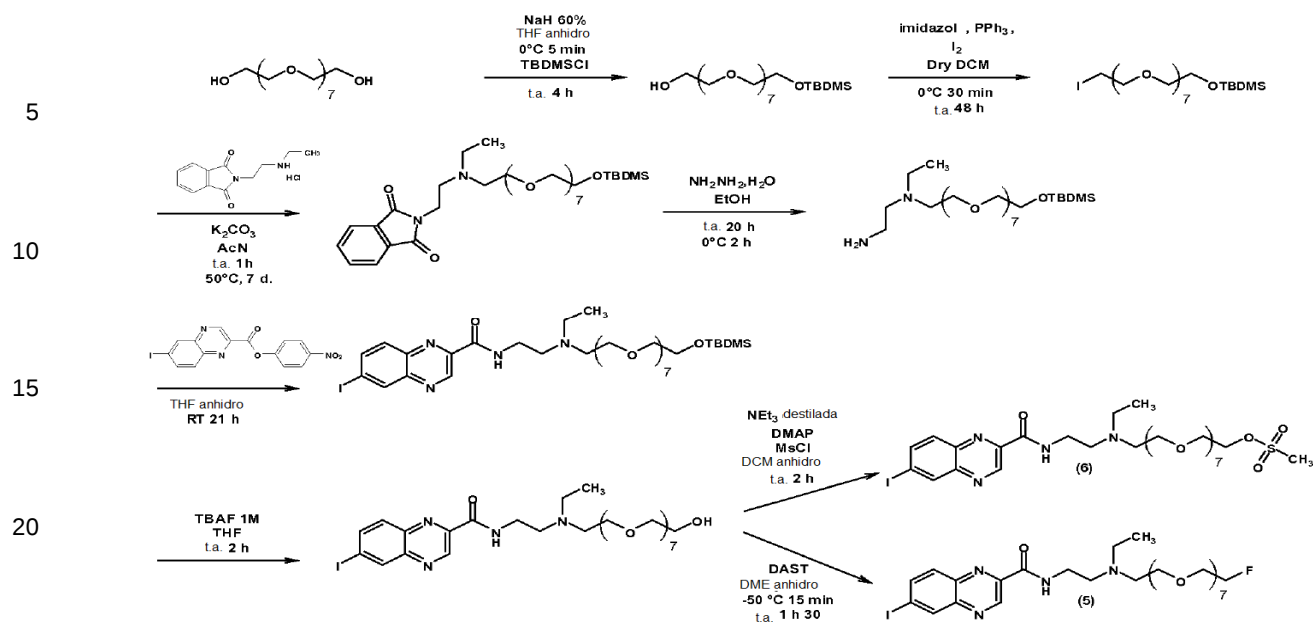
**Etapla 9: Síntesis de sal de diclorhidrato de N-(12-etil-1-fluoro-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (3), sal de diclorhidrato de (1).** Este experimento se realizó en un compartimento de guante, bajo una atmósfera de argón. A una solución del compuesto (1) (10 mg, 18,2  $\mu$ mol) en diclorometano anhidro (1 ml) se le añadió una solución de ácido clorhídrico 2,0 N en éter dietílico anhidro (2 ml) en atmósfera de argón. Después de 5 min, el disolvente se evaporó bajo un flujo de argón. El residuo se suspendió en éter dietílico anhidro (2 ml) y se secó bajo un flujo de argón para producir el compuesto (3), la sal de dihidrocloruro de (1), como un sólido amarillo muy higroscópico. IR (ATR accesorio de diamante)  $\nu$  409, 1048, 1130, 1355, 1475, 1538, 1592, 1674, 2953, 3300-3400 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1,07 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 3,37 (m, 6H), 3,65 (m, 10H), 3,77 (m, 2H), 4,02 (q, 2H, J = 6,2 Hz), 4,54 (td, 2H, <sup>2</sup>J<sub>H-F</sub> = 47,7 Hz, J = 4,2 Hz), 7,96 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 8,08 (dd, 1H, J = 1,9, 8,9 Hz), 8,59 (d, 1H, J = 1,6 Hz), 9,28 (m, 1H), 9,56 (s, 1H); RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -222,76; ESI-MS m/z 549,1 [M+H]<sup>+</sup>; Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>FIN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, 2HCl, 5H<sub>2</sub>O) calculado: C: 35,46; H: 5,95; N: 7,88; encontrado: C: 35,81; H: 6,23; N: 8,04.

**EJEMPLO 2: Síntesis de N-(12-etil-1-fluoro-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-(tributilestannil)quinoxalin-2-carboxamida (4) (Precursor para la radiosíntesis de [<sup>131</sup>I] 1).**

[0087] A una solución del compuesto (1), obtenido en la etapa 7 del Ejemplo 1 (50 mg, 91,2  $\mu$ mol) y hexabutildiestaño (102  $\mu$ l, 0,20 mmol), en tolueno anhidro (2,5 ml) se añadió dicloruro de (trifenilfosfina)paladio (II) (3,2 mg, 4,6  $\mu$ mol) en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a reflujo durante 5,5 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se filtró sobre Celite® 545 y la almohadilla se lavó con acetato de etilo (3x10 ml). El filtrado se evaporó al vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 1/0, v/v -> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 9/1, v/v) para producir el compuesto esperado (20 mg, 28,1  $\mu$ mol) como un aceite amarillo. Rendimiento 31% R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 9/1, v/v) 0,36 IR (NaCl)  $\nu$  1044, 1105, 1260, 1351, 1463, 1524, 1674, 2877, 2925, 3300-3400 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0,88 (t, 9H, J = 7,1 Hz), 1,25 (m, 21H), 2,90 (m, 6H), 3,64 (m, 14H), 4,54 (td, 2H, J = 4,1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H-F</sub> = 47,7), 7,91 (d, 1H, 8,2 Hz), 8,05 (d, 1H, 8,2 Hz), 8,30 (m, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H-117Sn/119Sn</sub> = 41,7 Hz), 8,56 (s, 1H), 9,63 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10,0, 11,4, 13,7, 27,4 (<sup>2</sup>J<sub>C-117Sn/119Sn</sub> = 56 Hz), 29,1 (<sup>3</sup>J<sub>C-117Sn/119Sn</sub> = 21 Hz), 37,0, 49,1, 52,9, 53,1, 70,6-70,9 (6C), 83,2 (<sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 169 Hz), 128,2, 137,8, 138,1, 140,5, 143,0, 143,4, 143,7, 149,1, 163,8. ESI-MS m/z 713,40 [M+H]<sup>+</sup>.

**EJEMPLO 3: Síntesis de N-(24-etil-1-metanosulfonilo-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxa-24-azaheptacosan-26-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (6) (Precursor de [<sup>18</sup>F] 5) y N-(24-etil-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxa-24-azaheptacosan-26-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (5).**

[0088]



**Etap 1: Síntesis de 2,2,3,3-tetrametil-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-3-silaheptacosan-27-ol.** Este compuesto se sintetizó según el procedimiento descrito en la etapa 1 del ejemplo 1, a partir de octaetilenglicol (6,01 g, 16,2 mmol), hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 0,91 g, 22,7 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (3,67 g, 24,3 mmol). Tiempo de reacción: 4 h a temperatura ambiente; la purificación se realizó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/EtOH, 95/5, v/v a continuación, 8/2, v/v) para producir el compuesto esperado (5,32 g, 11,0 mmol) como un aceite amarillo. Rendimiento del 68%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/EtOH, 95/5, v/v) 0,21. IR (NaCl)  $\nu$  778, 836, 1106, 1254, 2873, 2927, 3100-3600 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0,00 (s, 6H), 0,83 (s, 9H), 3,58 (m, 32H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -5,2 (2C), 18,4, 26,0 (3C), 61,7, 62,7, 70,4-70,6 (12C), 72,6, 72,7. MS m/z 281 (13), 251 (13), 207 (53), 189 (12), 177 (9), 163 (34), 159 (27), 147 (38), 145 (15), 133 (45), 119 (49), 117 (13), 115 (27), 103 (49), 101 (21), 89 (100), 87 (22), 75 (46), 73 (80), 71 (16), 59 (35).

**Etap 2: Síntesis de 27-yodo-2,2,3,3-tetrametil-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-3-silaheptacosano.** Este compuesto se sintetizó según el procedimiento descrito en la etapa 2 del ejemplo 1, a partir del compuesto de la etapa precedente (2,00 g, 4,13 mmol), imidazol (365 mg, 5,36 mmol), trifenilfosfina (1,41 g, 5,36 mmol) y yodo (1,36 g, 5,36 mmol). Tiempo de reacción: 2 días a temperatura ambiente; la purificación se realizó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc) para producir el compuesto esperado como un aceite amarillo pálido (1,89 g, 3,18 mmol). Rendimiento 77%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, EtOAc) 0,30. IR (NaCl)  $\nu$  778, 835, 1108, 1253, 2859, 2927 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0,06 (s, 6H), 0,89 (s, 9H), 3,26 (t, 2H, 7,0 Hz), 3,55 (t, 2H, J = 5,5 Hz), 3,65 (m, 24H), 3,70 (m, 4H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -5,2 (2C), 3,0, 18,4, 26,0 (3C), 62,8, 70,3-70,7 (12C), 72,1, 72,7. MS m/z 361 (2), 331 (1), 317 (9), 287 (6), 243 (8), 207 (12), 199 (28), 189 (8), 159 (16), 155 (100), 133 (5), 117 (13), 115 (15), 103 (21), 101 (11), 89 (16), 87 (13), 75 (14), 73 (60), 71 (13), 59 (18).

**Etap 3: Síntesis de N-(28-etil-2,2,3,3-tetrametil-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-aza-3-silaheptacosan-30-il)ftalimida.** A una solución agitada de N-[2-(etilamino)etil]-1H-ftalimida (489 mg, 1,92 mmol) (Jones, J. Med. Chem., 1973, 16, 537-542) en acetonitrilo anhidro (15 ml) se añadió carbonato de potasio (530 mg, 3,84 mmol) en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h antes de la adición del compuesto de la etapa anterior (1,14 g, 1,92 mmol). La mezcla se calentó a 50°C durante 7 días, se enfrió a temperatura ambiente y se repartió entre una solución acuosa saturada de carbonato de sodio (50 ml) y diclorometano (30 ml). Después de la decantación, la capa acuosa se extrajo con diclorometano (3x30 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo oleoso se purificó por cromatografía (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5, v/v) para proporcionar el compuesto esperado (854 mg, 1,25 mmol) como un aceite amarillo pálido. Rendimiento 65%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/05, v/v) 0,32. IR (ATR accesorio de diamante)  $\nu$  838, 1112, 1255, 1397, 1436, 1469, 1717, 2862, 2929 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0,05 (s, 6H), 0,88 (s, 9H), 0,99 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,66 (q, 2H, J = 7,5 Hz), 2,73 (m, 4H), 3,56 (m, 4H), 3,63 (m, 24H), 3,76 (m, 4H), 7,70 (m, 2H), 7,83 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -5,2 (2C), 12,0, 18,4, 26,0 (3C), 36,1, 48,5, 51,4, 53,0, 62,8, 70,6 (13C), 72,7, 123,2 (2C), 132,3 (2C), 133,9 (2C), 168,4 (2C); ESI-MS m/z 685,5 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etap 4: Síntesis de 28-etil-2,2,3,3-tetrametil-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-aza-3-silaheptacosan-30-amina.** Este compuesto se sintetizó según el procedimiento descrito en el etapa 4 del Ejemplo 1, a partir del compuesto de la etapa precedente (607 mg, 0,89 mmol) y monohidrato de hidrazina (430  $\mu$ l, 8,86 mmol). Tiempo de

reacción: 20 h a temperatura ambiente para producir el compuesto esperado (492 mg, 0,89 mmol) como un aceite de color amarillo pálido que se utilizó sin purificación adicional. Rendimiento cuantitativo. R<sub>f</sub> (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 9/1, v/v) 0,23. IR (NaCl)  $\nu$  837, 1108, 1252, 1299, 1472, 1648, 2859, 2929, 3100-3600 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0,04 (s, 6H), 0,87 (s, 9H), 1,00 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,61 (m, 8H), 3,51 (t, 2H, J = 6,3 Hz), 3,53 (t, 2H, J = 5,4 Hz), 3,63 (m, 24H), 3,74 (t, 2H, J = 5,4 Hz). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -5,2 (2C), 12,0, 18,4, 26,0 (3C), 39,9, 48,7, 53,0, 56,9, 62,8, 70,1-70,6 (13C), 72,7.

**Etapas 5:** Síntesis de *N*-(28-etil-2,2,3,3-tetrametil-4,7,10,13,16,19,22,25-octa-oxa-28-aza-3-silaheptacosan-30-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida. Este compuesto se sintetizó según el procedimiento descrito en la etapa 5 del Ejemplo 1, a partir del compuesto de la etapa precedente (450 mg, 0,81 mmol) y el éster 6-yodoquinoxalin-2-carboxilato de 4-nitrofenilo activado (220 mg, 0,52 mmol). Tiempo de reacción: 21 h a temperatura ambiente; la purificación se realizó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5, v/v a continuación, 9/1, v/v) para proporcionar el compuesto esperado (435 mg, 0,52 mmol) como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento 99%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 9/1, v/v) 0,28. IR (NaCl)  $\nu$  835, 1107, 1252, 1352, 1473, 1527, 1592, 1677, 2860, 2927, 3300-3400 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0,03 (s, 6H), 0,85 (s, 9H), 1,04 (t, 3H, 7,1 Hz), 2,65 (q, 2H, 7,1 Hz), 2,74 (m, 4H), 3,61 (m, 32H), 7,80 (d, 1H, 8,8 Hz), 8,05 (dd, 1H, J = 1,8, 8,8 Hz), 8,41 (m, 1H), 8,57 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 9,61 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -5,2 (2C), 12,2, 18,4, 26,0 (3C), 37,6, 48,7, 52,9, 53,0, 62,8, 70,2-70,6 (13C), 72,7, 97,9, 130,9, 138,6, 139,7 (2C), 144,2, 144,4, 144,7, 163,0. ESI-MS m/z 837,4 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapas 6:** Síntesis de *N*-(24-etil-1-hidroxi-3,6,9,12,15,18,21-hepta-oxa-24-azaheptacosan-26-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida. Este compuesto se sintetizó según el procedimiento descrito en la etapa 6 del Ejemplo 1, a partir del compuesto de la etapa precedente (425 mg, 0,51 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en tetrahidrofurano (762  $\mu$ l, 0,76 mmol). Tiempo de reacción: 1,5 h a temperatura ambiente; la purificación se realizó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 9/1 a continuación 8/2, v/v) para proporcionar el compuesto esperado como un aceite amarillo (273 mg, 0,38 mmol). Rendimiento 75%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 8/2, v/v) 0,36. IR (ATR accesorio de diamante)  $\nu$  1127, 1353, 1474, 1529, 1593, 1675, 2800-3000, 3100-3600 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 1,06 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,66 (q, 2H, 7,1 Hz), 2,76 (m, 4H), 2,91 (m, 1H), 3,60 (m, 32H), 7,81 (d, 1H, 8,8 Hz), 8,05 (dd, 1H, J = 1,8, 8,8 Hz), 8,44 (m, 1H), 8,58 (d, 1H, 1,8 Hz), 9,61 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 12,1, 37,5, 48,7, 52,9, 53,0, 61,7, 70,0-70,6 (13C), 72,7, 98,0, 130,9, 138,6, 139,7 (2C), 144,2, 144,4, 144,7, 163,0. ESI-MS m/z 723,3 [M+H]<sup>+</sup>.

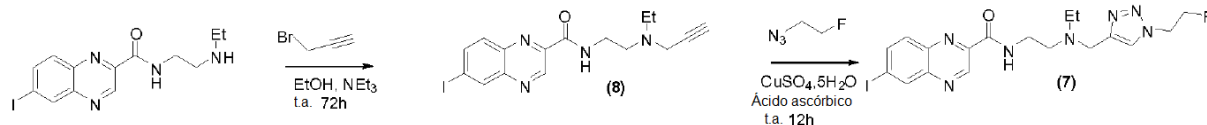
**Etapas 7:** Síntesis de *N*-(24-etil-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-hepta-oxa-24-azaheptacosan-26-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (5). Este compuesto se sintetizó según el procedimiento descrito en la etapa 7 del Ejemplo 1, a partir del compuesto de la etapa precedente (94 mg, 0,13 mmol) y trifluoruro de (dietilamino)azufre (34,4  $\mu$ l, 0,26 mmol). Tiempo de reacción: 15 min a -50°C y 1,5 h a temperatura ambiente; la purificación se realizó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH, 8/2/0,5, v/v/v) para producir el compuesto esperado como un aceite amarillo (63 mg, 86,9  $\mu$ mol). Rendimiento 67%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/EtOH, 5/5, v/v que contenía 0,5% de NH<sub>4</sub>OH) 0,32. IR (ATR accesorio de diamante)  $\nu$  1129, 1353, 1474, 1527, 1593, 1675, 2800-3000, 3300-3400 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 1,07 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,67 (q, 2H, J = 7,1 Hz), 2,79 (m, 4H), 3,61 (m, 30H), 4,55 (td, 2H, <sup>2</sup>J<sub>H-F</sub> = 47,8 Hz, J = 4,1 Hz), 7,83 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 8,08 (dd, 1H, J = 1,6, 8,8 Hz), 8,46 (m, 1H), 8,61 (d, 1H, J = 1,6 Hz), 9,64 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 11,5, 37,0, 48,8, 52,9, 53,0, 70,6 (14C), 83,3 (<sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 163 Hz), 98,1, 131,0, 138,6, 139,7, 139,7, 144,1, 144,4, 144,7, 163,3. RMN <sup>19</sup>F (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) -223,2. ESI-MS m/z 725,2 [M+H]<sup>+</sup>. Anal. (C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O<sub>8</sub>IN<sub>4</sub>F, 3H<sub>2</sub>O) calculado: C: 44,73; H: 6,73; N: 7,20; encontrado: C: 44,84; H: 7,16; N: 5,82).

**Etapas 8:** Síntesis de *N*-(24-etil-1-metanosulfoniloxi-3,6,9,12,15,18,21-hepta-oxa-24-azaheptacosan-26-il)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (6). Este compuesto se sintetizó según el procedimiento descrito en la etapa 8 del Ejemplo 1, a partir del compuesto obtenido en la etapa 6 del presente ejemplo (91 mg, 0,126 mmol), trietilamina destilada (21  $\mu$ l, 0,151 mmol), 4-(dimetilamino)piridina (1,5 mg, 13,0  $\mu$ mol) y cloruro de metanosulfonilo (12  $\mu$ l, 0,151 mmol). Tiempo de reacción: 2 h a temperatura ambiente; la purificación se realizó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 9/1, v/v) para producir el compuesto esperado (95 mg, 0,120 mmol) como un aceite amarillo. Rendimiento 95%. R<sub>f</sub> (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 8/2, v/v) 0,50. IR (ATR accesorio de diamante)  $\nu$  733, 923, 1128, 1176, 1354, 1474, 1593, 1527, 1675, 2800-3000, 3300-3400 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 1,04 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,64 (q, 2H, J = 7,1 Hz), 2,73 (m, 4H), 3,06 (s, 3H), 3,61 (m, 28H), 3,73 (t, 2H, J = 4,5 Hz), 4,35 (t, 2H, J = 4,5 Hz), 7,80 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 8,05 (dd, 1H, J = 1,3, 8,8 Hz), 8,41 (m, 1H), 8,57 (d, 1H, J = 1,3 Hz), 9,61 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 12,2, 37,6, 37,8, 48,7, 52,9, 53,0, 69,1, 69,4, 70,2-70,6 (13C), 98,0, 130,9, 138,6, 139,6, 139,7, 144,2, 144,4, 144,7, 163,0. ESI-MS m/z 801,3 [M+H]<sup>+</sup>.

**EJEMPLO 4:** Síntesis de *N*-[2-[(*N*-etil)-(*N*-prop-2-inil)amino]etil]-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (8) (Precursor de [<sup>18</sup>F] 7) y *N*-[2-[(*N*-etil)-[1-(2-fluoroetil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]metil]amino]etil]-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (7).

[0089]

5



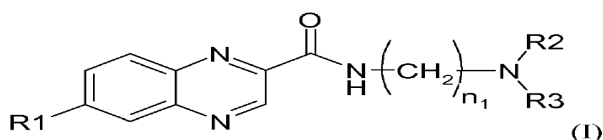
10 **Etapla 1: Síntesis de N-[2-[(N-etil)-(N-prop-2-inil)amino]etil]-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (8).** A una  
solución del compuesto N-(2-(etilamino)etil)-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (Denoyer, J. Chromatogr. B. Analyt.  
Technol. Biomed. Life Sci. 2008, 875, 411-418) (500 mg, 1,35 mmol) en etanol anhidro (10 ml) se añadieron  
sucesivamente bromuro de propargilo (122 µl, 1,62 mmol) y trietilamina (187 µl, 1,35 mmol). La mezcla se agitó a  
temperatura ambiente durante 72 h antes de la adición de agua (33 ml). A continuación, la solución resultante se  
15 extrajo con diclorometano (3x33 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se  
filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 99/1, v/v)  
para producir el compuesto esperado (522 mg, 1,28 mmol) como un sólido beige. Rendimiento 95%. R<sub>f</sub> (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 99/1, v/v) 0,48. P<sub>f</sub> 135-137°C. IR (KBr) ν 1047, 1176, 1355, 1474, 1534, 1670, 2967, 3000-3600 cm<sup>-1</sup>.  
RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1,12 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,23 (t, 1H, J = 2,3 Hz), 2,67 (q, 2H, J = 7,1 Hz), 2,84 (t,  
2H, J = 6,0 Hz), 3,52 (d, 2H, J = 2,3 Hz), 3,62 (q, 2H, 6,0 Hz), 7,78 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 8,02 (dd, 1H, J = 1,9, 8,8 Hz),  
20 8,32 (m, 1H), 8,54 (d, 1H, J = 1,9 Hz), 9,59 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 13,2, 37,8, 41,9, 48,1,  
52,8, 74,5, 79,3, 98,3, 131,9, 139,2, 140,3, 140,6, 145,2, 145,4, 145,6, 163,5. ESI-MS m/z 409,1 [M+H]<sup>+</sup>.

25 **Etapla 2: Síntesis de N-[2-[(N-etil)-[1-(2-fluoroetil)-1H(1,2,3)triazol-4-il]metil]amino]etil]-6-yodoquinoxalin-2-**  
**carboxamida (7).** Se secó fluoruro de cesio (336 mg, 2,21 mmol) mediante destilación azeotrópica con acetonitrilo  
anhidro (4x7 ml) a 90°C, bajo vacío. De vuelta a la temperatura ambiente, se añadió en atmósfera de argón una  
solución de p-toluenosulfonato-2-azidoetilo (176 mg, 0,73 mmol), sintetizado según el procedimiento descrito por  
Demko (Org. Lett., 2001, 3, 4091-4094.), en una mezcla de alcohol terc-amílico anhidro y acetonitrilo (7,4 ml, 1/1,  
v/v). La mezcla se agitó a 100°C durante 2 h para dar 2-fluoro-1-azidoetano. De vuelta a la temperatura ambiente, se  
añadieron sucesivamente una solución acuosa de sulfato de cobre (II) pentahidratado 1, 0 M (370 µl), una solución  
30 acuosa de ácido ascórbico 1,0 M (370 µl) y el compuesto (8) de la etapa precedente (300 mg, 0,73 mmol). La mezcla  
se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas antes de la adición de agua (5 ml) y una solución acuosa de  
carbonato de sodio 2,0 M (5 ml). La solución se extrajo con diclorometano (4x10 ml). Las capas orgánicas se  
combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo se sometió a  
cromatografía (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 99/1, v/v) para producir el compuesto esperado (311 mg, 0,63 mmol) como un  
35 aceite marrón. Rendimiento 86%. R<sub>f</sub> (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 99/1, v/v) 0,41. IR (CCl<sub>4</sub>) ν 1145, 1354, 1388, 1437, 1473,  
1522, 1659, 1673, 2837, 2971, 3246, 3386 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1,12 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 2,64 (q,  
2H, J = 7,1 Hz), 2,76 (t, 2H, J = 6,1 Hz), 3,59 (q, 2H, J = 6,1 Hz), 3,88 (s, 2H), 4,57 (td, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H-F</sub> = 27,5 Hz, J = 4,6  
Hz), 4,71 (td, 2H, <sup>2</sup>J<sub>H-F</sub> = 51,0 Hz, J = 4,6 Hz), 7,65 (s, 1H), 7,83 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 8,05 (dd, 1H, J = 1,8, 8,8 Hz),  
8,40 (m, 1H), 8,57 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 9,60 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 12,1, 37,2, 47,6, 48,1, 50,4 (d,  
40 <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 20 Hz), 51,5, 81,5 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 172 Hz), 98,0, 123,5 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 14 Hz), 130,7, 138,4, 139,4, 139,6, 144,0, 144,2,  
144,5, 145,3, 162,9. RMN <sup>19</sup>F (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) -223,21. ESI-MS m/z 498,0 [M+H]<sup>+</sup>.

45 **Etapla 3: Síntesis de sal de triclorhidrato de N-[2-[(N-etil)-[1-(2-fluoroetil)-1H(1,2,3)triazol-4-**  
**il]metil]amino]etil]-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (9), sal de triclorhidrato de (7).** A una solución agitada del  
compuesto (7) (200 mg, 0,40 mmol) en diclorometano anhidro (5 ml) se añadió en atmósfera de argón una solución  
de ácido clorhídrico 2,0 N en éter dietílico anhidro (10 ml). Después de 10 min, el disolvente se evaporó al vacío. El  
residuo se suspendió en éter dietílico anhidro (10 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 14 h. El  
precipitado se filtró y se secó a presión reducida para producir la sal de triclorhidrato de (7) (209 mg, 0,34 mmol)  
como un sólido amarillo muy higroscópico. Rendimiento 86%. p<sub>f</sub> 98-100°C. IR (KBr) ν 1040, 1169, 1356, 1474, 1534,  
50 1670, 2600-3600 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 1,34 (t, 3H, J = 7,0 Hz), 3,15 (m, 2H), 3,30 (m, 2H),  
3,84 (m, 2H), 4,55 (m, 2H), 4,70 (s, 2H), 4,89 (td, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H-F</sub> = 20,9 Hz, 4,4 Hz), 5,36 (m, 2H), 7,92 (d, 1H, J = 8,8 Hz),  
8,24 (dd, 1H, J = 1,6, 8,8 Hz), 8,47 (s, 1H), 8,62 (d, 1H, J = 1,6 Hz), 9,44 (m, 2H), 11,08 (brs, 1H). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz,  
DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 8,6, 34,1, 45,4, 47,3, 50,2 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 19 Hz), 50,3, 81,8 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 167 Hz), 99,6, 127,6 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> =  
12 Hz), 130,7, 136,1, 137,5, 138,9, 139,8, 143,6, 144,3, 144,4, 163,6. RMN <sup>19</sup>F (470 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) -  
55 223,95. ESI-MS m/z 498,1 [M+H]<sup>+</sup>. Anal. (C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>OIN<sub>7</sub>F, 3HCl, H<sub>2</sub>O) calculado: C: 34,61; H: 4,20; N: 15,70;  
encontrado: C: 37,74; H: 4,61; N: 15,49.

[0090] Las estructuras químicas y datos físicos de algunos compuestos no marcados de fórmula (Ib) de la invención  
se ilustran en la siguiente Tabla I.

60



65

Tabla I

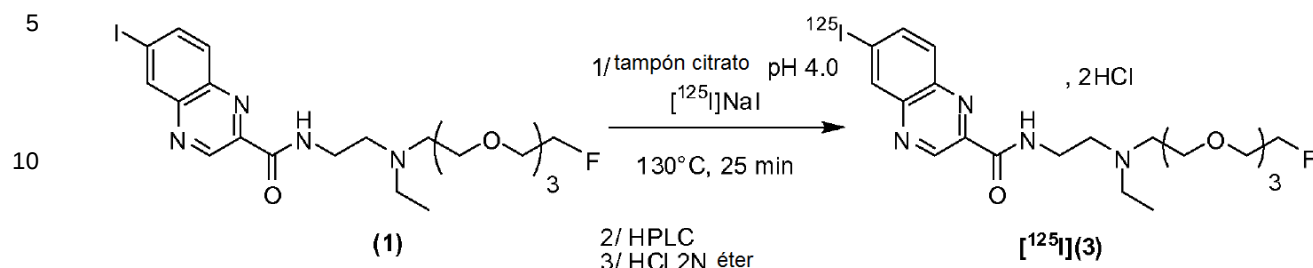
| N° |  | n <sub>1</sub> | R2 | R3 | Sal   | Aspecto         |
|----|--|----------------|----|----|-------|-----------------|
| 1  |  | 2              | Et |    | -     | aceite          |
| 3  |  |                |    |    | 2 HCl | sólido amarillo |
| 2  |  | 2              | Et |    | -     | aceite amarillo |
| 4  |  | 2              | Et |    | -     | aceite amarillo |
| 5  |  | 2              | Et |    | -     | aceite amarillo |
| 6  |  | 2              | Et |    | -     | Yellow oil      |
| 7  |  | 2              | Et |    |       | aceite marrón   |
| 9  |  |                |    |    | 3HCl  | sólido amarillo |
| 8  |  | 2              | Et |    | -     | sólido beige    |

- Et indica un radical etilo

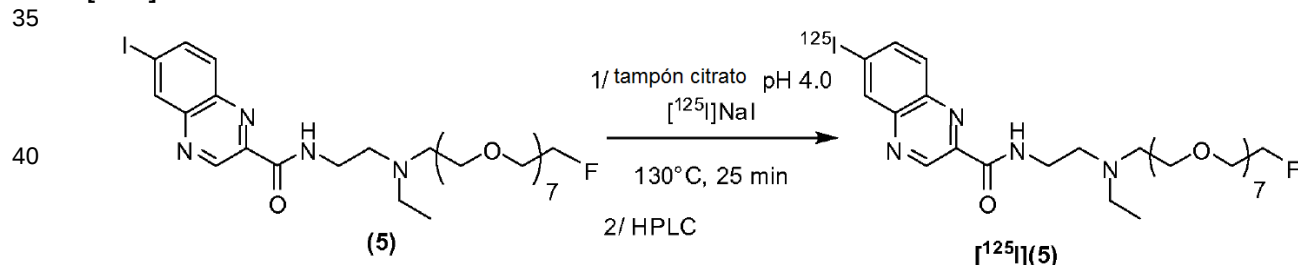
**[0091]** A continuación, se describen algunos ejemplos de marcaje radiactivo.

#### **Materiales para el marcaje radioactivo con yodo-125 o yodo-131**

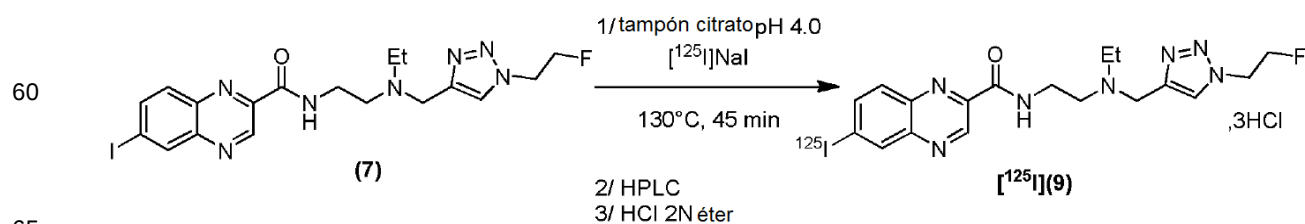
**[0092]** Se adquirió [<sup>125</sup>I] NaI (3,7 GBq/ml, 643,8 MBq/mg) de PerkinElmer Life y Analytical Sciences (331 Treble Cove Road, Billerica, MA 01862, EE.UU.) como una solución añadida no portadora en una solución acuosa de hidróxido de sodio 1,0 x 10<sup>-5</sup> M libre reductora (pH 8-11). Se adquirió [<sup>131</sup>I] NaI (66,21 GBq/ml, 712,82 GBq/mg) de PerkinElmer Life y Analytical Sciences (331 Treble Cove Road, Billerica, MA 01862, EE.UU.) como una solución de hidróxido de sodio 0,1 M (pH 12 a 14). Extrelut® y la solución de tampón de citrato (pH = 4) se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania). Las placas de radio TLC (óxido de aluminio neutro de Merck 60F254 o Fluka, óxido de aluminio en láminas para TLC-PET, 60Å, 0,2 mm) se revelaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (98/2, v/v) y se midieron en un AMBIS 400 (Scanalytics, CSPI, San Diego, CA, EE.UU.). La purificación con RP-HPLC semipreparativa de [<sup>125</sup>I] (7) se realizó en un sistema que incluía una bomba Shimadzu LC 6A, un controlador SLC 6B, un integrador CR5A, un detector UV SPD 6AV y un detector de rayos gamma Raytest Steffi de paso de flujo. La separación se llevó a cabo en una columna C18 (ZORBAX 80Å, 4,6 x 150 mm). Para los radiotrazadores [<sup>122</sup>I](1), [<sup>125</sup>I](3), [<sup>131</sup>I](1) y [<sup>125</sup>I](5) se llevó a cabo una purificación con RP-HPLC semipreparativa en un sistema Perkin Elmer que contenía un automuestreador Flexar LC, una bomba de la serie 200, un horno de columna Peltier, un desgasificador de vacío, un detector Flexar PDA y un detector GabiStar Raytest. En estos casos, la separación se llevó a cabo en una columna C18 (SymmetryPrep C18, 7,8 x 300 mm, 7 µm, Waters). Todos los radiotrazadores mostraron mediante radio-TLC y análisis de radio-RP-HPLC que eran idénticos al material no radiactivo auténtico y estaban libres de impurezas químicas y radioquímicas importantes.

**EJEMPLO 5: Radiomarcaje del compuesto (1) con yodo-125 a baja actividad específica.****[0093]**

**[0094]** A una solución del compuesto (1) (3,2 mg) en tampón de citrato pH = 4 (500 µl) se añadieron, en un vial sellado, una solución acuosa de sulfato de cobre (0,5 mg, 100 µl) que se utiliza como catalizador y [<sup>125</sup>I] NaI (181 MBq). La mezcla de reacción se calentó a 130°C durante 25 min. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, el residuo se recogió en agua (500 µl) y se añadió una solución acuosa de NaOH 1,0 N (100 µl). Se extrajeron el tapón del vial y el séptum. La suspensión resultante se pasó a través de una columna Extrelut, el vial se enjuagó dos veces con etanol (150 µl), y después de 10 min, la columna se eluyó con diclorometano (5x3 ml). Los extractos orgánicos recogidos se evaporaron a presión reducida, se recogieron con metanol (2x100 µl), y se purificaron por HPLC semipreparativa (columna C18 semipreparativa Waters Symmetry® (300x7,8 mm, porosidad 7 µm); metanol al 70% (NH<sub>4</sub>OH al 0,2%) en agua (NH<sub>4</sub>OH al 0,2%)) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La fracción que contenía el producto marcado radioactivamente (tiempo de retención 15,6 min), se evaporó hasta sequedad, se disolvió en diclorometano (2 ml) y se trató con una solución de ácido clorhídrico 2,0 N en éter anhidro (2 ml). La solución de clorhidrato resultante se evaporó a presión reducida, y el residuo seco se suspendió en éter anhidro (3 ml). El disolvente se evaporó a continuación al vacío durante 30 min para producir el compuesto marcado radioactivamente [<sup>125</sup>I] (3). Rendimiento radioquímico, 50% (90 MBq); actividad específica, 19,3 MBq/µmol; pureza radioquímica, > 99%.

**EJEMPLO 6: Radiomarcaje del compuesto (5) con yodo-125 a baja actividad específica.****[0095]**

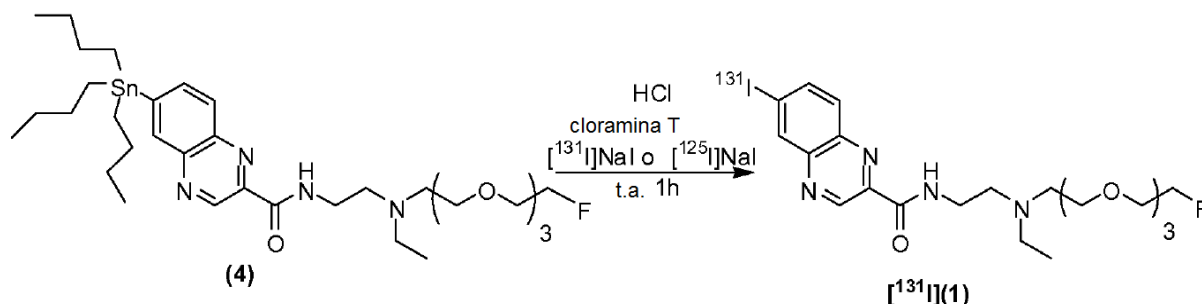
**[0096]** Este compuesto se sintetizó según el procedimiento descrito para [<sup>125</sup>I] (1), a excepción de la etapa final de conversión de clorhidrato, partiendo del compuesto (5) (4,0 mg), tampón de citrato pH = 4 (500 µl), una solución acuosa de sulfato de cobre (0,5 mg, 100 µl) y [<sup>125</sup>I] NaI (363 MBq). Tiempo de reacción: 25 minutos a 130°C. Purificación: HPLC semipreparativa (columna C18 Waters Symmetry® (300x7,8 mm, porosidad 7 µm); metanol al 75% (NH<sub>4</sub>OH al 0,2%) en agua (NH<sub>4</sub>OH al 0,2%)) a una velocidad de flujo de 2,5 ml/min; tiempo de retención: 13,5 min. Rendimiento radioquímico, 22% (78 MBq); actividad específica, 15,6 MBq/µmol; pureza radioquímica > 99%.

**EJEMPLO 7: Radiomarcaje del compuesto (7) con yodo-125 a baja actividad específica.****[0097]**

[0098] Este compuesto se sintetizó según el procedimiento descrito para el compuesto [<sup>125</sup>I] (3), a partir del compuesto (7) (2,9 mg, 4,8 μmol), tampón de citrato pH = 4 (500 μl), una solución acuosa de sulfato de cobre (0,5 mg, 100 μl) y [<sup>125</sup>I] NaI (241 MBq). Tiempo de reacción: 45 minutos a 130°C. Purificación por HPLC (columna Zorbax C18 80Å, (4,6 x 150 mm); tiempo de gradiente = 20 min, H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50 -> 0:100) (NH<sub>4</sub>OH al 0,2%) a una velocidad de flujo de 1 ml/min; tiempo de retención 11,6 min. Rendimiento radioquímico, 35%; actividad específica, 34,6 MBq/μmol; pureza radioquímica, 98,8%.

#### **EJEMPLO 8: Radiomarcaje del compuesto (1) con yodo-131 o yodo-125 a alta actividad específica.**

[0099]



[0100] A una solución de compuesto (4) se añadieron (50 μl, 1 mg/ml en EtOH), en un vial sellado, [<sup>131</sup>I] NaI (1538 MBq), una solución acuosa de HCl 1 N (50 μl) y una solución acuosa de monohidrato de cloramina T (20 μl, 1 mg/ml). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 h (en agitación cada 20 min). La mezcla se inactivó mediante la adición de una solución acuosa de NaOH 1N (100 μl) y una solución acuosa de metabisulfito de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (10 μl, 20 mg/ml). La mezcla se purificó por HPLC semipreparativa (columna C18 semipreparativa Waters Symmetry® (300x7,8 mm, porosidad 7 μm); gradiente lineal de 70 a 100% de metanol (NH<sub>4</sub>OH al 0,2%) en agua (NH<sub>4</sub>OH al 0,2%) en 15 min) a una velocidad de flujo de 1,2 ml/min. Se recogió la fracción que contenía el producto marcado radioactivamente (tiempo de retención 19,8 min) y se evaporó a sequedad para producir el compuesto marcado radioactivamente [<sup>131</sup>I] 1. Rendimiento radioquímico, 80% (1.223 MBq); actividad específica 99 a 130 GBq/μmol, coeficiente de reparto de octanol/agua (tampón PBS) (logD) 0,95 ± 0,04; pureza radioquímica, > 99%.

[0101] El mismo protocolo se siguió para el marcaje radiactivo del compuesto (1) con yodo-125, partiendo del compuesto (4) (50 μl, 1 mg/ml en EtOH), [<sup>125</sup>I] NaI (304 MBq), una solución acuosa de HCl 0,5 N (50 μl) y una solución acuosa de monohidrato de cloramina T (20 μl, 1 mg/ml). Rendimiento radioquímico, 83% (251 MBq); actividad específica 107-121 GBq/μmol, pureza radioquímica, > 99%.

#### **EJEMPLO 9: Marcaje radioactivo con flúor-18.**

##### **Materiales para el marcaje radioactivo con flúor-18.**

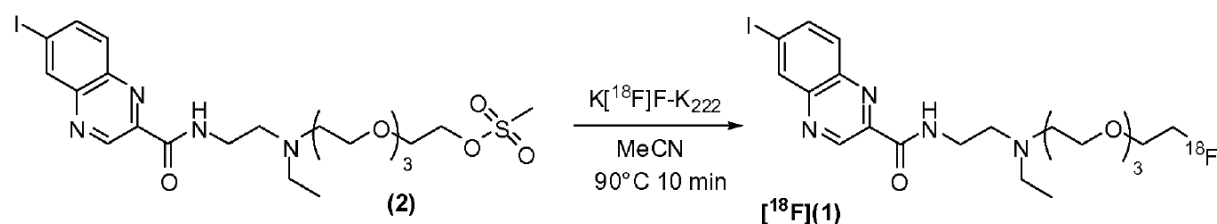
[0102] El flúor-18 añadido sin portador (vida media: 109,8 minutos) se produjo a través de la reacción nuclear de [<sup>18</sup>O (p, n) <sup>18</sup>F] mediante irradiación de 2,8 ml de [<sup>18</sup>O] agua diana (> 97% enriquecida, Bruce Technology, Chapel Hill, EE.UU.) en un ciclotrón CPH14 (laboratorios Cyclopharma, Saint-Beauzire, Francia) (haz de protones de 14 MeV) y la solución acuosa radiactiva se transfirió a continuación a una celda caliente apropiada. La producción típica de [<sup>18</sup>F] fluoruro al final del bombardeo para una irradiación de 90 a 100 μA.h (120 min): 185 GBq (5 Ci). Las síntesis radioquímicas se realizaron utilizando un módulo de síntesis R&D de tipo monoreactor o bireactor Synchrom® (Raytest, Straubenhardt, Alemania). Las radio-TLC se realizaron sobre placas prereducidas Merck de óxido de aluminio neutro 60F<sub>254</sub> con una mezcla de diclorometano y etanol como disolventes (98/2). Los puntos radiactivos se detectaron utilizando un detector 4000 AMBIS equipado con un contador proporcional de múltiples cables controlado por ordenador (Scanalytics, Rockville, EE.UU.). Las HPLC semipreparativas se llevaron a cabo en una columna C18 semipreparativa Waters Symmetry® (300 x 7,8 mm; porosidad: 7 μm) o columna de SiO<sub>2</sub> semipreparativa Waters Spherisorb® (250x10 mm, porosidad de 10 μm); velocidad de flujo: 3,0 ml/min; temperatura: ta; detección de absorbancia a λ = 254 nm. Las purezas química y radioquímica del compuesto purificado por HPLC y formulado para la formación de imágenes *in vivo* se determinaron usando HPLC analítica con el siguiente equipo y condiciones: Sistema: PerkinElmer serie 200 equipado con detector UV de conjunto de diodos (DAD) y un detector gamma GABI star (Raytest); columna: C18 Waters Symmetry® (150 x 4,6 mm; porosidad 5 μm) o SiO<sub>2</sub> Waters Spherisorb® (150x4,6 mm, porosidad de 5 μm); velocidad de flujo: 1,0 ml/min ; temperatura: ta; detección de absorbancia a λ = 254 nm.

Prerequisito: preparación del complejo  $K[^{18}F]F-K_{222}$ .

[0103] El complejo  $K[^{18}F]F-K_{222}$  activado se obtuvo por un procedimiento convencional. En pocas palabras, el  $[^{18}F]$  fluoruro acuoso de la diana se pasó a través de una resina de intercambio aniónico (SepPak® Light Accell™ Plus QMA cartridge, Waters). La radiactividad se eluyó al reactor con 1,0 ml de un carbonato de potasio (3 mg) y una solución de Kryptofix® (15 mg) (ACN/H<sub>2</sub>O 30/70). Los disolventes se evaporaron a presión reducida y bajo una corriente suave de helio a 110°C durante 10 min. Un segundo secado azeotrópico se repitió mediante la adición de 1 ml de acetonitrilo anhidro.

### 9.1 Radiomarcage del compuesto (1) con flúor-18.

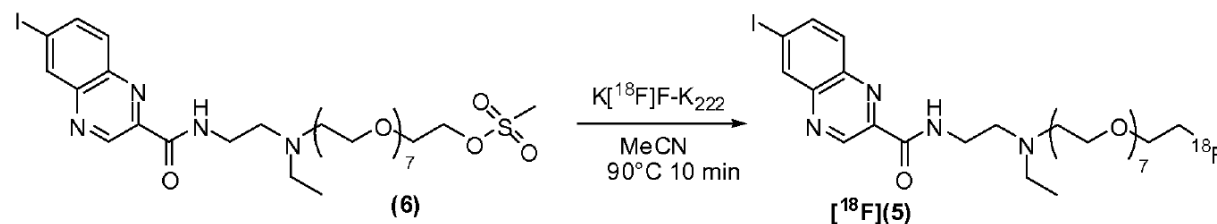
[0104]



[0105] Se añadió una solución del precursor de mesilato correspondiente (compuesto (2), 13 mg) en acetonitrilo seco (1 ml) al complejo  $K[^{18}F]F-K_{222}$  seco y se calentó a 90°C durante 10 min. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la solución se diluyó con 2,5 ml de eluyente de HPLC y se purificó mediante HPLC semipreparativa (columna C18; metanol/agua/hidróxido de amonio (74,7:24,9:0,4 v/v/v; tr = 12,5 min). La solución recogida se diluyó con solución salina (20 ml), a continuación se pasó a través de un cartucho C18 (SepPak® Plus C18, Waters). El cartucho se lavó a continuación con agua (5 ml) antes de eluirse con etanol (900 µl) y a continuación solución salina (8 ml). La solución se recogió en un vial estéril (rendimiento de la formulación: 90%). La radiosíntesis se llevó a cabo en 57 min con un rendimiento corregido de la descomposición del 21%. Por último, se obtuvo  $[^{18}F](1)$  con una actividad específica de 45 a 53 GBq/µmol y una pureza radioquímica de > 99%, según lo confirmado por HPLC analítica (columna C18; metanol/agua/hidróxido de amonio v/v/v; gradiente lineal de 59,9:39,9:0,2 a 89,8:10,0:0,2 en 10 min, a continuación 59,9:39,9:0,2 isocrático durante 7 min; 0,9 ml/min; tr = 12,51 min). La prueba de la mancha de color no mostró detección de  $K_{222}$  en la solución de  $[^{18}F](1)$  final inyectable. El radiotrazador fue radioquímicamente estable a temperatura ambiente durante al menos 24 horas después de la preparación. El coeficiente de reparto de octanol/agua (tampón PBS) (logD) para  $[^{18}F](1)$  fue de  $1,52 \pm 0,03$ .

### 9.2 Radiomarcage del compuesto (5) con flúor-18.

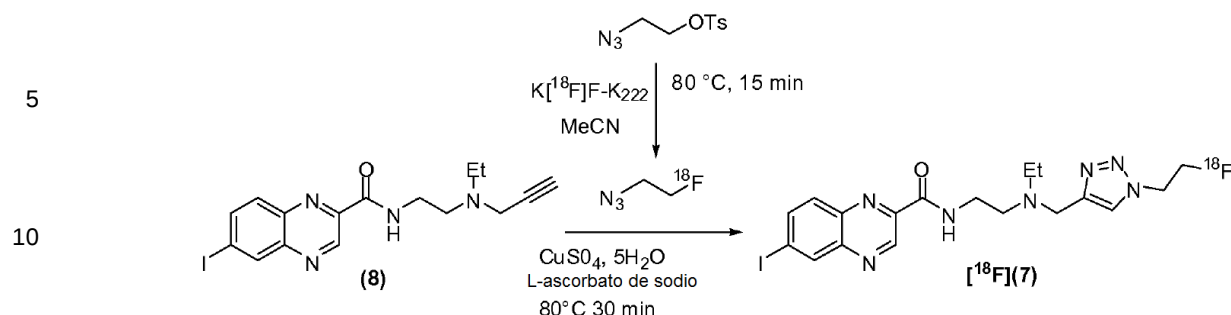
[0106]



[0107] Se añadió una solución del precursor correspondiente de mesilato (compuesto (6), 14 mg) en acetonitrilo seco (1 ml) al complejo  $K[^{18}F]F-K_{222}$  seco y se calentó a 90°C durante 10 min. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la solución se diluyó con 2,5 ml de eluyente de HPLC y se purificó mediante HPLC semipreparativa (columna SiO<sub>2</sub>; diclorometano/etanol/hidróxido de amonio 91,8:8,0:0,2 v/v/v; tr = 12,1 min). Formulación: el disolvente se evaporó al vacío y la formulación se consiguió en etanol/solución salina 1/9 (v/v) (rendimiento de la formulación: 93%). La radiosíntesis se llevó a cabo en 65 min con un rendimiento corregido de la descomposición del 34%. Por último, se obtuvo  $[^{18}F](5)$  con una actividad específica de 81 a 139 GBq/µmol y una pureza radioquímica de > 99%, según lo confirmado por HPLC analítica (Waters Spherisorb® SiO<sub>2</sub>; 10 % EtOH (NH<sub>4</sub>OH al 0,2%) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (NH<sub>4</sub>OH al 0,2%),  $t_R$  = 9,1 min). La prueba de la mancha de color no mostró detección de  $K_{222}$  en la solución de  $[^{18}F](5)$  inyectable final. El radiotrazador fue radioquímicamente estable a temperatura ambiente durante al menos 6 horas después de la preparación. El coeficiente de reparto de octanol/agua (tampón PBS) (logD) para  $[^{18}F](5)$  fue de  $0,95 \pm 0,02$ .

### 9.3 Radiomarcage del compuesto (7) con flúor-18.

[0108]



**[0109]** Se añadió una solución de 2-azidoetil-4-toluenosulfonato (5  $\mu$ l, 6 mg) en acetonitrilo seco (1 ml) al complejo  $K[^{18}F]F-K_{222}$  seco y se calentó a 80°C por 15 min. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la solución se destiló a 110°C bajo un flujo suave de helio (20 ml/min) en el segundo vial de reacción que contenía una solución de sulfato de cobre pentahidratado (4,89 mg) en tampón de acetato de sodio (250 mM, 50  $\mu$ l) y el compuesto (8) (4,5 mg) en DMF anhidra (200  $\mu$ l). La temperatura del segundo reactor se mantuvo a 20°C durante el proceso de destilación completo (5 min), conduciendo a un rendimiento de transferencia del 82%. Se añadió una solución de L-ascorbato sódico (4,4 mg) en tampón de acetato de sodio (250 mM, 550  $\mu$ l) a la mezcla y se calentó a 80°C por 30 min. Después de enfriar, la solución se diluyó con 2 ml de eluyente de HPLC y se purificó mediante HPLC semipreparativa (columna C18 semipreparativa de Waters Symmetry® (300x7,8 mm, porosidad 7  $\mu$ m); metanol al 70% (NH<sub>4</sub>OH al 0,4%) en agua (NH<sub>4</sub>OH al 0,4%)). Formulación: La solución recogida se diluyó en 20 ml de solución salina, a continuación se pasó a través de un cartucho C18 (SepPak® C18, Waters). El cartucho se lavó a continuación con agua (5 ml) antes de eluirse con 300  $\mu$ l de etanol, seguido de 2,7 ml de solución salina fisiológica. La radiosíntesis se llevó a cabo en 85 min con un rendimiento corregido de la descomposición del 36%. Por último, se obtuvo  $[^{18}F]$  (7) con una pureza radioquímica de > 99%, según lo confirmado por HPLC analítica (Waters Symmetry® C18; elución en gradiente: 60% a 90% de MeOH (NH<sub>4</sub>OH al 0,4%) en agua (10 min), a continuación 60% durante 7 minutos,  $t_R$  = 9,63 min). La prueba de la mancha de color no mostró detección de  $K_{222}$  en la solución de  $[^{18}F]$  (7) final inyectable. El radiotrazador fue radioquímicamente estable a temperatura ambiente durante al menos 6 horas después de la preparación. El coeficiente de reparto de octanol/agua (tampón PBS) (logD) para  $[^{18}F]$  (7) fue de  $2,22 \pm 0,03$ .

**[0110]** Algunos de los compuestos de la invención han sido objeto de ensayos farmacológicos descritos a continuación.

#### **EJEMPLO 10: EXPERIMENTACIÓN DE FARMACOLOGÍA**

##### **10.1 Evaluación de la biodistribución de $[^{18}F]$ 1, $[^{18}F]$ 5 y $[^{18}F]$ 7 en el modelo primario del melanoma**

###### **10.1.1 Protocolos experimentales.**

**[0111]** Se realizaron todos los estudios según las directrices francesas y de la Comunidad Económica Europea (86-809, CEE) para el cuidado de animales de laboratorio. Los protocolos se realizaron bajo la autorización de la Dirección francesa de Servicios Veterinarios (autorización No. CE 86-12). Los ratones macho C57BL/6J eran originarios de los laboratorios Charles River y se mantuvieron a 21°C con un ciclo de 12 h/12 h luz/oscuridad, alimentados con una dieta de reproducción (dieta A04 de Safe, Villemoisson, Francia) y recibieron agua ad libitum. Para el trasplante, se hizo crecer una suspensión de células B16BL6 en un cultivo en monocapa hasta confluencia, después de lo cual se tripsinizaron las células, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en PBS. Los ratones fueron anestesiados mediante inhalación con isoflurano (4% para la inducción y  $2 \pm 0,5\%$  para el mantenimiento en el flujo de oxígeno). El modelo de tumor primario fue inducido por inyección subcutánea de  $3 \times 10^6$  células de melanoma B16BL6 en 0,1 ml en el hombro derecho de los ratones.

**[0112]** Las exploraciones por PET de cuerpo entero se adquirieron 1 h después de la inyección en bolo de  $9 \pm 12$  MBq del compuesto de  $[^{18}F]$  apropiado en un volumen de 0,15 ml a través de la vena de la cola. Los ratones fueron anestesiados por administración intraperitoneal (i.p.) (200  $\mu$ l/ratón) de una mezcla de ketamina-xilazina en solución salina: ketamina (100 mg/kg, Imalgene™, Rhone Mérieux, Lyon, Francia) y xilazina (10 mg/kg, Rompun™, Bayer, Francia) antes de la inyección del radiotrazador y se obtuvieron imágenes mediante el uso de un dispositivo de PET para animales pequeños, instrumento eXplore Vista microPET (GE Healthcare). Las imágenes por PET fueron adquiridas utilizando el modo estático durante 20 min. Los datos obtenidos fueron reconstruidos usando el algoritmo de maximización de la expectativa ordenada en subconjuntos bidimensional (OSEM) y se corrigió de la desviación, dispersión y variables aleatorias. No se aplicaron correcciones de volumen parcial o atenuación.

**[0113]** La captación del trazador regional se cuantificó mediante análisis estándar de la región de interés (ROI) con

el paquete de software eXplore Vista. Se dibujó un 2D-ROI manual alrededor del tumor en cada segmento en el que el tumor era visible, y en varios planos coronales posteriores que contenían tejido muscular en la extremidad anterior. Los resultados se expresan por el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

**[0114]** Estudios de biodistribución *ex vivo*: Se realizó un estudio de biodistribución *ex vivo* para una mejor comparación de [<sup>18</sup>F](**1**) y [<sup>18</sup>F](**5**). Se llevaron a cabo experimentos en el día 10 o el día 14 después de la inoculación de células (n = 3-6/grupo). Los animales fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub> 1 h después de la inyección i.v. del compuesto marcado con [<sup>18</sup>F] (9-12 MBq). Los tumores y los principales órganos y tejidos se extirparon rápidamente, se recogieron, se pesaron y se contó su radiactividad usando un contador  $\gamma$  calibrado con una ventana de energía de 400 a 600 keV. Después de la corrección de descomposición radiactiva, los resultados se expresaron como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

**[0115]** Estudio de estabilidad de [<sup>18</sup>F]**1** en extractos *ex vivo*: Se inyectaron intravenosamente seis ratones portadores de melanoma primario con 18 MBq de [<sup>18</sup>F](**1**) y se sacrificaron 30 minutos, 1 hora y 2 horas después de la inyección del trazador. Para determinar la estabilidad metabólica de [<sup>18</sup>F](**1**) se recogieron muestras de sangre, tumor, ojos, hígado y orina. La sangre se centrifugó inmediatamente durante 5 min a 3.000 rpm y el plasma se analizó directamente mediante HPLC analítica. Otros órganos se agruparon y se homogeneizaron usando disociador GentleMACS™ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), se suspendieron en 5 ml de metanol/NH<sub>4</sub>OH 99,8:0,2 y se centrifugaron durante 5 min a 3.000 rpm. La eficacia de la extracción se determinó midiendo la radiactividad de los sobrenadantes y precipitados. Los sobrenadantes se pasaron a través de un filtro Millipore de 0,22  $\mu$ m y después se concentró hasta un volumen entre 200 y 500  $\mu$ l antes de la inyección (por duplicado) en HPLC analítica (Waters Symmetry® C18; elución en gradiente: 60% a 90% de MeOH (NH<sub>4</sub>OH al 0,4%) en agua (NH<sub>4</sub>OH al 0,4%) (10 min), a continuación 60% durante 7 min).

#### **10.1.2 Resultados de la biodistribución**

**[0116]** La formación de imágenes por PET se realizó 1 hora después de la inyección de trazadores en ratones portadores de tumores B16BL6 en el día 15 después de la inoculación de células tumorales.

**[0117]** Formación de imágenes por PET con [<sup>18</sup>F](**1**): Los resultados mostraron que [<sup>18</sup>F](**1**) se captó rápidamente y se acumuló en el tumor con una captación de  $14,33 \pm 2,11\%$  ID/g (n = 8). Se observó también una elevada captación de trazador en otros tejidos melanóticos, tales como ojos ( $10,50 \pm 2,95\%$  ID/g, n = 8) y el bazo pigmentada ( $7,38 \pm 0,73\%$  ID/g, n = 4) de acuerdo con la especificidad de melanina de este radiotrazador. También se observó una señal radiactiva significativa en la vejiga lo que indica una eliminación rápida por la excreción urinaria y también en el intestino ( $4,07 \pm 1,39\%$  ID/g; n = 6) lo que indica una eliminación fecal parcial. Por el contrario, la actividad en los tejidos no diana, tales como músculos, mostraron una eliminación rápida a 1 h p.i. ( $1,37 \pm 0,37\%$  ID/g, n = 8).

**[0118]** Formación de imágenes por PET con [<sup>18</sup>F](**5**): Los resultados mostraron que la captación de tumor con [<sup>18</sup>F](**5**) fue notablemente menor que la de [<sup>18</sup>F](**1**) ( $6,63 \pm 1,64\%$  ID/g (n = 3)). Se observó también una elevada captación de trazador en otros tejidos melanóticos, tales como ojos ( $5,53 \pm 1,35\%$  ID/g; n = 3) y en el tracto gastrointestinal. Por el contrario, la actividad en los tejidos no diana, tales como músculos, mostraron una eliminación rápida a 1 h p.i. ( $1,01 \pm 0,09\%$  ID/g, n = 3).

**[0119]** Formación de imágenes por PET con [<sup>18</sup>F](**7**): Los resultados mostraron que la captación de [<sup>18</sup>F](**7**) fue de  $14,55\%$  ID/g (n = 1) en el tumor y  $0,84\%$  ID/g (n = 1) en el músculo. En cuanto a [<sup>18</sup>F](**1**), también se observó una rápida eliminación de órganos no diana.

La Figura 1 muestra la formación de imágenes por PET de tres ratones portadores de tumores B16BL6 realizadas en el día 15, 1h después de la inyección de [<sup>18</sup>F](**1**) (a), [<sup>18</sup>F](**5**) (b) o [<sup>18</sup>F](**7**) (c). Se indican el tumor (T), el tracto gastrointestinal (GIT), el estómago (S) y la vejiga (B).

**[0120]** Los compuestos [<sup>18</sup>F](**1**) y [<sup>18</sup>F](**5**) fueron estudiados en experimentos de biodistribución *ex vivo* mediante el muestreo directo de tumores y tejidos de interés en 1 hora, 2 horas y 3 horas después de la inyección del trazador. Las captaciones en los tejidos pigmentados fueron similares a las obtenidas por las imágenes de PET en 1 h p.i. y se mantuvo alta y estable hasta las 3 h p.i. para ambas moléculas (es decir, la captación tumoral a las 3 h p.i. fue  $11,55 \pm 1,24\%$  ID/g para [<sup>18</sup>F](**1**) y  $6,76 \pm 1,35\%$  ID/g para [<sup>18</sup>F](**5**)). Además, se observó una mejor captación tumoral para [<sup>18</sup>F](**1**) en comparación con [<sup>18</sup>F](**5**), en todos los puntos de tiempo. Las acumulaciones muy bajas de trazadores en el músculo y la sangre llevaron a proporciones elevadas de tumor respecto a músculo y tumor respecto a sangre alcanzando valores de  $14,46 \pm 3,06$  y  $14,43 \pm 1,75$ , respectivamente, para [<sup>18</sup>F](**5**) y valores de  $6,64 \pm 2,69$  y  $5,27 \pm 0,20$ , respectivamente, para [<sup>18</sup>F](**5**) a las 3 h p.i. Se observaron bajas captaciones en los huesos a 1 h p.i. ( $1,40 \pm 0,10\%$  ID/g para [<sup>18</sup>F](**1**) y  $1,82 \pm 0,55\%$  ID/g para [<sup>18</sup>F](**5**)). Las desfluoraciones parciales *in vivo* de [<sup>18</sup>F](**1**) y [<sup>18</sup>F](**5**) se produjeron a 3 h p.i., que no se correlacionaban con la estabilidad *in vitro* en solución salina (RCP > 99% durante al menos 6 h).

Tabla 1: Biodistribución *ex vivo* de [<sup>18</sup>F](**1**) y [<sup>18</sup>F](**5**) en ratones C57BL/6J con tumores de melanoma murino B16 a 1 h, 2 h y 3 h p.i. Los datos se expresan como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g)  $\pm$  SD (n = 5-6).

| % ID/g            | <sup>[18F]</sup> (1) |              |              | <sup>[18F]</sup> (5) |               |               |
|-------------------|----------------------|--------------|--------------|----------------------|---------------|---------------|
|                   | 1 h (n=5)            | 2 h (n=6)    | 3 h (n=5)    | 1 h (n=6)            | 2 h (n=5)     | 3 h (n=6)     |
| Tumor             | 14,05 ± 1,42         | 13,07 ± 1,22 | 11,55 ± 1,24 | 9,81 ± 2,96          | 5,81 ± 1,37   | 6,76 ± 1,35   |
| Músculo           | 1,17 ± 0,12          | 0,92 ± 0,15  | 0,81 ± 0,10  | 1,07 ± 0,35          | 1,04 ± 0,24   | 1,11 ± 0,34   |
| Ojos              | 18,36 ± 4,74         | 18,17 ± 3,15 | 17,96 ± 2,73 | 12,24 ± 4,39         | 12,10 ± 1,85  | 13,43 ± 2,17  |
| Huesos            | 1,40 ± 0,10          | 1,96 ± 0,51  | 3,27 ± 0,70  | 1,82 ± 0,55          | 2,13 ± 0,19   | 3,61 ± 1,12   |
| Sangre            | 1,42 ± 0,32          | 1,12 ± 0,24  | 0,80 ± 0,07  | 1,15 ± 0,19          | 1,37 ± 0,30   | 0,99 ± 0,20   |
| Piel              | 1,44 ± 0,19          | 1,51 ± 0,53  | 1,05 ± 0,12  | 1,22 ± 0,22          | 0,94 ± 0,51   | 1,47 ± 0,49   |
| Hígado            | 2,56 ± 0,22          | 1,88 ± 0,34  | 1,99 ± 0,45  | 2,02 ± 0,19          | 2,31 ± 0,64   | 2,60 ± 1,37   |
| Estómago          | 4,41 ± 1,36          | 2,48 ± 0,88  | 2,81 ± 2,23  | 5,87 ± 3,32          | 7,35 ± 4,79   | 5,39 ± 3,13   |
| Intestino delgado | 7,58 ± 1,80          | 4,28 ± 1,18  | 3,91 ± 1,05  | 16,68 ± 7,93         | 19,51 ± 5,43  | 18,62 ± 13,65 |
| Ciego             | 7,27 ± 0,62          | 8,94 ± 1,78  | 10,79 ± 1,54 | 6,37 ± 4,84          | 12,10 ± 10,31 | 29,31 ± 17,94 |
| Colon+heces       | 7,17 ± 2,93          | 6,05 ± 1,72  | 8,09 ± 5,04  | 7,39 ± 1,36          | 8,14 ± 1,78   | 12,63 ± 7,83  |
| Riñón             | 3,46 ± 0,53          | 2,18 ± 0,43  | 2,19 ± 0,36  | 3,60 ± 1,74          | 3,52 ± 1,02   | 2,60 ± 1,69   |
| Bazo              | 3,72 ± 1,49          | 2,88 ± 2,11  | 1,87 ± 0,38  | 2,35 ± 0,91          | 2,38 ± 0,87   | 2,35 ± 0,98   |
| Páncreas          | 2,09 ± 0,42          | 1,33 ± 0,28  | 1,33 ± 0,35  | 2,63 ± 1,33          | 1,56 ± 0,38   | 1,81 ± 0,66   |
| Pulmón            | 1,86 ± 0,15          | 1,65 ± 0,11  | 1,60 ± 0,09  | 1,75 ± 0,18          | 1,72 ± 0,72   | 2,37 ± 0,67   |
| Corazón           | 2,72 ± 0,18          | 2,14 ± 0,33  | 2,32 ± 0,50  | 1,58 ± 0,24          | 1,70 ± 0,24   | 3,00 ± 1,12   |
| Cerebro           | 1,82 ± 0,08          | 1,39 ± 0,25  | 1,37 ± 0,35  | 1,03 ± 0,18          | 1,03 ± 0,10   | 1,72 ± 0,67   |
| <b>Proporción</b> |                      |              |              |                      |               |               |
| TMR <sup>a</sup>  | 12,12 ± 2,29         | 14,46 ± 2,62 | 14,46 ± 3,06 | 9,48 ± 2,41          | 5,75 ± 1,45   | 6,64 ± 2,69   |
| TBR <sup>b</sup>  | 10,24 ± 2,83         | 12,19 ± 3,32 | 14,43 ± 1,75 | 8,29 ± 2,87          | 4,01 ± 1,12   | 5,27 ± 0,20   |
| TBoR <sup>c</sup> | 10,11 ± 1,87         | 7,13 ± 2,21  | 3,70 ± 1,17  | 5,35 ± 0,82          | 2,75 ± 0,80   | 2,16 ± 1,15   |

<sup>a</sup>Proporción de tumor respecto a músculo; <sup>b</sup>Proporción de tumor respecto a sangre; <sup>c</sup>Proporción de tumor respecto a hueso

Tabla 2: <sup>[18F]</sup>(1) Estudio de estabilidad en extractos ex vivo

| % <sup>[18F]</sup> (1) no cambiado |        | 30 min | 1 h  | 2 h  |
|------------------------------------|--------|--------|------|------|
| Negro                              | Sangre | 15,2   | n.d. | n.d. |
|                                    | Tumor  | n.d.   | >99  | 100  |
|                                    | Ojos   | n.d.   | 100  | >99  |
|                                    | Hígado | n.d.   | <10  | <20  |
|                                    | Orina  | n.d.   | 0,1  | 0,0  |
| Desnudo                            | Sangre | 3,0    | n.d. | n.d. |
|                                    | Tumor  | n.d.   | >99  | >99  |
|                                    | Hígado | n.d.   | n.d. | <10  |
|                                    | Orina  | n.d.   | 2,7  | 1,4  |

## 10.2. Evaluación de la <sup>[18F]</sup>(1), biodistribución en el modelo primario de modelos de melanoma humano

### 10.2.1. Protocolo experimental.

[0121] Los protocolos se realizaron bajo la autorización de la Dirección Francesa de Servicios Veterinarios (autorización no. CE 86-12). Los ratones hembra desnudos Swiss (6 semanas de edad) eran originarios de los laboratorios Charles River y se mantuvieron a 21°C con un ciclo de 12 h/12 h luz/oscuridad, alimentados con una dieta de reproducción (dieta A04 de Safe, Villemoisson, Francia) y recibieron agua ad libitum. Para el trasplante, se hizo crecer una suspensión de células en un cultivo en monocapa hasta confluencia, después de lo cual se tripsinizaron las células, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en PBS. Los ratones fueron anestesiados mediante inhalación con isoflurano (4% para la inducción y 2 ± 0,5% para el mantenimiento en el flujo de oxígeno). El modelo de tumor primario fue inducido por inyección subcutánea de 3x10<sup>6</sup> células de melanoma SKMEL-3 (línea celular pigmentada) o A375 (línea celular no pigmentada) en 0,1 ml en el hombro derecho de los ratones.

[0122] Las exploraciones por PET de cuerpo entero se adquirieron 1 h después de la inyección en bolo de ~ 10 MBq de <sup>[18F]</sup>(1) en un volumen de 0,15 ml a través de la vena de la cola. Los ratones fueron anestesiados por administración intraperitoneal (i.p.) (200 µl/ratón) de una mezcla de ketamina-xilazina en solución salina: ketamina (100 mg/kg, Imalgene<sup>TM</sup>, Rhone Mérieux, Lyon, Francia) y xilazina (10 mg/kg, Rompun<sup>TM</sup>, Bayer, Francia) antes de la inyección del radiotrazador y se obtuvieron imágenes mediante el uso de un dispositivo de PET para animales pequeños, instrumento eXplore Vista microPET (GE Healthcare). Las imágenes por PET fueron adquiridas utilizando el modo estático durante 20 min. Los datos obtenidos fueron reconstruidos usando el algoritmo de maximización de la expectativa ordenada en subconjuntos bidimensional (OSEM) y se corrigió de la desviación, dispersión y variables aleatorias. No se aplicaron correcciones de volumen parcial o atenuación.

[0123] La captación del trazador regional se cuantificó mediante análisis estándar de la región de interés (ROI) con el paquete de software eXplore Vista. Se dibujó un 2D-ROI manual alrededor del tumor en cada segmento en el que el tumor era visible, y en varios planos coronales posteriores que contenían tejido muscular en la extremidad anterior. Los resultados se expresan por el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

### **10.2.2. Resultados de biodistribución**

[0124] La formación de imágenes por PET se realizó 1 hora después de la inyección de trazadores en ratones portadores de los tumores SKMEL-3 y A375 en el día 27 y el día 23 después de la inoculación, respectivamente.

[0125] Los resultados mostraron que [ $^{18}\text{F}$ ](1) se captó rápidamente y se acumuló en el tumor con una captación de  $4,65 \pm 1,07\%$  ID/g ( $n = 4$ ) en tumores SKMEL-3, mientras que se observó una baja acumulación de trazador en los tumores A375 no pigmentadas ( $1,87 \pm 0,34\%$  ID/g ( $n = 4$ )) de acuerdo a la especificidad de la melanina de este radiotrazador.

[0126] También se observó una señal radiactiva significativa en la vejiga y el intestino indicando una rápida eliminación mediante excreción urinaria y eliminación fecal. Por el contrario, la actividad en los tejidos no diana, tales como los músculos, mostraron una eliminación rápida en 1 hora p.i. ( $1,34 \pm 0,42\%$  ID/g para los ratones portadores de tumores SKMEL-3 y  $1,14 \pm 0,28\%$  ID/g para ratones portadores de un tumor A375).

[0127] Figura 2 muestra la formación de imágenes por PET de ratones portadores de tumores B16BL6 (A), ratones portadores de tumores SKMEL-3 (b) y ratones portadores de tumores A375 (c) realizadas en el día 15, el día 27 y el día 22, respectivamente, 1 h después de la inyección de [ $^{18}\text{F}$ ](1). Se indican el tumor, el tracto gastrointestinal (GIT) y la vejiga (B).

### **10.3. Evaluación de la biodistribución de [ $^{125}\text{I}$ ]1, [ $^{125}\text{I}$ ]5 y [ $^{125}\text{I}$ ]7 en el modelo primario del melanoma**

#### **10.3.1 Protocolo experimental.**

[0128] Los protocolos se realizaron bajo la autorización de la Dirección Francesa de Servicios Veterinarios (autorización No. C63-113-10) y se llevó a cabo bajo la supervisión de investigadores autorizados de conformidad con las recomendaciones de la institución para el uso de animales de laboratorio. Los animales fueron manipulados y cuidados según las directrices para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Research Council, 1996) y la Directiva Europea 86/609/CEE.

[0129] Se obtuvieron ratones C57BL/6J macho (6-8 semanas de edad) de Charles River (L'Arbresle, Francia) y el melanoma B16F0 singénico de ATCC (No. CRL-6322). El modelo de melanoma primario fue inducido mediante inyección subcutánea de células de melanoma murino B16F0 en ratones C57BL/6J. Los cultivos de células de melanoma B16F0 se mantuvieron como monocapas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/Glutamax (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) suplementado con suero fetal de ternera al 10% (Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia), vitaminas al 1% (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen), aminoácidos no esenciales al 1% (Invitrogen), y 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de base de gentamicina (Invitrogen). Las células se cultivaron a 37°C en un incubador humidificado que contenía 5% de  $\text{CO}_2$ . Para el trasplante, se tripsinizaron las células en fase de crecimiento exponencial, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se resuspendieron en PBS. Los ratones C57BL/6J anestesiados por inhalación de isoflurano (2%) fueron inoculados con  $3 \times 10^5$  células de melanoma B16F0 en 0,1 ml de PBS mediante inyección subcutánea en el flanco derecho.

#### **10.3.2. Formación de imágenes escintigráficas *in vivo***

[0130] El protocolo de formación de imágenes escintigráficas *in vivo* fue presentado y aprobado por el comité ético regional francés del uso de animales (CEMEA, Auvergne, autorización. No. CE18-09, 2010). La formación de imágenes escintigráficas de compuestos radioyodados en ratones se llevó a cabo utilizando una cámara gamma dedicada a la formación de imágenes de pequeños animales (γIMAGER, Biospace Mesures, París, Francia). Esta cámara consiste en un fotomultiplicador sensible a la posición R 3292 Hamamatsu que tiene un cristal continuo de CsI (Na) de 4 mm de grosor x 120 mm de diámetro que conduce a un campo de 10 cm de visión. Para la formación de imágenes con  $^{125}\text{I}$ , la cámara estaba equipada con un colimador de agujeros paralelos 1,8/0,2/20 (diámetro del agujero/grosor del séptum/altura en mm). Todas las adquisiciones se realizaron con una ventana del 15% centrada en el pico de 35 keV de  $^{125}\text{I}$ .

[0131] El día 14 después de la implantación del tumor, cada compuesto marcado con [ $^{125}\text{I}$ ] se administró por vía intravenosa a través de la vena de la cola con 3,7 MBq/ratón (rango de 3 - 8 animales/compuestos). La actividad inyectada a cada ratón también se determinó a partir de imágenes escintigráficas de la jeringa antes y después de la inyección del radiotrazador. En diferentes puntos de tiempo después de la administración (1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 72 h, 5 d, 7 d, 10 d y 14 d), los ratones se anestesiaron por administración i.p. (200  $\mu\text{l}$ /ratón) de una mezcla de ketamina-xilazina en solución salina: ketamina (100 mg/kg, Imalgene, Rhone Merieux, Lyon, Francia) y xilazina (10 mg/kg,

Rompun, Bayer, Francia). Se adquirió una imagen de duración de 10 min en ratones anestesiados colocados en posición de decúbito prono sobre el colimador de la cámara. La reproducibilidad en el posicionamiento de los animales para las imágenes en serie se logró mediante un sistema de referencia graduado.

- 5 **[0132]** El análisis cuantitativo de las exploraciones escintigráficas se realizó utilizando el software de GAMMAVISION+ (Biospace Mesures, París, Francia). Las regiones de interés (ROI) se dibujaron manualmente alrededor del tumor, toda la zona del cuerpo, la vejiga, los ojos, las glándulas submaxilares y de la tiroides y el
- 10 músculo contralateral que fue elegido como base. Para cada ROI, se obtuvieron la actividad total, valores de píxeles min y max, tamaño de ROI (en mm<sup>2</sup>), la actividad promedio por mm<sup>2</sup> y la desviación estándar. Estos valores se normalizaron a la actividad inyectada. Para el tumor, la actividad también se normalizó al peso del tumor como se describió previamente (Miot-Noirault, Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals, 24 (2009) 629-636) y se expresó como el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tumor (% ID/gramo).

- 15 Tabla 3: Captación de radiactividad en los tumores B16F0 de melanoma en diferentes puntos temporales después de la inyección i.v. de radiotrazadores marcados con yodo-125 en ratones C57BL/6J. Los valores de concentración radiactiva se calcularon a partir de imágenes escintigráficas planas

| % ID/g (tumor)       | 1 h                 | 3 h                 | 6 h                 | 24 h                | 72 h                | 5 d                | 7 d                | 10 d               | 14 d                |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| [ <sup>125</sup> I]5 | 6,8 ± 1,8<br>n = 4  | 7,8 ± 1,5<br>n = 4  | 7,2 ± 1,1<br>n = 4  | 6,8 ± 1,7<br>n = 4  | 3,8 ± 0,7<br>n = 4  | 2,7 ± 0,3<br>n = 4 | 1,5 ± 0,2<br>n = 3 | 0,8 ± 0,3<br>n = 3 | 0,3 ± 0,01<br>n = 2 |
| [ <sup>125</sup> I]7 | 13,0 ± 1,5<br>n = 3 | 14,5 ± 0,1<br>n = 3 | 15,9 ± 1,7<br>n = 3 | 15,6 ± 3,4<br>n = 3 | 11,0 ± 0,7<br>n = 3 | 8,6 ± 0,4<br>n = 3 | 5,3 ± 0,8<br>n = 3 | 3,7 ± 0,3<br>n = 3 | 1,8 ± 0,4<br>n = 3  |
| [ <sup>125</sup> I]3 | 11,7 ± 2,2<br>n = 8 | 12,1 ± 1,7<br>n = 7 | 12,1 ± 1,9<br>n = 7 | 12,4 ± 2,3<br>n = 7 | 8,6 ± 3,6<br>n = 7  | 5,8 ± 2,4<br>n = 7 | 2,7 ± 0,8<br>n = 7 | 1,3 ± 0,4<br>n = 7 | 0,6 ± 0,3<br>n = 7  |

### 10.3.3. Estudio de biodistribución ex vivo para el compuesto [<sup>125</sup>I](1)

- 20 **[0133]** Se inyectaron por vía intravenosa veinticuatro ratones portadores de melanoma primario B16BL6 con 2,2 MBq de [<sup>125</sup>I]1 y se sacrificaron 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 72 h y 10 días después de la inyección del trazador (n = 4/punto de tiempo). Los tumores y los principales órganos y tejidos se extirparon rápidamente, se recogieron, se pesaron y se contó su radiactividad usando un contador  $\gamma$  calibrado con una ventana de energía de 400 a 600 keV. Después de
- 25 la corrección de la desintegración radiactiva, los resultados se expresaron como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

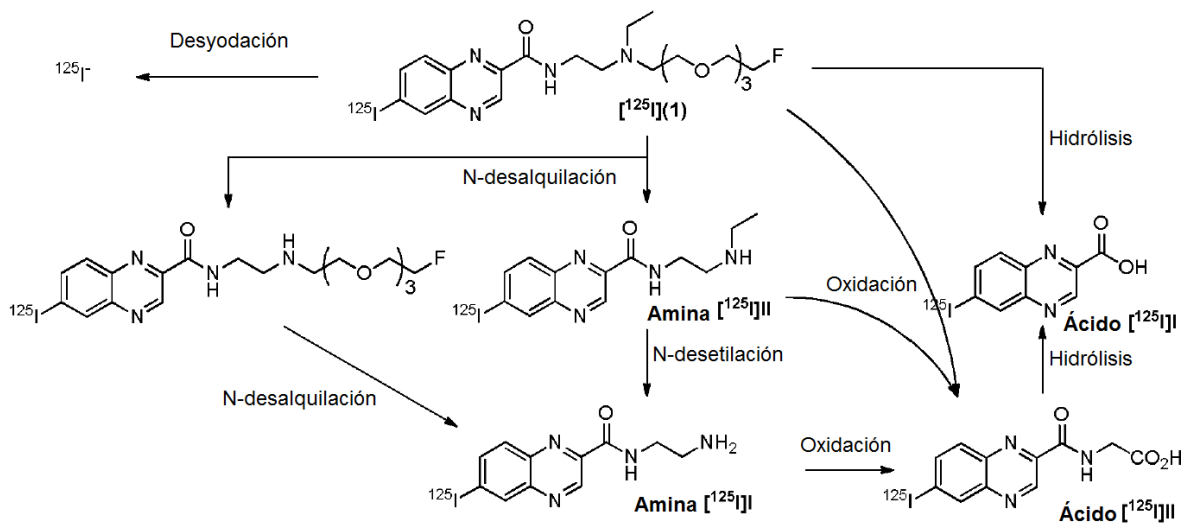
- 30 Tabla 4: Biodistribución ex vivo de [<sup>125</sup>I]1 en ratones C57BL/6J portadores de tumores de melanoma murino B16 a 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 72 h y 10 días p.i. Los datos se expresan como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) ± SD (n = 4/punto de tiempo).

| Órganos           | 1 h           | 3 h           | 6 h           | 24 h         | 72 h         | 10 d        |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|-------------|
| Sangre            | 0,97 ± 0,07   | 0,82 ± 0,05   | 0,62 ± 0,20   | 0,06 ± 0,01  | 0,03 ± 0,01  | 0,00 ± 0,00 |
| Tumor             | 11,99 ± 3,52  | 17,69 ± 1,10  | 12,04 ± 4,39  | 10,47 ± 3,22 | 8,74 ± 0,38  | 1,20 ± 0,54 |
| Ojos              | 15,01 ± 4,84  | 15,48 ± 2,57  | 17,40 ± 2,21  | 20,30 ± 6,08 | 14,87 ± 1,18 | 9,97 ± 2,24 |
| Hígado            | 6,33 ± 1,69   | 3,37 ± 0,14   | 2,02 ± 0,64   | 0,46 ± 0,10  | 0,08 ± 0,00  | 0,01 ± 0,00 |
| Riñón             | 4,75 ± 0,71   | 3,14 ± 1,27   | 1,56 ± 0,82   | 0,15 ± 0,02  | 0,24 ± 0,04  | 0,04 ± 0,03 |
| Piel              | 1,04 ± 0,06   | 1,34 ± 0,72   | 0,62 ± 0,31   | 0,17 ± 0,00  | 0,50 ± 0,26  | 0,05 ± 0,06 |
| Adiposo           | 0,61 ± 0,01   | 0,36 ± 0,05   | 0,19 ± 0,06   | 0,028 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00  | 0,01 ± 0,01 |
| Músculo           | 0,55 ± 0,16   | 0,30 ± 0,04   | 0,17 ± 0,07   | 0,02 ± 0,00  | 0,02 ± 0,00  | 0,01 ± 0,06 |
| Huesos            | 0,79 ± 0,09   | 0,48 ± 0,03   | 0,30 ± 0,10   | 0,03 ± 0,00  | 0,02 ± 0,01  | 0,01 ± 0,01 |
| Colon             | 4,51 ± 4,40   | 21,19 ± 18,02 | 15,92 ± 9,97  | 0,69 ± 0,23  | 0,25 ± 0,10  | 0,02 ± 0,01 |
| Ciego             | 4,97 ± 3,01   | 25,73 ± 7,88  | 23,31 ± 16,47 | 0,41 ± 0,13  | 0,33 ± 0,29  | 0,02 ± 0,02 |
| Intestino delgado | 16,68 ± 10,70 | 4,16 ± 0,70   | 2,23 ± 1,35   | 0,12 ± 0,03  | 0,07 ± 0,03  | 0,01 ± 0,00 |
| Estómago          | 9,2 ± 1,49    | 4,53 ± 0,94   | 7,39 ± 4,08   | 0,54 ± 0,25  | 0,16 ± 0,05  | 0,03 ± 0,01 |
| Bazo              | 2,14 ± 0,20   | 2,37 ± 2,58   | 6,45 ± 8,15   | 0,06 ± 0,01  | 0,52 ± 0,96  | 0,23 ± 0,41 |
| Páncreas          | 2,96 ± 0,15   | 1,48 ± 0,07   | 0,65 ± 0,18   | 0,05 ± 0,01  | 0,03 ± 0,01  | 0,02 ± 0,03 |
| Pulmón            | 3,12 ± 0,42   | 2,14 ± 0,27   | 1,04 ± 0,37   | 0,08 ± 0,01  | 0,05 ± 0,01  | 0,01 ± 0,01 |
| Corazón           | 1,17 ± 0,07   | 0,77 ± 0,05   | 0,46 ± 0,17   | 0,16 ± 0,06  | 0,08 ± 0,02  | 0,03 ± 0,01 |
| Cerebro           | 0,27 ± 0,03   | 0,15 ± 0,01   | 0,08 ± 0,03   | 0,01 ± 0,01  | 0,01 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00 |
| Testículos        | 0,68 ± 0,19   | 0,54 ± 0,03   | 0,36 ± 0,08   | 0,03 ± 0,01  | 0,02 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00 |

### 10.3.4 Metabolismo del compuesto [<sup>125</sup>I](1)

**[0134]** Se inyectaron por vía intravenosa 24 ratones portadores de melanoma primario con 2,2 MBq de [ $^{125}$ I](**1**) y se sacrificaron 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 72 h y 10 días después de la inyección del trazador. Para determinar la estabilidad metabólica de [ $^{125}$ I](**1**), se recogieron muestras de sangre, tumor, ojos, hígado, riñón y orina en cada punto de tiempo (n = 3). Las heces se recogieron entre 0-24 h y 24-48 h. La sangre se diluyó inmediatamente en 5 ml de metanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$  99,8:0,2 y se centrifugó durante 5 min a 3.000 rpm. El tumor, ojos, hígado, riñones y heces se suspendieron en 5 ml de metanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$  99,8:0,2, se homogeneizaron usando disociador GentleMACS<sup>TM</sup> (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), y se centrifugaron durante 5 min a 3.000 rpm (repetido dos veces). La orina se analizó sin ningún tratamiento. La eficacia de la extracción se determinó midiendo la radiactividad de los sobrenadantes y precipitados. Los sobrenadantes se pasaron a través de un filtro Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  y después se concentraron hasta un volumen entre 200 y 500  $\mu\text{l}$  antes de la inyección (por duplicado) en HPLC analítica (columna C18; disolvente A:  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{NH}_4\text{OH}$  al 0,2%); disolvente B:  $\text{MeOH}$  ( $\text{NH}_4\text{OH}$  al 0,2%); elución en gradiente: 0-5 min: 90 a 70% de A ( $Q = 0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ); 5-30 min: 70 a 20% de A ( $Q = 0,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ); 30-32 min: 10% de A ( $0,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )).

**[0135]** El mecanismo metabólico *in vivo* se presenta a continuación.



**[0136]** [ $^{125}$ I](**1**) no cambiado, [ $^{125}$ I]ácidos I y II, [ $^{125}$ I]aminas I y II y [ $^{125}$ I]<sup>-</sup> fueron identificados y cuantificados tal como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 5

| % de radioactividad                   | 1 h        | 3 h        | 6 h        | 24 h       | 72 h       | 10 d        |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| Ojos                                  |            |            |            |            |            |             |
| [ $^{125}$ I]( <b>1</b> ) no cambiado | 90,5 ± 0,7 | 94,5 ± 2,1 | 96,0 ± 5,7 | 90,0 ± 2,8 | 96,5 ± 4,9 | 100,0 ± 0,0 |
| [ $^{125}$ I] <sup>-</sup>            | 9,5 ± 0,7  | 5,5 ± 2,1  | 4,0 ± 5,7  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0   |
| Tumor                                 |            |            |            |            |            |             |
| [ $^{125}$ I]( <b>1</b> ) no cambiado | 87,0 ± 1,4 | 81,0 ± 1,4 | 77,0 ± 0,0 | 92,5 ± 9,2 | 91,5 ± 3,5 | 100,0 ± 0,0 |
| [ $^{125}$ I] <sup>-</sup>            | 13,0 ± 1,4 | 6,5 ± 0,7  | 9,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0   |
| Hígado                                |            |            |            |            |            |             |
| [ $^{125}$ I]( <b>1</b> ) no cambiado | 27,5 ± 0,7 | 24,0 ± 4,2 | 8,5 ± 0,7  | 0,0 ± 0,0  | n.d.       | n.d.        |
| Amina [ $^{125}$ I]I                  | 26,0 ± 0,0 | 45,5 ± 2,1 | 55,0 ± 2,8 | 70,5 ± 0,7 | n.d.       | n.d.        |
| [ $^{125}$ I] <sup>-</sup>            | 20,0 ± 1,4 | 21,5 ± 4,9 | 29,5 ± 0,7 | 29,5 ± 0,7 | n.d.       | n.d.        |
| Riñón                                 |            |            |            |            |            |             |
| [ $^{125}$ I]( <b>1</b> ) no cambiado | 12,5 ± 2,1 | 6,1 ± 2,9  | 0,0 ± 0,0  | n.d.       | n.d.       | n.d.        |
| Amina [ $^{125}$ I]I                  | 18,5 ± 0,7 | 11,7 ± 0,7 | 0,0 ± 0,0  | n.d.       | n.d.       | n.d.        |
| Ácido [ $^{125}$ I]I                  | 29,0 ± 1,4 | 34,2 ± 0,7 | 43,0 ± 1,4 | n.d.       | n.d.       | n.d.        |
| [ $^{125}$ I] <sup>-</sup>            | 20,5 ± 0,7 | 37,2 ± 2,2 | 57,0 ± 1,4 | n.d.       | n.d.       | n.d.        |

|                                                 |                     |                      |            |            |            |      |
|-------------------------------------------------|---------------------|----------------------|------------|------------|------------|------|
| Sangre<br>[ <sup>125</sup> I](1) no<br>cambiado | 2,0 ± 2,8           | 0,0 ± 0,0            | 3,5 ± 4,9  | n.d.       | n.d.       | n.d. |
| Ácido [ <sup>125</sup> I]I                      | 21,5 ± 2,1          | 11,5 ± 0,7           | 11,0 ± 0,0 | n.d.       | n.d.       | n.d. |
| [ <sup>125</sup> I]I-                           | 76,5 ± 0,7          | 88,5 ± 0,7           | 85,5 ± 4,9 | n.d.       | n.d.       | n.d. |
| Orina<br>[ <sup>125</sup> I](1) no<br>cambiado  | 12,6 ± 0,5          | 0,0 ± 0,0            | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | n.d. |
| Amina [ <sup>125</sup> I]I                      | 6,6 ± 0,6           | 13,0 ± 1,4           | 3,5 ± 4,9  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | n.d. |
| Ácido [ <sup>125</sup> I]I                      | 17,2 ± 3,1          | 20,0 ± 1,4           | 16,0 ± 1,4 | 3,5 ± 0,7  | 0,0 ± 0,0  | n.d. |
| Ácido [ <sup>125</sup> I]II                     | 30,3 ± 2,4          | 24,0 ± 0,0           | 21,0 ± 0,0 | 6,5 ± 0,7  | 0,0 ± 0,0  | n.d. |
| [ <sup>125</sup> I]I-                           | 25,7 ± 3,2          | 30,5 ± 0,7           | 51,0 ± 4,2 | 85,0 ± 1,4 | 99,0 ± 0,0 | n.d. |
| Heces<br>[ <sup>125</sup> I](1) no<br>cambiado  | 0-24 h<br>5,0 ± 0,0 | 24-48 h<br>2,5 ± 0,7 |            |            |            |      |
| Amina [ <sup>125</sup> I]I                      | 16,0 ± 0,0          | 14,0 ± 0,0           |            |            |            |      |
| Amina [ <sup>125</sup> I]II                     | 6,5 ± 0,7           | 2,5 ± 0,7            |            |            |            |      |
| Ácido [ <sup>125</sup> I]I                      | 7,5 ± 0,7           | 8,0 ± 1,4            |            |            |            |      |
| Ácido [ <sup>125</sup> I]II                     | 3,0 ± 0,0           | 3,5 ± 0,7            |            |            |            |      |
| [ <sup>125</sup> I]I-                           | 8,0 ± 0,0           | 27,0 ± 1,4           |            |            |            |      |
| n.d.: no determinado                            |                     |                      |            |            |            |      |

#### 10.4. Radioterapia interna con el compuesto [<sup>131</sup>I] (1)

##### 10.4.1 Protocolo experimental.

[0137] El compuesto (1) se marcó con yodo-131, a alta actividad específica, a partir del precursor de estannano correspondiente, tal como se describe en detalle en el ejemplo 8. El marcaje se realizó con un rendimiento radioquímico del 80% y una pureza radioquímica > 99 %. La actividad antitumoral del compuesto [<sup>131</sup>I](1) se evaluó en el modelo de melanoma B16BL6, (modelo de melanoma primario que muestra difusión pulmonar espontánea) después de dos inyecciones intravenosas de 20 MBq, en las etapas de los días 7 y 11 después de la inoculación. La actividad antitumoral del compuesto [<sup>131</sup>I](1) también se evaluó en el modelo de melanoma humano SKMEL-3 después de inyecciones de 25 MBq de [<sup>131</sup>I](1): Se utilizaron dos grupos de ratones que recibieron dos inyecciones en días 33 y 40 o tres inyecciones en los días 33, 40 y 47 después de la inoculación. Los resultados se compararon con el grupo control inyectado con solución salina.

##### 10.4.2 Resultados

[0138] Los estudios de terapia con radionucleidos dirigidos demostraron que [<sup>131</sup>I](1) era capaz de liberar una dosis alta de radiación a tumores de melanoma, induciendo una reducción significativa de la velocidad de crecimiento tumoral (tiempo de duplicación de 2,9 ± 0,5 días frente a 1,8 ± 0,3 días en los controles ( $p = 0,006$ ) para tumores B16BL6 y 26,5 ± 7,8 días frente a 11,0 ± 3,8 días en los controles ( $p < 0,0001$ ) para tumores SKMEL-3). Se observó un aumento en la mediana del tiempo de supervivencia en ratones portadores de B16BL6 tratados (27 días frente a 21 días en los controles  $p < 0,0001$ ), así como en ratones portadores de SKMEL-3 tratados (111 días frente a 74 días en los controles;  $p < 0,0001$ ). Además, la inhibición de la difusión de la metástasis se pudo demostrar en el modelo de melanoma B16BL6.

[0139] Figura 3. Efecto de [<sup>131</sup>I](1) sobre el crecimiento del tumor B16BL6 de melanoma murino. [<sup>131</sup>I](1) se administró a 20 MBq en el día 7 y día 11 después de la inoculación. Las flechas indican los días de tratamiento. Los datos de crecimiento tumoral se expresan como el porcentaje de cambio en el volumen del tumor con relación a la línea de base.

[0140] Figura 4. Efecto de [<sup>131</sup>I](1) sobre el crecimiento del tumor SKMEL-3 del melanoma humano. [<sup>131</sup>I](1) se administró a 25 MBq vez por semana durante 2 o 3 semanas. Los datos de crecimiento tumoral se expresan como el porcentaje de cambio en el volumen del tumor con relación a la línea de base.

#### 10.5. Cálculo de la dosis absorbida al tumor y los órganos

##### 10.5.1 Protocolo

[0141] Los cálculos de las dosis en base a la metodología de Dosis de Radiación en Medicina Interna (MIRD) se obtuvieron a partir de los datos cinéticos de [<sup>125</sup>I](1) en ratones C57BL/6J portadores del melanoma B16BL6 y se extrapolaron a [<sup>131</sup>I](1). La dosis absorbida se calculó para cada órgano utilizando la actividad acumulada, la constante de dosis de equilibrio de yodo 131, las fracciones de dosis absorbida calculadas según la naturaleza y la energía de sus emisiones, los volúmenes geométricos de los órganos y tumor y teniendo en cuenta las densidades

de tejido igual a 1 g.cm<sup>-3</sup>.

### 10.5.2 Resultados

5 [0142]

Tabla 6: Dosis liberada de los órganos proyectados

| Órganos             | Dosis para yodo-125 (Gy) | Dosis para yodo 131 (Gy) |                          |                              |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|
|                     |                          | Vida media efectiva (h)  | Vida media biológica (h) | Dosis liberada (Gy) -2 dosis |
| Sangre              | 0,16                     | 32,02                    | 27,45                    | 1,18                         |
| Tumor               | 10,74                    | 114,18                   | 71,67                    | 102,30                       |
| Ojos                | 51,55                    | 356,77                   | 125,03                   | 83,03                        |
| Hígado              | 0,67                     | 29,89                    | 25,87                    | 4,92                         |
| Riñón               | 0,58                     | 32,22                    | 27,60                    | 4,22                         |
| Piel                | 0,51                     | 60,79                    | 46,20                    | 3,35                         |
| Adiposo             | 0,10                     | 47,78                    | 38,28                    | 0,67                         |
| Músculo             | 0,08                     | 46,36                    | 37,36                    | 0,56                         |
| Huesos              | 0,07                     | 13,85                    | 12,92                    | 0,53                         |
| Estómago            | 1,20                     | 31,89                    | 27,36                    | 8,73                         |
| Intestinos delgados | 0,64                     | 26,99                    | 23,67                    | 4,74                         |
| Colon con heces     | 1,72                     | 26,92                    | 28,48                    | 12,80                        |
| Bazo                | 0,96                     | 33,43                    | 33,66                    | 6,98                         |
| Páncreas            | 0,26                     | 40,79                    | 29,04                    | 1,80                         |
| Pulmón              | 0,33                     | 34,21                    | 37,73                    | 2,36                         |
| Corazón             | 0,27                     | 46,93                    | 68,51                    | 1,84                         |
| Cerebro             | 0,03                     | 41,63                    | 27,55                    | 0,25                         |
| Testículos          | 0,10                     | 32,16                    | 27,57                    | 0,73                         |
| Vejiga (vacía)      | 1,17                     | 32,17                    | 27,57                    | 8,55                         |

## 10.6. Evaluación de la biodistribución del compuesto (1) mediante análisis de espectrometría de masas de iones secundarios

### 10.6.1 Protocolo experimental.

15 [0143] Se inyectaron por vía intravenosa células B16BL6 en ratones C57BL/6J macho para obtener, en 12 días, colonias de células tumorales en los pulmones que imitan las micrometástasis pulmonares. Después de la administración i.v. del compuesto (1) (0,1 µmol/ratones en 0,2 ml de una solución hidroalcohólica (5% v/v, 0,9% de NaCl) por ratón), los ratones se sacrificaron 1 h después de la inyección. Los pulmones se extrajeron y se aislaron pequeños trozos de tejido que incluían colonias del melanoma B16 y se fijaron mediante congelación sobre un espejo de metal de enfriado previamente con LN2. Las muestras se deshidrataron mediante liofilización partiendo de -110 hasta -10°C antes de sumergirse en resina Spurr. Las secciones en serie de 0,4 µm de grosor se depositaron sobre soportes de acero inoxidable para el análisis SIMS o sobre portaobjetos de vidrio para la observación por microscopía de luz.

### 25 10.6.2. Resultados del análisis SIMS

[0144] Figura 5: imágenes mediante espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) usadas para determinar la distribución del compuesto (1). SIMS permite la identificación directa de los elementos químicos con alta sensibilidad y especificidad y se puede aplicar para visualizar la distribución elemental (mapeo químico). Imágenes centradas en la colonia de células de melanoma B16BL6 1 h después de la inyección del compuesto (1). Las figuras 5b y 5c muestran la distribución de iones CN<sup>-</sup> y yodo-127 que revelan diversas estructuras de tejido en polímeros de melanina particulares. Además, la imagen histológica (a) reveló granos de melanina y clusters. Se observó la superposición de señales de CN<sup>-</sup> y yoduro-127, lo que indica una colocación perfecta del compuesto (1) con polímeros de melanina. Estos datos mostraron la colocación del compuesto (1) con melanina.

35 [0145] Figura 5. Imágenes SIMS centradas en una colonia de células de melanoma B16BL6 1 h después de la inyección del compuesto (1) (0,1 µmol/ratones). La imagen histológica se muestra en (a). CN<sup>-</sup> (b) e iones <sup>127</sup>I<sup>-</sup> (c).

## 40 EJEMPLO 11: Datos comparativos con respecto al compuesto 25 de WO2009/095872

### 11.1. Cuestiones comparativas sobre el aspecto de radiosíntesis

**[0146]** La síntesis del compuesto *N*-[2-[[*N*-etil-*N*-(2-fluoroetil)]amino]etil]-6-yodoquinoxalin-2-carboxamida (**25**) se describió en WO2009/095872 (ejemplo 4). Sin embargo, no se describieron datos farmacológicos en relación a la misma.

**[0147]** La radiofluoración de dicho compuesto comparativo (**25**) puede realizarse según el siguiente procedimiento de dos etapas, también descrito en el ejemplo típico 3:

La radiosíntesis de compuestos [<sup>18</sup>F](**1**), [<sup>18</sup>F](**5**) y [<sup>18</sup>F](**7**), tal como se describe en detalle en el ejemplo 9, se comparó con la síntesis del compuesto comparativo [<sup>18</sup>F](**25**). Se afirmó que la radiosíntesis de los compuestos [<sup>18</sup>F](**1**), [<sup>18</sup>F](**5**) y [<sup>18</sup>F](**7**) son más fáciles de realizar y que los rendimientos y tiempos de preparación son mejores.

|                                 | Tiempo de preparación               | Rendimiento radioquímico<br>(desintegración corregida) | Pureza radioquímica |
|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------|
| [ <sup>18</sup> F]( <b>25</b> ) | 110-130 min (proceso de dos etapas) | 6-10%                                                  | > 95%               |
| [ <sup>18</sup> F]( <b>1</b> )  | 57 min                              | 21%                                                    | > 99%               |
| [ <sup>18</sup> F]( <b>5</b> )  | 65 min                              | 34%                                                    | > 99%               |
| [ <sup>18</sup> F]( <b>7</b> )  | 85 min (proceso de dos etapas)      | 36%                                                    | > 99%               |

## 11.2. Datos comparativos con respecto a la formación de imágenes por PET

### 11.2.1 Protocolo: véase el protocolo del ejemplo 10

### 11.2.2 Formación de imágenes in vivo por PET

**[0148]** La formación de imágenes por PET se realizó 1 h después de la inyección de trazadores en ratones portadores de tumores B16BL6 en el día 15 después de la inoculación de células tumorales (véanse las Figuras 1 y 6). La comparación de las imágenes por PET muestra una elevada captación tumoral y específica de [<sup>18</sup>F](**1**) y [<sup>18</sup>F](**7**) tan pronto como 1 h después de la inyección (**14,33 ± 2,11** y **14,55%** ID/g, respectivamente), con una proporción tumor/músculo de **11,04 ± 2,87** y **17,41**, respectivamente. Comparativamente, [<sup>18</sup>F](**5**) muestra la captación tumoral específica más baja (**6,63 ± 1,64%** ID/g), así como la proporción tumor/músculo (**6,62 ± 1,90**).

**[0149]** Se deduce de la imagen por PET que [<sup>18</sup>F](**1**) es particularmente interesante debido a: i) su tropismo tumoral (**14,33 ± 2,11%** ID/g) y la proporción de tumor con respecto a músculo (**11,04 ± 2,87**), muy superior al análogo de fluoroetilo [<sup>18</sup>F](**25**) a 1 h p.i., y ii) a su señal tracto gastrointestinal inferior.

**[0150]** La Figura 6 muestra una imagen de PET de un ratón con tumor B16B16 realizada en el día 15, 1 h después de la inyección de [<sup>18</sup>F](**25**). Se indican tumor (T), tracto gastrointestinal (GIT) y vejiga (B).

**[0151]** Los resultados anteriores muestran que los compuestos de la presente invención se pueden utilizar para el diagnóstico con la formación de imágenes con SPECT o PET y/o el tratamiento del melanoma mediante terapia con radionucleidos dirigidos.

**[0152]** Según uno de sus aspectos, la presente invención se refiere al uso de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición para el diagnóstico y/o el tratamiento del melanoma.

**[0153]** Según otro aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables como agente radiofarmacéutico y/o para la formación de imágenes para el diagnóstico y/o el tratamiento del melanoma.

**[0154]** En el presente documento se describe un procedimiento para el diagnóstico y/o el tratamiento de melanoma en el que comprende al menos una etapa de administración a un paciente que sufre de melanoma o que potencialmente sufre de melanoma de una cantidad eficaz de un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, estando dicho compuesto marcado radioactivamente de antemano.

**[0155]** Según otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto marcado radioactivamente de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) o cualquiera de los compuestos (**1**) a (**8**) o de su sal farmacéuticamente aceptable. El radiomarcaje se produce en particular por medio de un radionucleido tal como se describe anteriormente.

**[0156]** Según otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a una composición radiofarmacéutica que comprende, como principio activo, un compuesto de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) según la invención, en la que comprende un átomo de flúor-18 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

**[0157]** Dicha composición radiofarmacéutica comprende ventajosamente una cantidad efectiva de dicho compuesto

de fórmulas (I), (Ia) o (Ib), en la que comprende un átomo de flúor-18, y también uno o más excipientes. Dichos excipientes se eligen según el tipo de formulación.

[0158] La presente invención se refiere además a compuestos de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) o una de sus sales farmacéuticamente aceptable para usar para la preparación de una composición radiofarmacéutica destinado a la formación de imágenes médicas, más particularmente para el diagnóstico del melanoma.

[0159] Según otro aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para usar como agentes de formación de imágenes médicas, más particularmente para el diagnóstico de melanoma.

[0160] También se describe un procedimiento de formación de imágenes mediante PET que emplea un compuesto marcado radioactivamente con flúor-18 de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib), tal como se describe anteriormente.

[0161] El paciente/sujeto puede ser un animal, mamífero o ser humano.

[0162] También se describe un procedimiento de formación de imágenes que comprende las etapas siguientes:  
- introducir el compuesto marcado radioactivamente de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) en un sujeto,  
- formar imágenes de una parte o de todo el cuerpo del sujeto.

[0163] También se describe un procedimiento no invasivo para la determinación de la distribución tisular de células tumorales de melanoma en el cuerpo humano, que comprende las etapas de al menos una inyección de una composición radiofarmacéutica que comprende al menos un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib), en el que comprende un átomo de flúor-18, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y de al menos una determinación de la concentración de la radiactividad.

[0164] Los procedimientos de formación de imágenes con PET son bien conocidos por el experto en la técnica.

[0165] Asimismo, la presente invención se refiere a un compuesto marcado radioactivamente de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o un compuesto marcado radioactivamente de fórmula (1) a (8), tal como se define anteriormente para usar para la formación de imágenes médicas, y más particularmente para el diagnóstico del melanoma y/o para el tratamiento del melanoma.

[0166] Según otro aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para usar como compuestos radiofarmacéuticos para el tratamiento del melanoma.

[0167] También se describe un procedimiento para el tratamiento del melanoma que comprende la administración a un paciente que sufre de melanoma y más particularmente de melanoma diseminado de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmulas (I), (Ia) o (Ib), en el que comprende un átomo de yodo-131, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

[0168] Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto no marcado de fórmulas (I), (Ia) o (Ib), tal como se describe anteriormente, y un haluro alcalino radiactivo para usar en la fabricación de un medicamento para el uso en el diagnóstico y/o el tratamiento del melanoma.

[0169] Según otro aspecto, la presente invención se refiere a compuestos no marcados de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para usar, cuando se combinan con un haluro alcalino radiactivo, como producto radiofarmacéutico y/o agente de formación de imágenes para el diagnóstico y/o el tratamiento de melanoma.

[0170] También se describe un procedimiento de tratamiento del melanoma que comprende una etapa de formación de imágenes con un compuesto marcado radioactivamente de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) mediante PET con flúor-18 para el diagnóstico de lesiones de melanoma que permite, en un sujeto, establecer la fase de la enfermedad y, a continuación, mediante el tratamiento de dichas lesiones de melanoma, por ejemplo mediante la inyección de un compuesto de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) que puede estar marcado radioactivamente con yodo-131, astato-211 o yodo-125, en particular, que denota la misma estructura química con la excepción del marcaje, y seguir la evolución del melanoma y la eficacia del tratamiento mediante una o más etapas sucesivas de formación de imágenes mediante la formación de imágenes con PET con flúor-18. De hecho, la formación de imágenes con PET con flúor-18 permite una cuantificación de la radiactividad presente en el tumor, que es de particular interés para estudios de dosimetría con el fin de evaluar y ajustar el tratamiento terapéutico del melanoma.

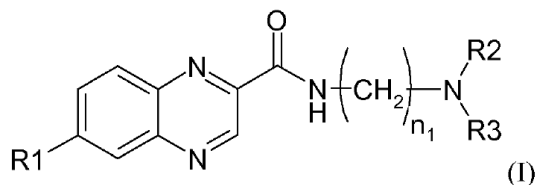
[0171] Según un aspecto particular, la estructura química para la formación de imágenes y el tratamiento es idéntica, excepto con respecto al marcaje, que se lleva a cabo a demanda para cada aplicación específica.

[0172] El compuesto marcado radioactivamente según la presente invención se puede administrar a un

sujeto/paciente mediante cualquier vía de administración, ya sea sistémica/periférica o tópica.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



en la que

R1 representa  $\text{Sn}(\text{R})_3$ ,  $\text{B}(\text{OH})_2$ ,  $\text{B}(\text{OR})_2$ , un átomo de halógeno,  $\text{NO}_2$ , un radionucleido o un grupo  $-\text{N}^+(\text{R})_3$ , en el que R es un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ),

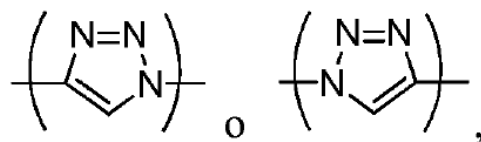
$n_1$  es un número entero que varía de 1 a 4,

R2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ),

R3 representa:

- un grupo  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n_2}-(\text{CH}_2)_{n_3}\text{-X}$ , en el que  $n_2$  es un número entero que varía de 1 a 12 y  $n_3$  es un número entero que varía de 1 a 4, o

- un grupo  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n_4}-(\text{CH}_2)_{n_5}\text{-Y}$ , representando  $n_4$  un número entero que varía de 0 a 12, representando  $n_5$  un número entero de 1 a 4, y representando Y un grupo  $-\text{C}=\text{C-H}$ ,  $-\text{N}_3$  o un grupo  $-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_{n_6}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{n_7}\text{-X}$ , siendo Ar



representando  $n_6$  un número entero que varía de 1 a 4 y  $n_7$  un número entero que varía de 0 a 12, y

X representa un átomo de halógeno, un radionucleido o un grupo  $-\text{OSO}_2\text{R}'$ , en el que R' es un grupo  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_3$ , *t*-Bu, Ph, *p*- $\text{NO}_2\text{-Ph}$ , *p*-BrPh o *p*- $\text{CH}_3\text{Ph}$ ,

y sus sales de adición con ácidos farmacéuticamente aceptables.

2. Compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1, en el que R2 es un grupo etilo.

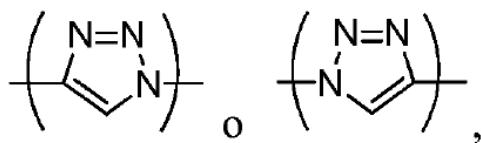
3. Compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1 ó 2, en el que  $n_1$  es 2.

4. Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R1 es un átomo de yodo, un radionucleido o  $\text{Sn}(\text{R})_3$ , en el que R es un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ), y más particularmente, R1 es un átomo de yodo.

5. Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R3 representa

- un grupo  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n_2}-(\text{CH}_2)_2\text{-X}$ , en el que  $n_2$  es un número entero que varía de 3 a 7,

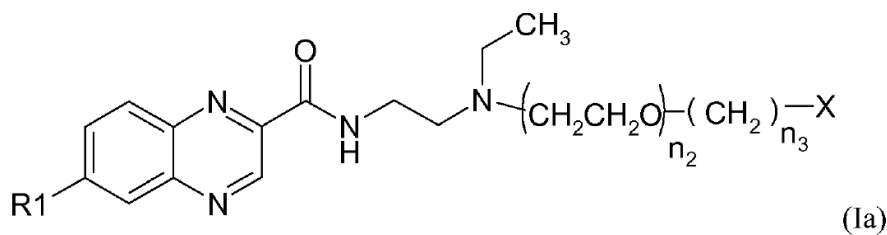
- un grupo  $-\text{CH}_2\text{-Y}$ , representando Y un grupo  $-\text{C}=\text{C-H}$ ,  $-\text{N}_3$  o  $-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_{n_6}\text{-X}$ , siendo Ar



$n_6$  representa un número entero que varía de 1 a 4, y

X es un átomo de halógeno, un radionucleido o un grupo  $-\text{OSO}_2\text{R}'$ , en el que R' es un grupo  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_3$ , *t*-Bu, Ph, *p*- $\text{NO}_2\text{Ph}$ , *p*-BrPh o *p*- $\text{CH}_3\text{Ph}$ .

6. Compuesto de fórmula (Ia), según la reivindicación 1



en la que

R1 representa  $\text{Sn}(\text{R})_3$ ,  $\text{B}(\text{OH})_2$ ,  $\text{B}(\text{OR})_2$ , un átomo de halógeno,  $\text{NO}_2$ , un radionucleido o un grupo  $-\text{N}^+(\text{R})_3$ , en el que

R es un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ),

$n_2$  es un número entero que varía de 1 a 12,

$n_3$  es un número entero que varía de 1 a 4, y

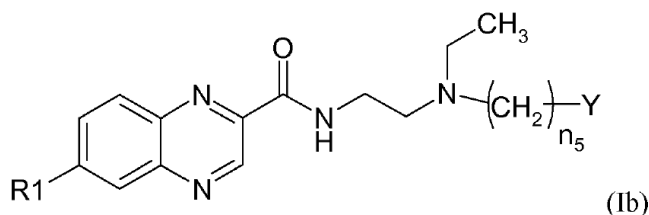
X es un átomo de halógeno, un radionucleido o un grupo  $-\text{OSO}_2\text{R}'$ , en el que R' es un grupo  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_3$ , *t*-Bu, Ph, *p*- $\text{NO}_2\text{Ph}$ , *p*-BrPh o *p*- $\text{CH}_3\text{Ph}$ .

y sus sales de adición con ácidos farmacéuticamente aceptables.

7. Compuesto de fórmula (Ia), según la reivindicación 6, en el que  $n_6$  varía entre 3 y 7 y  $n_3$  es 2.

8. Compuesto de fórmula (Ia), según la reivindicación 6 ó 7, en el que R1 representa un átomo de yodo, un radionucleido o  $\text{Sn}(\text{R})_3$ , en el que R es un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ), y más particularmente R1 representa un átomo de yodo o un átomo de yodo opcionalmente marcado, y X representa un átomo de flúor opcionalmente marcado o un grupo  $-\text{OSO}_2\text{R}'$ , en el que R' es un grupo  $\text{CF}_3$ , *t*-Bu o  $\text{CH}_3$ , y más particularmente un grupo  $\text{CH}_3$ .

9. Compuesto de fórmula (Ib), según la reivindicación 1:



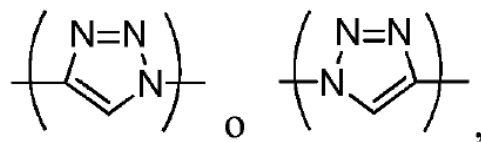
en la que

R1 representa  $\text{Sn}(\text{R})_3$ ,  $\text{B}(\text{OH})_2$ ,  $\text{B}(\text{OR})_2$ , un átomo de halógeno,  $\text{NO}_2$ , un radionucleido o un grupo  $-\text{N}^+(\text{R})_3$ , en el que

R es un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ),

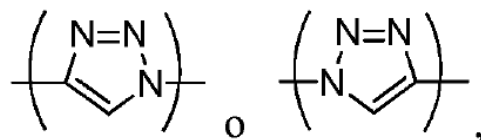
$n_5$  es un número entero que varía de 1 a 4, e

Y representa un grupo  $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$ ,  $-\text{N}_3$  o un grupo  $-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_{n_6}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{n_7}-\text{X}$ , siendo Ar



representando  $n_6$  un número entero que varía de 1 a 4,  $n_7$  un número entero que varía de 0 a 12, y X un halógeno, un radionucleido o un grupo  $-\text{OSO}_2\text{R}'$ , en el que R' es un grupo  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_3$ , *t*-Bu, Ph, *p*- $\text{NO}_2\text{-Ph}$ , *p*-BrPh o *p*- $\text{CH}_3\text{Ph}$ , y sus sales de adición con ácidos farmacéuticamente aceptables.

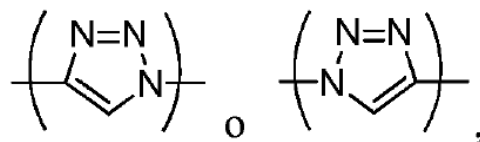
10. Compuesto de fórmula (Ib), según la reivindicación 9, en el que  $n_5$  es 1 e Y representa un grupo  $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$ ,  $-\text{N}_3$  o un grupo  $-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_{n_6}-\text{X}$ , siendo Ar



representando  $n_6$  un número entero que varía de 1 a 4 y X un halógeno, un radionucleido o un grupo  $-\text{OSO}_2\text{R}'$ , en el

que R' es un grupo CF<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, *t*-Bu, Ph, *p*-NO<sub>2</sub>-Ph, *p*-BrPh o *p*-CH<sub>3</sub>Ph.

11. Compuesto de fórmula (Ib), según la reivindicación 9 ó 10, en el que R1 representa un átomo de yodo, un radionucleido o Sn(R)<sub>3</sub>, en el que R es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), y más particularmente R1 representa un átomo de yodo, e Y representa un grupo -C=C-H o un grupo -Ar-(CH<sub>2</sub>)<sub>n6</sub>-X, siendo Ar



representando n<sub>6</sub> un número entero que varía de 1 a 4 y representando X un átomo de flúor opcionalmente marcado o un grupo -OSO<sub>2</sub>R', en el que R' es un grupo CF<sub>3</sub> o un grupo CH<sub>3</sub>, y más particularmente un grupo CH<sub>3</sub>.

12. Compuesto marcado radioactivamente, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho radiomarcage se produce mediante un radionucleido que es un radioisótopo elegido entre yodo-123, yodo-124, yodo-125, yodo-131, bromo-75, bromo-76, bromo-77, flúor-18, astato-210 o astato-211, y particularmente se elige entre flúor-18, yodo-123, yodo-124, yodo-125 y yodo-131.

13. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, elegido entre:

- *N*-(12-etil-1-fluoro-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(1)**,
- *N*-(12-etil-1-metanosulfonilo-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(2)**,
- *N*-(12-etil-1-fluoro-3,6,9-trioxa-12-azatetradecan-14-il)-6-(tributilestannil)quinoxalina-2-carboxamida **(4)**,
- *N*-(24-etil-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxa-24-azahexacosan-26-il)-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(5)**,
- *N*-(24-etil-1-metanosulfonilo-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxa-24-azahexacosan-26-il)-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(6)**,
- *N*-[2-[(*N*-etil)-[[1-(2-fluoroetil)-1*H*-(1,2,3)triazol-4-il]metil]amino]etil]-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(7)**,
- *N*-[2-[(*N*-etil)-(*N*-prop-2-inil)amino]etil]-6-yodoquinoxalina-2-carboxamida **(8)**,
- y sus sales farmacéuticamente aceptables, y más en particular, sus clorhidratos, o bases.

14. Composición radiofarmacéutica que comprende, como principio activo, un compuesto marcado radioactivamente de fórmulas (I), (Ia) o (Ib) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o uno de los compuestos **(1)**, **(2)**, **(4)**, **(5)**, **(6)**, **(7)** y **(8)**, según la reivindicación 13.

15. Compuesto marcado radioactivamente de fórmulas (I), (Ia) o (Ib), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables o un compuesto marcado radioactivamente de fórmula de uno de los compuestos **(1)**, **(2)**, **(4)**, **(5)**, **(6)**, **(7)** y **(8)**, según la reivindicación 13, para utilizar en la formación de imágenes médicas, y más en particular, para utilizar en el diagnóstico del melanoma y/o para utilizar en el tratamiento del melanoma.

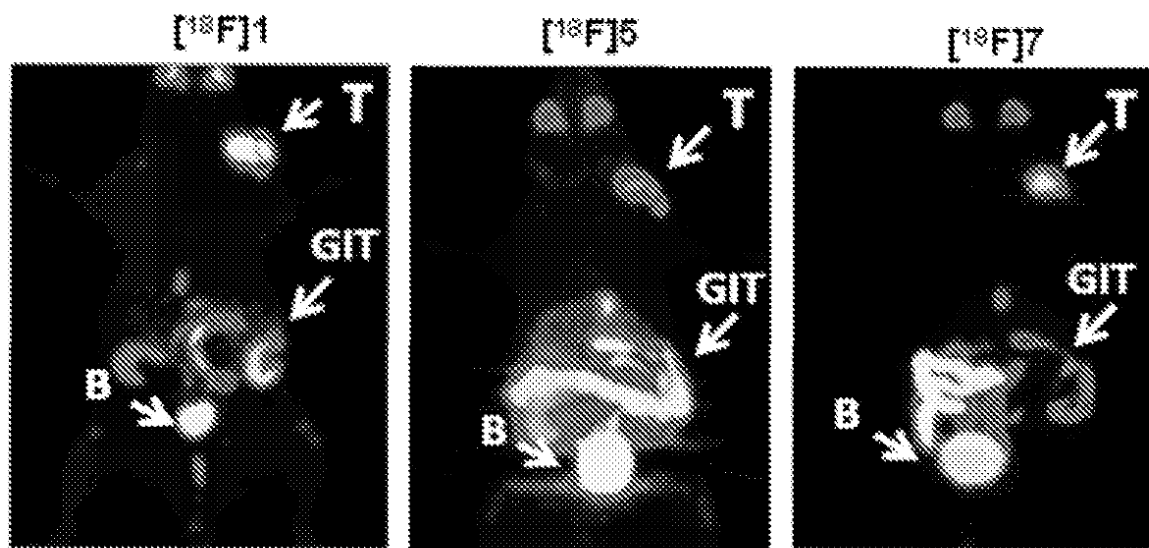


Figura 1

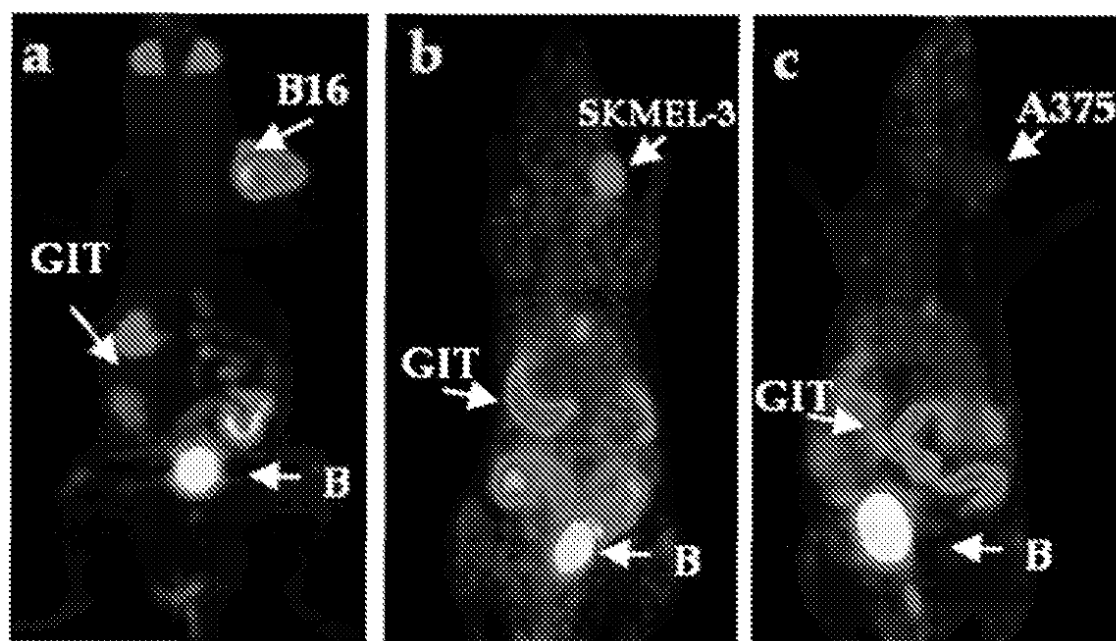


Figura 2

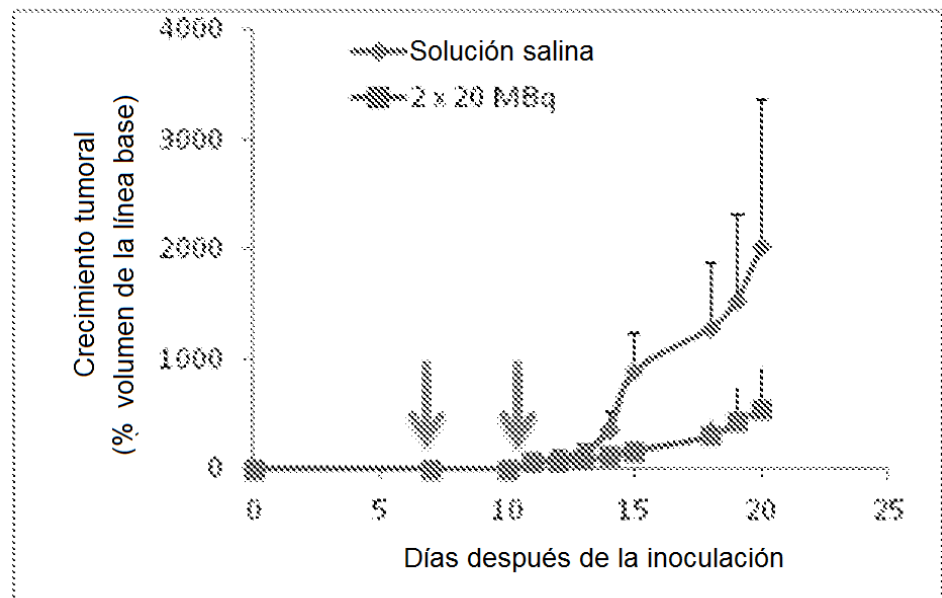


Figura 3

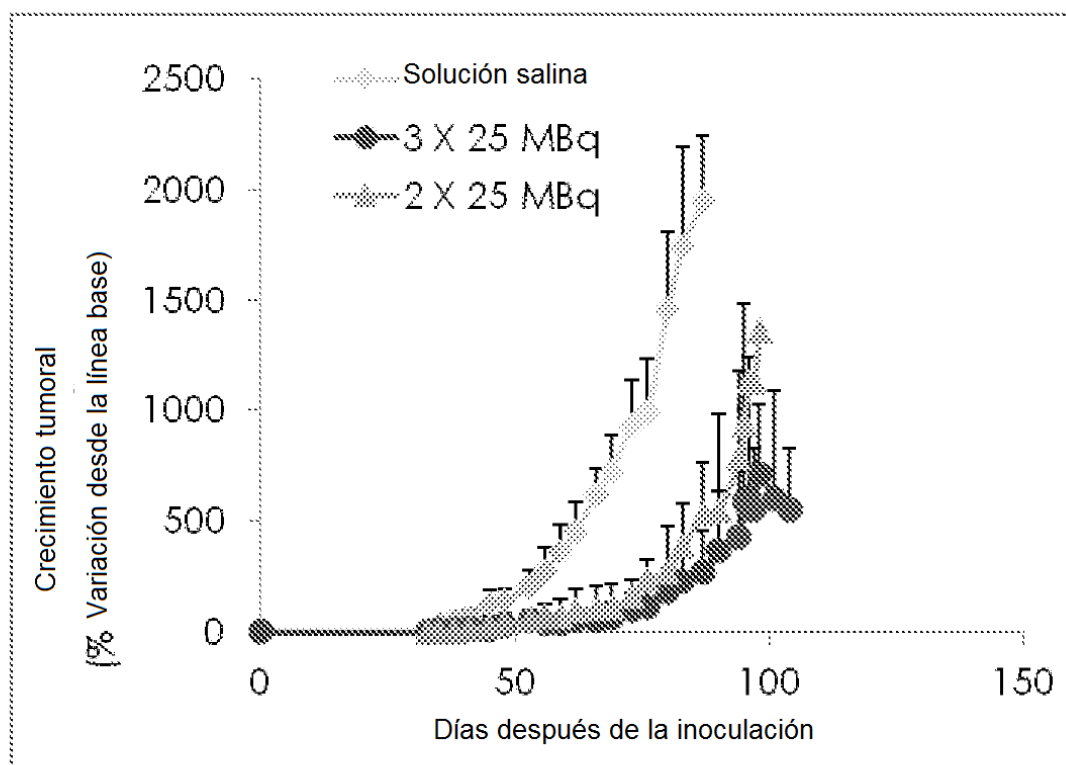


Figura 4

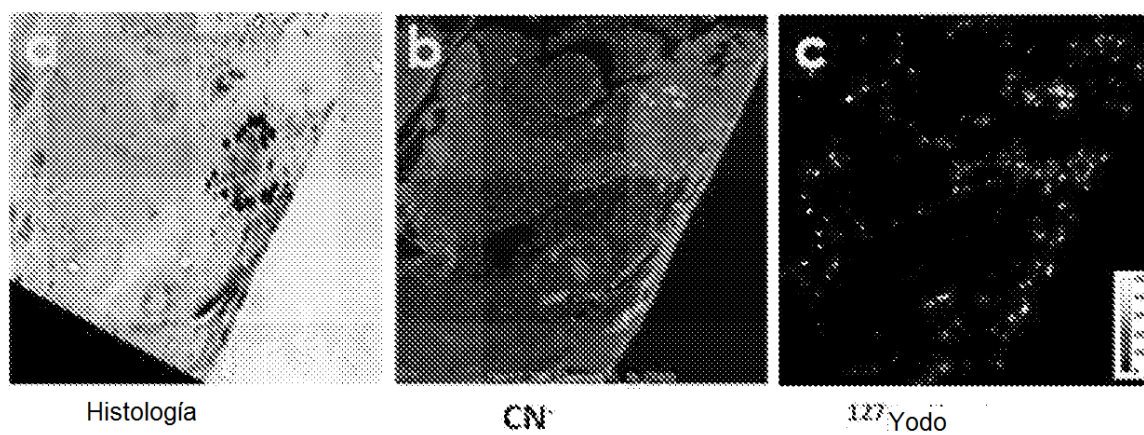


Figura 5

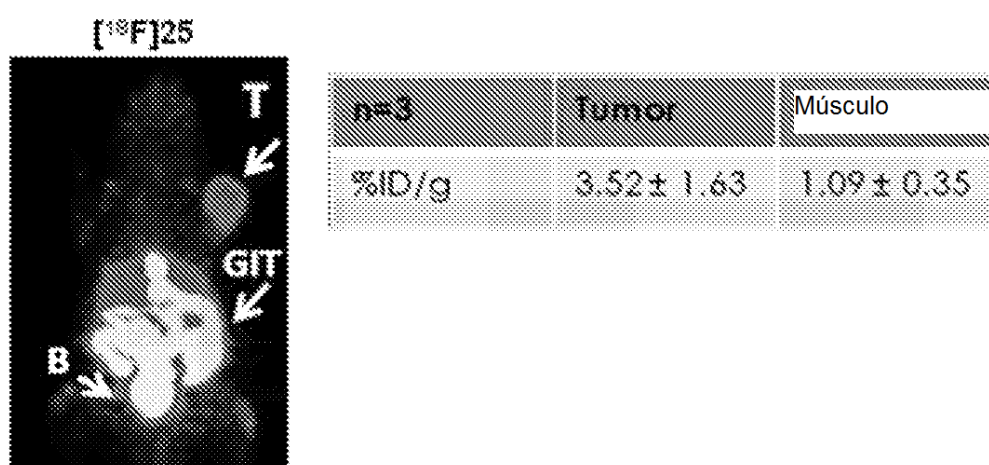


Figura 6