

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 528**

51 Int. Cl.:

C07D 473/04 (2006.01)

A61K 51/00 (2006.01)

C07B 59/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2008 PCT/EP2008/068244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2009 WO09087066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008 E 08869353 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2238139**

54 Título: **Procedimiento de preparación de un derivado de purina marcado, dicho derivado y sus usos**

30 Prioridad:

03.01.2008 FR 0850014

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

14.02.2018

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET
AUX ENERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
BATIMENT "LE PONANT D" 25, RUE LEBLANC
75015 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**BARRE, LOUISA y
MARCHAND, PATRICE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 654 528 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

Procedimiento de preparación de un derivado de purina marcado, dicho derivado y sus usos

5 **Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo general de los compuestos químicos marcados y, concretamente, de los derivados de purina marcados.

10 Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para marcar con flúor-18 derivados de purina. La presente invención también se refiere a los derivados novedosos de purina marcados con flúor-18 y productos intermedios de reacción así obtenidos y, más particularmente, a los derivados de purina marcados en la posición 2 del anillo aromático con flúor-18.

15 La presente invención también se refiere a los diferentes usos de estos derivados novedosos de purina y productos intermedios de reacción marcados con flúor-18 en la obtención de imágenes mediante PET, en investigación, en evaluación terapéutica o en diagnóstico.

20 **Estado de la técnica anterior**

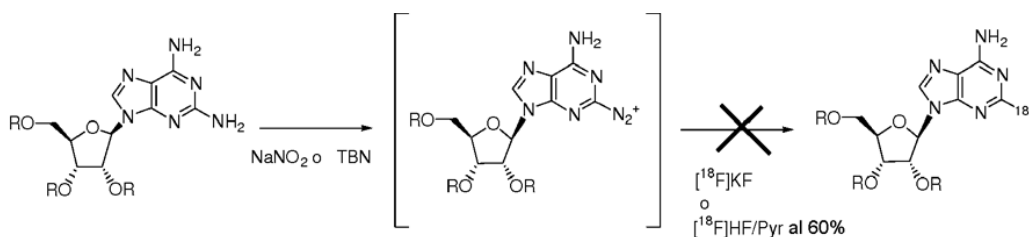
La tomografía por emisión de positrones (más adelante "PET" para "Positron Emission Tomography"), técnica de obtención de imágenes no invasiva para la evaluación *in vivo* de la distribución de medicamentos y su interacción con los sistemas diana bioquímicos, está bien adaptada para la exploración de las diferentes funciones fisiológicas y fisiopatológicas en el hombre.

25 Esta herramienta se volvió esencial rápidamente en oncología, neurobiología y cardiología. Actualmente, el reto en el campo del PET es el de producir y ofrecer, a un coste moderado, sondas para PET que puedan usarse en numerosas aplicaciones. Este objetivo puede lograrse mediante el desarrollo de compuestos marcados con un emisor de positrones y productos de modo eficaz.

30 Entre las posibles sondas para PET, los derivados de purina que comprenden concretamente los nucleósidos y los nucleótidos son objeto de un interés creciente, revelándose que algunos de estos derivados tienen actividades biológicas en campos variados. Además, estos últimos años, se han desplegado esfuerzos crecientes con vistas a la elaboración de ligandos de los receptores de adenosina que condujeron al desarrollo de agentes prometedores basados en las entidades purina o adenosina (artículo de Jacobson K.A. y Gao Z.-G. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2006, 5, 247).

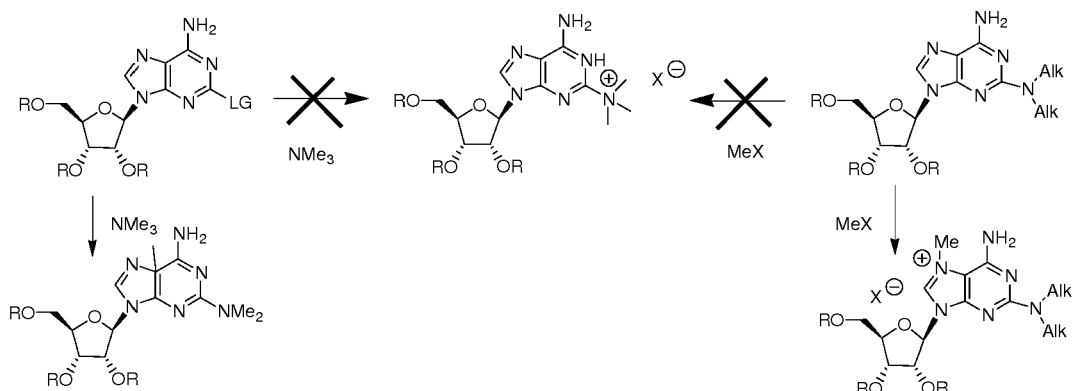
Ya se han diseñado varios compuestos que portan grupos purina o pirimidina como marcadores en la obtención de imágenes mediante PET, y la mayor parte de las estrategias usadas han consistido en marcar o bien la cadena lateral, o bien el azúcar con un radioisótopo. Se describieron previamente purinas y adenosinas radiomarcadas que presentan un enlace covalente entre el ciclo y el isótopo; se obtuvieron concretamente usando como radioisótopo o bien ^2H , ^3H , ^{15}N , ^{13}C y ^{11}C , o bien incluso ^{18}F .

45 El marcaje con el carbono ^{11}C se estudió de forma extensa, concretamente en cuanto a datos biológicos, y se patentó (solicitud internacional WO 03/099342). La [^{11}C]-adenosina mono-fosfato se obtuvo a partir de [^{11}C]-formaldehído después de 34 minutos y esto, con un rendimiento del 2,4%. No obstante, este método presenta algunas desventajas: un bajo rendimiento a pesar de un tiempo de síntesis correcto y la semivida corta del carbono ^{11}C ($t_{1/2} = 20,4$ minutos) que restringen sus aplicaciones a exámenes en un periodo corto. Otro objeto de esta solicitud se refiere a la síntesis de 2-[^{18}F]-fluoroadenosina a través de una reacción de sustitución nucleófila con flúor-18 de la sal de diazonio correspondiente. Este procedimiento inspirado a partir de la síntesis clásicas (artículo de Robins M.J. y Uznanski B., 1981, *Can. J. Chem.* 59, 2608) pareció inadecuado para la síntesis de 2-[^{18}F]-fluoroadenosina y el inventor de la solicitud notificó recientemente que este procedimiento era inviable (artículo de Horti *et al.*, 2006, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 49, 811).



Esquema 1: Inviabilidad del procedimiento descrito en la solicitud internacional WO 03/099342 (representando R hidrógeno o un grupo protector), tal como se menciona en el artículo de Horti *et al.*, 2006.

La solicitud internacional WO 2005/044312 a nombre de Bristol-Myers Squibb Company reivindica la síntesis de la 2- ^{18}F -fluoroadenosina (2- ^{18}F -FAD) a partir del triflato de 2-*N,N,N*-(trimetilamonio)-adenosina correspondiente. Se sabe bien que el triflato de 2-*N,N,N*-(trimetilamonio)-adenosina nunca se ha aislado y ni siquiera se ha observado nunca. Por el momento, el material de partida es un compuesto no descrito para el que la síntesis demostró ser infructuosa. Se demostró que el amonio correspondiente no podía obtenerse usando la trimetilamina (artículo de Robins M.J. y Uznanski B., 1981, Can. J. Chem. 59, 2601). Las tentativas para generar el amonio correspondiente mediante la alquilación de una amina secundaria también han fracasado puesto que la alquilación siempre tiene lugar a nivel de la posición 7 ó 9 del anillo de purina y no en la posición 2 (artículo de Hocek *et al.*, 2005, Eur. J. Org. Chem. 14, 3026).



Esquema 2: Síntesis ineficaz de derivados de 2-*N,N,N*-(trimetilamonio)-adenosina. El significado de los símbolos usados en el esquema 2 es el siguiente: R = H o un grupo protector, LG = grupo saliente; X = I o un grupo protector y Alk = grupo alquilo.

La síntesis de la 2- ^{18}F -fluoroadenosina (2- ^{18}F -FAD) como posible radiomarcador se realizó o bien a partir de la 2-yodoadenosina correspondiente, o bien a partir de la 2-fluoroadenosina (sustitución isotópica). En los dos casos, partiendo de nucleósidos no protegidos, la reacción produce compuestos marcados con bajos rendimientos (del 0,5% y el 5% a partir del precursor yodado o fluorado, respectivamente) y con radiactividades específicas muy bajas (artículo de Horti *et al.*, 2006, J. Labelled Compd. Radiopharm. 49, 811).

La solicitud de patente EP 1 956 013 a nombre de Fujifilm Pharma y Daiichi Sankyo prevé el preparar un compuesto que porta un grupo imidazopirimidina marcado con flúor 18 a partir de un compuesto porta un grupo imidazopirimidina nitrada. Por un lado, el esquema de reacción es puramente teórico y sin justificación experimental. Por otro lado, la eventual viabilidad del marcaje tal como se define en este documento en grupos imidazopirimidina no permite predecir para nada las posibilidades y condiciones de marcaje de otros heterociclos diferentes tales como purinas.

La preparación de la 2-fluoro-9-benzilpurina marcada con flúor 18 también se describió por Irie *et al.* (T. Irie, K. Fukushi, O. Isnoue, T. Yamasaki, T. Ido, T. Nozaki Int. J. Appl. Radiat. Isot., 33, 1982, 633-636) a partir de fluoruro de plata marcado con flúor-18. El método descrito requiere el uso de fluoruro de plata en exceso y sólo conduce a un rendimiento del 5,4-6,7%. Este método poco eficaz resulta ser inaplicable para el desarrollo de un producto radiofarmacéutico.

También se describió el marcaje en la posición 6 usando el ion fluoruro ^{18}F mediante un desplazamiento nucleófilo de la sal de trimetilamonio correspondiente. A diferencia de la posición 2, la posición 6 de la purina puede funcionalizarse mediante su amonio (artículo de Irie, *et al.*, 1982, Int. J. Appl. Radiat. Isot. 33(6), 445).

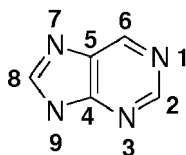
A pesar del interés creciente de estos potentes agentes en la obtención de imágenes mediante PET, no se ha descrito hasta ahora ningún procedimiento eficaz para marcar una molécula que comprende un anillo de purina en la posición 2 del anillo aromático usando flúor ^{18}F .

Además, se conoce la introducción de un átomo de halógeno en la posición 2 de la adenosina (y de los derivados a base de adenina) para aumentar la semivida biológica de la molécula y, por consiguiente, sus efectos principalmente mediante la inhibición de la actividad enzimática de la adenosina desaminasa. Así, considerando la necesidad de acceder a nuevos agentes para PET, el potencial de los nucleósidos marcados para el diagnóstico de cánceres o la evaluación de drogas y de la eficacia del tratamiento y el interés creciente de los receptores de adenosina, existe una necesidad evidente de una estrategia más eficaz de radiomarcaje de las purinas y, en particular, en la posición 2 del anillo aromático. Por consiguiente, una radiosíntesis eficaz de derivados de 2- ^{18}F fluoro-purina sería un avance significativo en el campo de la obtención de imágenes mediante PET.

Descripción de la invención

La presente invención permite resolver los problemas técnicos descritos previamente y aportar una solución a la necesidad presentada anteriormente proponiendo un método original para marcar las purinas y derivados de purina (tales como los nucleósidos) usando un átomo de flúor [^{18}F].

A continuación y en lo anterior, se usa el sistema de numeración de los átomos generalmente aceptado para el anillo de purina y representado a continuación:



La presente invención propone un medio fácil y muy eficaz para preparar derivados de 2- ^{18}F -fluoro-purinas protegidas o no. El procedimiento objeto de la invención es particularmente eficaz en el caso de los derivados de adenosina y de adenina tales como, a modo de ejemplos no limitativos, los nucleósidos.

El procedimiento de la presente invención es notable debido al hecho de que este procedimiento fiable puede aplicarse fácilmente a diferentes derivados de 2-nitro-purinas y, gracias a la simplicidad y la eficacia del procedimiento de la invención, podrá desarrollarse un procedimiento apropiado y completamente automatizado.

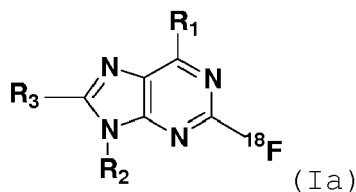
La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un derivado de 2-fluoro-purina marcado con el radioisótopo ^{18}F que comprende una etapa de fluoración de un derivado de 2-nitro-purina protegido de fórmula (1c) tal como se define más adelante.

Más particularmente, la etapa de fluoración del procedimiento según la presente invención consiste en hacer reaccionar un derivado de 2-nitro-purina protegido de fórmula (1c) tal como se define más adelante con una fuente de iones fluoruro F^- marcados con [^{18}F] para obtener el derivado de 2- ^{18}F fluoro-purina.

Así, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un derivado de 2-fluoro-purina marcado con el radioisótopo ^{18}F , que comprende una etapa de fluoración que consiste en hacer reaccionar un derivado de 2-nitro-purina protegido con una fuente de iones fluoruro F^- marcados con [^{18}F] seguida de una etapa de desprotección, para obtener el derivado de 2- ^{18}F fluoro-purina.

Resulta interesante que el procedimiento según la invención puede ponerse en práctica con una gran carencia de flúor frente al derivado de 2-nitro-purina, lo que hace que pueda usarse este procedimiento en la química del flúor-18. Ventajosamente, el flúor puede usarse en cantidades inferiores o iguales a 10^{-1} , incluso inferiores o iguales a 10^{-2} equivalentes con respecto al derivado de 2-nitro-purina.

Se entiende por "derivado de 2-fluoro-purina marcado con el radioisótopo ^{18}F " un compuesto que comprende un anillo de purina y de fórmula (1a)



en la que

R_1 representa H, un grupo alquilo eventualmente sustituido, un grupo arilo eventualmente sustituido, un grupo NR_4R_5 ,

R_2 representa H, un grupo alquilo eventualmente sustituido, un grupo arilo eventualmente sustituido, un grupo furanosa eventualmente sustituido o un grupo piranosa eventualmente sustituido,

R_3 representa H, un grupo alquilo eventualmente sustituido, un grupo arilo eventualmente sustituido, un halógeno, un grupo $-\text{OR}_8$ o un grupo $-\text{SR}_8$, representando R_8 H, un grupo alquilo eventualmente sustituido o un grupo arilo eventualmente sustituido,

representando R₄ y R₅ independientemente H, un grupo electroattractor, un grupo alquilo eventualmente sustituido, un grupo arilo eventualmente sustituido, un grupo acilo eventualmente sustituido, un grupo sulfinilo eventualmente sustituido o un grupo sulfonilo eventualmente sustituido.

- 5 Los derivados de 2-fluoro-purina marcados con el radioisótopo ¹⁸F preparados mediante el procedimiento de la presente invención son compuestos de fórmula (Ia) en los que R₁ representa un grupo NH₂.

Los grupos furanosa puestos en práctica ventajosamente en el marco de la presente invención son los grupos ribofuranosa y arabinofuranosa.

- 10 En el marco de la presente invención, se entiende por "grupo alquilo" un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico, eventualmente sustituido, de 1 a 20 átomos de carbono, concretamente de 1 a 10 átomos de carbono, en particular, de 1 a 8 átomos de carbono, más particularmente, de 1 a 6 átomos de carbono.

- 15 En el marco de la presente invención, se entiende por "grupo arilo" un grupo aromático mono o policíclico, eventualmente sustituido, que tiene de 6 a 20 átomos de carbono, concretamente de 6 a 14 átomos de carbono, en particular, de 6 a 8 átomos de carbono. A modo de ejemplos de grupo arilo según la invención, pueden mencionarse los grupos fenilo, naft-1-ilo, naft-2-ilo, antracen-9-il, 1,2,3,4-tetrahidronaft-5-ilo y 1,2,3,4-tetrahidronaft-6-ilo.

- 20 En el marco de la presente invención, se entiende por "grupo acilo" un grupo acilo lineal o ramificado, eventualmente sustituido, de 1 a 10 átomos de carbono, en particular, de 1 a 8 átomos de carbono, más particularmente, de 1 a 6 átomos de carbono.

- 25 En el marco de la presente invención, se entiende por "grupo electroattractor", un grupo elegido de los grupos NO₂ y nitrilo, de los derivados de imidas y de iminas, un grupo carbonilo -C(=O)-R, un grupo -OC(=O)-R en los que R es un átomo de hidrógeno, un grupo OH, un grupo alquilo, un grupo alcoxilo, un grupo arilo eventualmente sustituidos.

- 30 En el marco de la presente invención, se entiende por "grupo sulfinilo" un grupo de fórmula RSO-, siendo R un grupo alquilo o arilo tal como se definió anteriormente.

- 35 En el marco de la presente invención, se entiende por "grupo sulfonilo" un grupo de fórmula RSO₂-, siendo R un grupo alquilo o arilo tal como se definió anteriormente.

- En el marco de la presente invención, se entiende por "eventualmente sustituido" un radical sustituido con uno o varios grupos elegidos de: un grupo alquilo, un grupo alcoxilo, un halógeno, un hidroxilo, un ciano, un grupo trifluorometilo, un grupo nitro o un grupo protector.

- 40 En el marco de la presente invención, se entiende por "grupo alcoxilo" un átomo de oxígeno sustituido con un alquilo tal como se definió anteriormente.

- En el marco de la presente invención, se entiende por "halógeno" flúor, cloro, bromo o yodo.

- 45 En la etapa de fluoración del procedimiento según la invención, la fuente de iones fluoruro marcados con ¹⁸F comprende dichos iones fluoruro y un contraión, elegido de los cationes de gran tamaño y los cationes de pequeño tamaño.

- 50 Un catión de gran tamaño ventajosamente puesto en práctica en el marco de la presente invención es el tetrabutilamonio (Bu₄N⁺). El fluoruro de tetrabutilamonio marcado con el radioisótopo ¹⁸F (Bu₄N[¹⁸F]F) se prepara habitualmente usando Bu₄NOH o Bu₄NHCO₃.

- 55 A modo de ejemplos no limitativos de cationes de pequeño tamaño, pueden mencionarse el potasio, el sodio y el litio. Dichos cationes de pequeño tamaño pueden atraparse ventajosamente, estabilizados por ejemplo mediante un criptando o un éter corona, etc..., adaptándose dicho criptando o éter corona al catión de pequeño tamaño puesto en práctica. Un ejemplo de criptando susceptible de ponerse en práctica en el marco de la presente invención es el producto KRYPTOFIX[®] K₂₂₂: (4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diaza-biciclo[8.8.8]hexacosano) que atrapa, por ejemplo, el ion potasio.

- 60 El contraión o catión puede llevarse a la forma de una sal cualquiera, por ejemplo, puede tratarse de K₂CO₃, de K₂SO₄ o de oxalato de potasio en el caso del potasio. Conviene remarcar que, la sal y, en particular, el K₂CO₃ debe usarse ventajosamente, durante la etapa de fluoración, en una cantidad inferior o igual a 1 mg/mg de derivado de 2-nitro-purina, concretamente una cantidad inferior o igual a 0,6 mg/mg de derivado de 2-nitropurina y, en particular, una cantidad inferior o igual a 0,1 mg/mg de derivado de 2-nitro-purina.

- 65 La etapa de fluoración del procedimiento según la invención se realiza en un disolvente, que es CH₃CN.

La etapa de fluoración del procedimiento según la invención puede realizarse en condiciones que conoce el experto

en la técnica, con un calentamiento a una temperatura comprendida entre 55 y 60°C. En esta horquilla de temperatura, el disolvente CH₃CN proporcionó los mejores resultados.

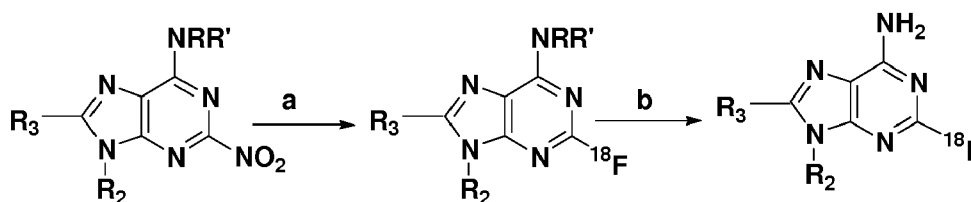
5 La etapa de fluoración del procedimiento según la invención se efectúa en un periodo comprendido entre 1 y 30 min, concretamente, entre 2 y 20 min, en particular, entre 5 y 10 min y, más particularmente, en un periodo de 8 min.

En la invención, el procedimiento de preparación de un derivado de 2-fluoro-purina marcado con el radioisótopo ¹⁸F comprende las siguientes etapas sucesivas que consisten en:

10 a) hacer reaccionar un derivado de 2-nitro-purina protegido con una fuente de iones fluoruro F⁻ marcados con [¹⁸F] para obtener un derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina protegido y eventualmente un derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina parcialmente desprotegido,

15 b) desproteger dicho derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina protegido y dicho derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina parcialmente desprotegido eventualmente obtenido para obtener el derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina.

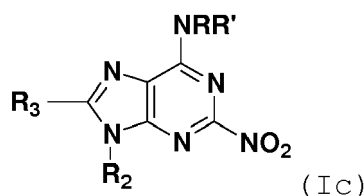
20 El uso de un grupo protector apropiado concretamente en el anillo de purina y, en particular, dos grupos protectores en el nitrógeno en la posición 6 del anillo de purina aumenta considerablemente el rendimiento de los compuestos marcados y reduce el tiempo de síntesis. Esta forma de puesta en práctica particular puede representarse del siguiente modo esquemático (esquema 3):



Esquema 3

25

El derivado de 2-nitro-purina protegido puesto en práctica en el marco de la presente invención es de fórmula (Ic)



30 en la que R y R' son grupos protectores idénticos o diferentes y R₂ y R₃ son tal como se definieron anteriormente.

35 Un grupo protector puesto en práctica en el marco de la presente invención se elige de un grupo alquilo eventualmente sustituido, un grupo acilo eventualmente sustituido, un grupo arilo eventualmente sustituido, un grupo bencilo eventualmente sustituido, un grupo benzoilo eventualmente sustituido, un grupo electroattractor, un grupo sulfínico eventualmente sustituido, un grupo sulfonilo eventualmente sustituido, un grupo tritilo, un grupo sililo, un grupo terc-butoxicarbonilo (BOC), un grupo fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) y un derivado de imida o un derivado de imina.

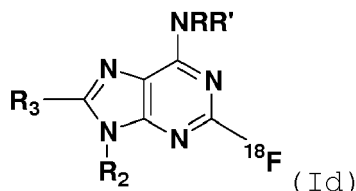
40 Conviene remarcar que los compuestos de fórmula (Ic) puestos en práctica en el marco de la presente invención comprenden al menos dos grupos protectores que son los grupos protectores R y R' en el nitrógeno en la posición 6 del anillo de purina pero pueden comprender otros grupos protectores. Estos otros grupos protectores se usan para proteger los grupos de los compuestos de fórmula (Ic) susceptibles de interactuar con la fuente de iones fluoruro durante la etapa de fluoración (a). Este aspecto se ejemplifica concretamente, en la parte experimental más adelante, con la 2-nitro-pentabenzoiladenosina y el precursor 7. En efecto, estos dos compuestos presentan tres grupos protectores además de los dos grupos protectores R y R', protegiendo estos tres grupos adicionales los tres grupos hidroxilo de la ribofuranosa.

45 Tales compuestos de fórmula (Ic) son fácilmente accesibles para el experto en la técnica. En efecto, la parte experimental más adelante propone varios procedimientos de síntesis que permiten obtener compuestos de fórmula (Ic) y, más particularmente, la 2-nitro-pentabenzoiladenosina y el precursor 7. Para el experto en la técnica resulta fácil preparar, a partir de estas enseñanzas, el conjunto de los compuestos de fórmula (Ic).

50 La etapa (a) del procedimiento según la invención corresponde a la etapa de fluoración tal como se definió anteriormente. Por consiguiente, todo lo que se desarrolló previamente para caracterizar esta etapa de fluoración y

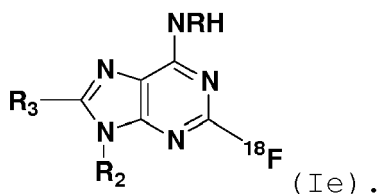
concretamente referente al ion fluoruro, el contraión, el disolvente, la temperatura y la duración de la etapa de fluoración también se aplica a la etapa (a) del procedimiento según la invención.

5 El derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina protegido obtenido después de la etapa (a) del procedimiento según la invención es de fórmula (Id)



10 siendo R₂, R₃, R y R' tal como se definieron anteriormente.

Además, en función de las condiciones experimentales puestas en práctica durante esta etapa (a) de fluoración, el derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina protegido de fórmula (Id) podrá obtenerse, tras la etapa (a) del procedimiento según la invención, en mezcla con un derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina parcialmente desprotegido. El derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina parcialmente desprotegido puede representar del 0 al 80% de la mezcla (derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina protegido + derivado de 2-[¹⁸F]fluoropurina parcialmente desprotegido) obtenido al final de la etapa de fluoración (a). El derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina parcialmente desprotegido es de fórmula (Ie)



20 siendo R₂, R₃ y R tal como se definieron anteriormente.

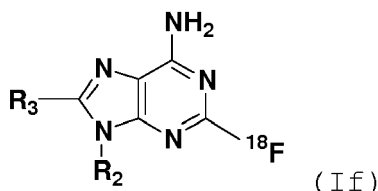
Los trabajos de los inventores mostraron concretamente que, cuando se usa K₂SO₄ como fuente de cationes durante la etapa de fluoración (a), se obtiene mayoritariamente el derivado de fórmula (Ie).

25 Por consiguiente, la presente descripción también se refiere al uso de K₂SO₄ para preparar, mediante fluoración directa, un derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina parcialmente desprotegido de fórmula (Ie) tal como se definió anteriormente a partir de un derivado de 2-nitro-purina protegido de fórmula (Ic) tal como se definió anteriormente.

30 La puesta en práctica de la etapa (b) puede presentar dos variantes.

En una primera variante puesta en práctica en el procedimiento según la invención, esta etapa (b) de desprotección se efectúa en una sola etapa que permite pasar, sin productos intermedios, del compuesto de fórmula (Id) eventualmente mezclado con el compuesto parcialmente desprotegido de fórmula (Ie) al derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina de fórmula (If)

35



siendo R₂ y R₃ tal como se definieron anteriormente.

40 En esta variante, la eliminación de los grupos protectores de la función amina en la posición 6 del anillo de purina, es decir la desprotección, para proporcionar el compuesto de fórmula (If) en el que el grupo amino está libre, puede realizarse mediante cualquier procedimiento de desprotección que conozca el experto en la técnica. Este último sabrá, en función del grupo o de los grupos protectores puestos en práctica, elegir el procedimiento de desprotección mejor adaptado.

45

En la presente invención, la etapa (b) de desprotección se realiza haciendo reaccionar el derivado de 2-[¹⁸F]fluoropurina protegido de fórmula (Id) y el derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina parcialmente desprotegido de fórmula (Ie) eventualmente presente con una mezcla de alcohol y de amoniaco acuoso. Así, la etapa (b) de desprotección se

realiza haciendo reaccionar el derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina protegido y el derivado de 2-[¹⁸F]fluoro-purina parcialmente desprotegido eventualmente presente con un alcohol tal como metanol, seguido de amoniaco acuoso y después calentando a una temperatura comprendida entre 50 y 90°C y concretamente 70°C durante un periodo comprendido entre 5 y 45 min, concretamente entre 10 y 30 min y, en particular durante 20 min. La razón de mezcla (alcohol + amoniaco acuoso)/agua (v/v) está comprendida entre el 10 y el 50%, concretamente el 20 y el 40% y, en particular, es del 28%. En la mezcla (alcohol + amoniaco acuoso), las proporciones alcohol/amoniaco acuoso expresadas en volumen están comprendidas entre 5/1 y 1/5, concretamente 2/1 y 1/2 y, en particular, 1/1. Cuando el compuesto de fórmula (Id) es la 2-fluoro-pentabenzozadenosina marcada con el radioisótopo ¹⁸F, habitualmente se obtienen mejores resultados si la temperatura se mantiene inferior a 80°C y esto, durante un tiempo de reacción de 20 min.

En una segunda variante que no forma parte de la presente invención, esta etapa (b) de desprotección se realiza en dos subetapas (b') y (b'').

En esta variante, la etapa (b') consiste en hacer reaccionar el derivado de 2-fluoro-purina marcado con el radioisótopo ¹⁸F y protegido de fórmula (Id) obtenido después de la etapa (a) de fluoración con un compuesto nucleófilo para obtener un derivado de 2-fluoro-purina marcado con el radioisótopo ¹⁸F monohidrolizado (o monodesprotegido) de fórmula (Ie) tal como se definió anteriormente.

El compuesto nucleófilo puesto en práctica ventajosamente durante la subetapa (b') se elige de los compuestos que comprenden al menos un átomo de nitrógeno que porta un doblete libre incluido en un ciclo saturado, insaturado o aromático, comprendiendo dicho ciclo preferiblemente de 3 a 8 átomos; las aminas primarias o secundarias tales como la 2-fenil-etilamina; un derivado de hidrazina o de hidrazona; una amida; una sulfonamida; un derivado de urea; un derivado heterocíclico preferiblemente nitrogenado y/o azufrado; un alcohol y un derivado de fenol. Los artículos de Nowak *et al.*, J. Org. Chem. 70, 2005, 7455-7458 y de Ishido *et al.*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1977, 657-660 describen algunos de los compuestos nucleófilos mencionados anteriormente y sus usos.

La subetapa (b') se realiza generalmente en un disolvente, que puede ser cualquier disolvente convencional que conozca el experto en la técnica. A modo de ejemplos no exhaustivos de tales disolventes, pueden mencionarse DMSO, DMF, CH₃CN y THF. Ventajosamente, el disolvente usado durante la subetapa (b') es idéntico al disolvente puesto en práctica durante la etapa (a).

La subetapa (b') puede realizarse en condiciones que conoce el experto en la técnica, con un calentamiento generalmente a una temperatura comprendida entre 40 y 100°C, concretamente comprendida entre 50 y 80°C, en particular del orden de 60°C.

La subetapa (b') se efectúa en un periodo comprendido entre 1 y 45 min, concretamente, entre 2 y 30 min, en particular, entre 5 y 20 min y, más particularmente, en un periodo de 10 min.

No es necesaria ninguna modificación de las condiciones de la subetapa (b') del procedimiento tal como se definió anteriormente en el caso en el que ya está presente el compuesto de fórmula (Ie) en mezcla con el compuesto de fórmula (Id) tras la etapa (a) de fluoración.

En esta segunda variante, la subetapa (b'') es una desprotección que tiene como objetivo eliminar el (o los) grupo(s) protector(es) restante(s). Esta subetapa (b'') puede realizarse mediante cualquier procedimiento de desprotección que conozca el experto en la técnica. Este último sabrá, en función del grupo (o de los) grupo(s) protector(es) restante(s), elegir el procedimiento de desprotección mejor adaptado. No obstante, conviene señalar que, teniendo en cuenta la etapa (b') puesta en práctica de antemano, las condiciones durante la subetapa de desprotección (b'') pueden ser más drásticas que las condiciones usadas durante la desprotección según la primera alternativa (etapa (b)), concretamente en cuanto a temperatura de reacción.

A modo de ejemplos y de modo no limitativo, cuando los grupos protectores son grupos benzoílo, la subetapa (b'') puede realizarse haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (Ie) con un alcohol tal como metanol, seguido de amoniaco acuoso y después calentando a una temperatura comprendida entre 50 y 110°C, concretamente comprendida entre 70 y 90°C y, en particular, comprendida entre 80 y 85°C durante un periodo comprendido entre 5 y 45 min, concretamente entre 10 y 30 min y, en particular durante 20 min.

Las etapas de desprotección (b) y (b'') están seguidas por una etapa de hidrólisis. Cualquier técnica de hidrólisis que conozca el experto en la técnica es susceptible de ponerse en práctica en el marco de la presente invención. A modo de ejemplos no limitativos, pueden mencionarse una hidrólisis realizada con una disolución acuosa de ácido acético o una elución mediante una resina ácida.

La purificación del derivado de 2-fluoro-purina marcado con el radioisótopo ¹⁸F tras el procedimiento de la invención puede efectuarse, si es necesario, mediante cualquier técnica de purificación que conozca el experto en la técnica. A modo de ejemplos no limitativos, pueden mencionarse una cromatografía, una cromatografía ultrarrápida, una cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, una HPLC semipreparativa, etc...

El procedimiento según la invención es simple, fiable, fácil de poner en práctica y puede robotizarse con facilidad.

5 La sustitución nucleófila de un derivado de 2-nitro-purina que puede protegerse, si es necesario, con iones fluoruro en forma de $[^{18}\text{F}]\text{-KF}$ o $[^{18}\text{F}]\text{-Bu}_4\text{NF}$ conduce, después de desprotección y purificación, al derivado de 2-fluoro-purina radiomarcado esperado con un rendimiento global elevado.

10 La incorporación del halógeno flúor-18 que permite obtener derivados de 2-nitro-purina protegidos se realiza de manera extremadamente eficaz con un alto rendimiento, por ejemplo del orden del 70 a 100%, concretamente del 80 al 100% y más particularmente del 90 al 98%. La invención también cubre la posibilidad de obtener, de modo selectivo, con un rendimiento elevado, un derivado de 2-fluoro-purina radiomarcado desprotegido.

15 El rendimiento final del conjunto del procedimiento para un producto purificado es extremadamente elevado, por ejemplo del orden del 40-60% e independientemente de la variante de procedimiento puesta en práctica. Conviene señalar que la presencia o no de un derivado de 2- $[^{18}\text{F}]$ fluoro-purina parcialmente desprotegido de fórmula (Ie) tras la etapa (a) de fluoración no afecta al rendimiento final del procedimiento según la invención.

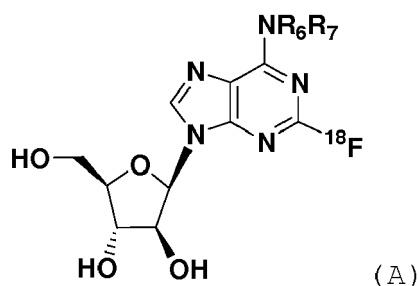
20 Algunos ejemplos de aplicación describen la síntesis de la $[^{18}\text{F}]$ -2-fluoroadenosina y de la $[^{18}\text{F}]$ -fludarabina mediante una fluoración con $[^{18}\text{F}]$ y una desprotección. En comparación con otros procedimientos, se obtienen rendimientos mejorados a partir de productos intermedios fácilmente disponibles en un tiempo de reacción corto, incluida la purificación, lo que hace que el procedimiento según la invención sea compatible con un estudio con PET.

25 En efecto, la duración global del procedimiento según la invención es corta: a modo de ejemplo, es generalmente de 60 a 120 minutos, preferiblemente de 75 a 85 minutos.

30 La presente descripción también proporciona un procedimiento de preparación de un derivado de 2-fluoro-purina marcado con el radioisótopo ^{18}F monohidrolizado (o monodesprotegido) de fórmula (Ie) tal como se definió anteriormente. Dicho procedimiento consiste en hacer reaccionar un derivado de 2-fluoro-purina marcado con el radioisótopo ^{18}F y protegido de fórmula (Id) tal como se definió anteriormente con un compuesto nucleófilo tal como se definió anteriormente, y este en las condiciones descritas anteriormente para la subetapa (b').

35 La presente descripción también proporciona un compuesto susceptible de prepararse mediante un procedimiento según la presente invención o de obtenerse en el transcurso de un procedimiento según la presente invención (producto intermedio de reacción).

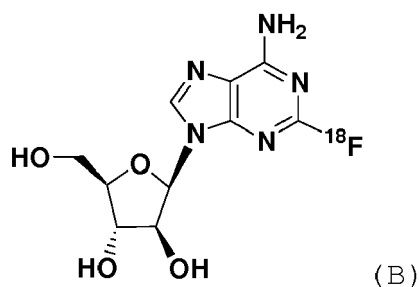
De modo ventajoso, un compuesto de este tipo es un compuesto de fórmula (A)



40 en la que R_6 y R_7 son independientemente H o un grupo protector, o una sal del mismo.

Entre estos compuestos, se prefieren particularmente los siguientes compuestos:

45 - la fludarabina marcada con el radioisótopo ^{18}F de fórmula (B) o una de sus sales



Por "sal" se entiende, en el marco de la presente invención, las sales de adición de ácidos y las sales de adición de bases. Tales sales pueden formarse mediante medios convencionales, por ejemplo, mediante reacción de una forma de ácido libre o de una forma de base libre de un compuesto de la invención con uno o varios equivalentes de un ácido o de una base apropiados, opcionalmente en un disolvente, o en un medio en el que la sal es insoluble, después mediante extracción de dicho disolvente, o de dicho medio, usando técnicas convencionales (por ejemplo, a vacío o mediante liofilización). Las sales también pueden prepararse reemplazando un contraión de un compuesto de la invención en forma de una sal por otro contraión, por ejemplo, usando una resina de intercambio de iones apropiada.

Concretamente con el objetivo de una administración en el cuerpo humano o animal, las sales de estos compuestos son ventajosamente sales farmacéuticamente aceptables.

En particular, cuando estos compuestos se presentan en forma de una sal, se trata de una sal de un metal alcalino, en particular, una sal de sodio o de potasio, o de una sal de un metal alcalinotérreo, en particular magnesio o calcio, o incluso de una sal con una amina orgánica, más particularmente, con un aminoácido tal como arginina o lisina.

Cuando estos compuestos presentan una función amina y se presentan en forma de una sal de esta amina, se trata de una sal de ácido inorgánico como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido bromhídrico o de una sal de ácido orgánico como, por ejemplo, ácido acético, ácido tríflico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido trifluoroacético o ácido metanosulfónico.

La presente descripción proporciona además una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende al menos un compuesto tal como se definió anteriormente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por "vehículo farmacéuticamente aceptable", se entiende en el marco de la presente invención uno o varios adyuvantes, excipientes, tampones, diluyentes y/u otros agentes farmacéuticos habituales y que conoce el experto en la técnica.

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (B) tal como se definió anteriormente, de una sal del mismo o de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende al menos tal compuesto en un vehículo farmacéutico aceptable para estudios de obtención de imágenes mediante PET aplicados al campo de la leucemia linfocítica crónica.

La presente invención también se refiere a un compuesto de este tipo o una composición de este tipo para uso en la evaluación del tratamiento de la leucemia linfocítica crónica y el mapeo *in vivo* de células hematopoyéticas malignas.

Los ejemplos a continuación ilustran, de modo no limitativo, el procedimiento y los productos según la presente invención y hacen referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 presenta las radiocromatografías en capa fina (o "radio-CCM") obtenidas, a $t=5$ min, a partir de la mezcla de reacción de fluoración que pone en práctica como fuente de cationes o bien K_2CO_3 (figura 1A), o bien K_2SO_4 (figura 1B).

La figura 2 presenta la evolución en función del tiempo de la composición de la mezcla de reacción durante la etapa de fluoración que pone en práctica como fuente de cationes K_2SO_4 .

La figura 3 presenta la evolución en función del tiempo de la composición de la mezcla de reacción durante la etapa de fluoración que pone en práctica como fuente de cationes K_2CO_3 .

La figura 4 presenta la comparación de los porcentajes del producto parcialmente desprotegido en el medio de reacción en función del tiempo y de la naturaleza de la sal de potasio usada como fuente de cationes (K_2SO_4 o K_2CO_3).

Descripción detallada de modos de realización particulares

MATERIALES Y MÉTODOS.

En general, todos los productos químicos y disolventes son de calidad ACS (para "Analytical grade chemical solvent" (disolvente químico de calidad analítica) o de calidad HPLC (para "High-Performance Liquid Chromatography" o "cromatografía en fase líquida de alto rendimiento") y se usan sin ninguna otra purificación salvo mención en contra.

El diclorometano (CH_2Cl_2) se destiló sobre P_2O_5 . La piridina se secó y se destiló sobre KOH. El acetonitrilo, DMF, THF, el dioxano se purifican sobre resina en un aparato MB Braun-SPS-800. El agua se desionizó en un aparato

Millipore y se filtró con un filtro de 0,22 μm (Millipak). La fludarabina (2F-ARA-A) se obtuvo de Sigma.

Los análisis de HPLC se realizaron con una bomba para HPLC (modelo L-6200 Intelligent Pump, Merck), un detector UV L-4250 de Merck ($\lambda = 254 \text{ nm}$) en serie con un detector de flujo β^+ de Novelec. Los cromatogramas de HPLC se registraron mediante un módulo de interfaz/control de doble canal (Varian star 800) conectado a un PC con el software Galaxy (Varian).

Las cromatografías en capa fina (CCF para "Thin layer chromatographies") se realizaron sobre placas de sílice (gel 60 F₂₅₄) y se visualizaron usando una lámpara UV ($\lambda=254\text{nm}$) o mediante inmersión en un agente de coloración apropiado (KMnO₄, vainillina, yodo o PMA) seguido por un calentamiento suave. Los compuestos radiactivos se ubicaron en los CCF usando un aparato de obtención de imágenes (Packard Instant Imager) conectado a un PC.

Las cromatografías ultrarrápidas se realizaron en columnas de gel de sílice (SiO₂ 40-63 μm , Merck).

RMN (resonancia magnética nuclear): los espectros de ¹H-RMN se registraron usando un aparato Bruker de 250 o 400 MHz (DPX 250 o DRX 400). Los desplazamientos químicos δ se indican en ppm usando TMS como referencia. Las constantes de acoplamiento J se facilitan en hercios (Hz). Las multiplicidades se indican mediante las siguientes abreviaturas: s = singlete, d= doblete, t = triplete, q = cuartete, m = multiplete, sa = singlete ancho.

Los espectros de ¹³C {¹H}-RMN se registraron usando un aparato Bruker de 62,9 o 100,6 MHz. Los desplazamientos químicos δ se indican en ppm usando el disolvente deuterado como referencia. Las constantes de acoplamiento J se facilitan en hercios (Hz).

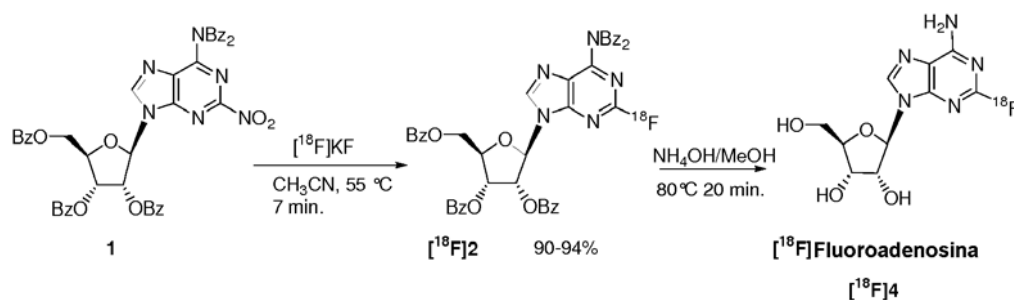
Los espectros de ¹⁹F-RMN se registraron usando un aparato Bruker Advanced DRX 400 (376 MHz). Los desplazamientos químicos δ se indican en ppm usando CFC₃ como referencia externa.

El ion fluoruro [¹⁸F]F⁻ en agua se obtuvo a partir de un ciclotrón (IBA, Cyclone 18/9 RF) usando un haz de protones sobre agua enriquecida en [¹⁸O] (95%) (Cambridge Isotope Laboratories Inc.). El ion fluoruro [¹⁸F]F⁻ en agua se purificó sobre una resina de intercambio de iones QMA (ABX, Advanced biochemical compounds) eluida con 500 μl de K₂CO₃ acuoso (desde 1 mg/ml hasta 5 mg/ml).

La evaporación del agua se realizó mediante destilación azeotrópica con acetonitrilo a 110°C bajo una corriente de nitrógeno usando un módulo de agitador/calentador (Pierce).

Las mediciones de radiactividad se realizaron usando un calibrador CRC-15 dose calibrator de Capintec.

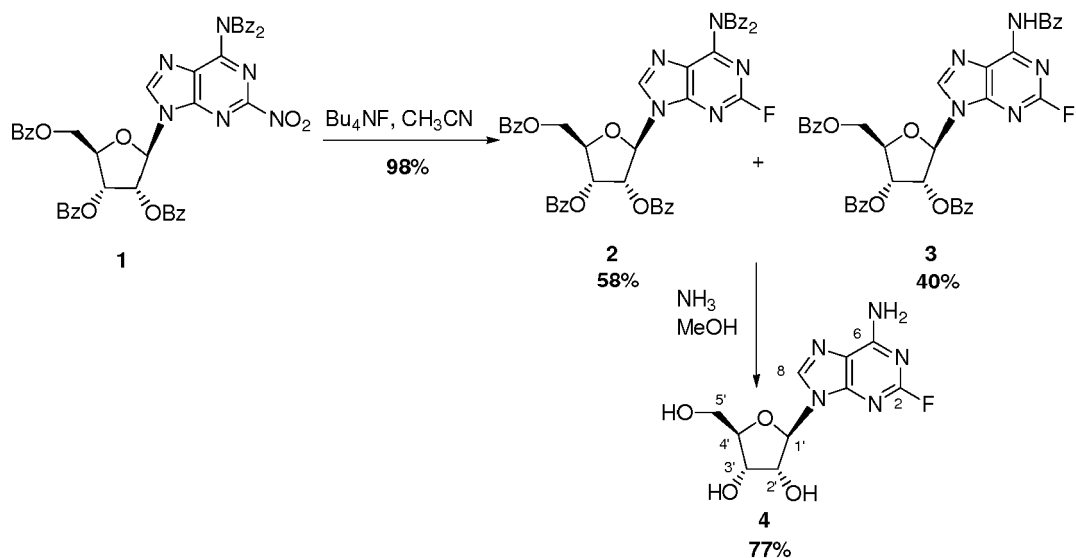
EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE [¹⁸F]FLUOROADENOSINA.



QUÍMICA.

Se prepararon la adenosina pentabenzoilada y la 2-nitro-pentabenzoiladenosina 1 según métodos ya descritos (artículo de Braendvang *et al.*, 2006, *Synthesis*, 18, 2993 y la solicitud internacional WO 2005/056571) y se purificaron mediante cromatografía sobre gel de sílice.

Se obtuvieron las 2-fluoro-adenosina 2 y 3 protegidas según un protocolo modificado (1,1 equivalentes de Bu₄NF en CH₃CN en lugar de un exceso de reactivo en DMF) que permitía su aislamiento con rendimientos elevados.



5 Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) (1,3 eq., 600 μ l, 0,6 mmol, 1 M en THF) gota a gota durante 1 min a una suspensión de 2-nitro-adenosina 1 (379 mg, 0,45 mmol) en acetonitrilo seco (15 ml) a 0°C. Se agitó la mezcla durante 20 min y se evaporó la disolución obtenida a vacío sin calentamiento. Se purificó el producto mediante cromatografía ultrarrápida (CH_2Cl_2 -acetona). Se aislaron los compuestos 2 y 3 con un rendimiento del 58% (211 mg) y el 35% (130 mg) respectivamente.

10 Se saturó una disolución del compuesto 2 protegido (185 mg, 0,23 mmol) en MeOH (40 ml) mediante una corriente de amoníaco gaseoso durante 15 min a 0°C. Se agitó la mezcla resultante durante 14 h a temperatura ambiente y después se evaporó a presión reducida y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (AcOEt-MeOH 83:17) para proporcionar 51 mg (77%) de la 2-fluoroadenosina 4.

15 2-fluoro-6-*N,N*-dibenzoil-9-(2',3',5'-tri-*O*-benzoil- β -D-ribofuranosil)-9H-purina 2.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 4,82 (m, 3 H, H_4 , H_5); 6,17 (t, 1 H, H_3 , J = 5,4 Hz); 6,22 (t, 1 H, H_2 , J = 5,8 Hz); 6,46 (d, 1 H, H_1 , J = 5,3 Hz); 7,28-7,52 (m, 15 H, Ar); 7,85 (dd, 4H, J = 1,2 y 8,4 Hz; H_{Ar}); 7,95 (dd, 2H, J = 1,2 y 8,4 Hz, H_{Ar}); 8,02 (dd, 2H, J = 1,2 y 8,4 Hz, H_{Ar}); 8,12 (dd, 2H, J = 1,2 y 8,40, H_{Ar}); 8,20 (s, 1 H, H_8).

20 ^{13}C -RMN (100,6 MHz, CDCl_3): δ = 63,9 (C_5); 71,7 (C_4); 74,4 (C_3); 81,4 (C_2); 87,0 (C_1); 126,4 (d, J_{CF} = 5,0 Hz, C_5); 128,7; 128,9; 129,0; 129,1; 129,3; 129,5; 129,9; 130,1; 130,2; 130,3; 133,7; 133,9; 134,0; 134,2; 134,3; 143,7 (d, J_{CF} = 3,8 Hz, C_8); 154,3 (d, J_{CF} = 16,9 Hz, C_6); 154,9 (d, J_{CF} = 17,0 Hz, C_4); 158,3 (d, J_{CF} = 218,9 Hz, C_2); 165,5 ($\text{C}=\text{O}$); 165,7 ($\text{C}=\text{O}$); 166,5 ($\text{C}=\text{O}$); 172,1 (2 x $\text{C}=\text{O}$).

25 ^{19}F -RMN (376,5 MHz, CDCl_3): δ = -49,1

2-fluoro-6-*N*-benzoil-9-(2',3',5'-tri-*O*-benzoil- β -D-ribofuranosil)-9H-purina 3.

30 (dos rotámeros: razón 80/20).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 4,74 (m, 3,6 H, H_4 , H_5); 6,12 (m, 2,4 H, H_3 , H_2); 6,39 (d, 0,8 H, H_1 , J = 5,5 Hz); 6,51 (d, 0,2 H, H_1 , J = 5,5 Hz); 7,28-7,51 (m, 15 H, H_{Ar}); 7,83-8,011 (m, 10 H, H_{Ar}); 8,08 (s, 0,8 H, H_8); 8,39 (s, 0,2 H, H_8); 8,94 (s, 0,8 H, NH); 9,14 (s, 0,2 H, NH).

35 ^{19}F -RMN (376,5 MHz, CDCl_3): δ = -47,6

2-fluoro-9-(β -D-ribofuranosil)-9H-purina 4.

40 ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 3,60 (m, 2 H, H_5); 3,94 (m, 1 H, H_4); 4,13 (m, 1 H, H_3); 4,52 (m, 1 H, H_2); 5,07 (t, 1 H, OH-5', J = 5,6 Hz); 5,20 (d, 1 H, OH-3', J = 4,7 Hz); 5,47 (d, 1 H, OH-2', J = 5,9 Hz); 5,79 (d, 1 H, H_1 , J = 5,9 Hz); 7,87 (sa, 2 H, NH2); 8,35 (s, 1 H, H_8).

45 ^{19}F -RMN (376,5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = -52,5

RADIOQUÍMICA.

Método A según la presente invención

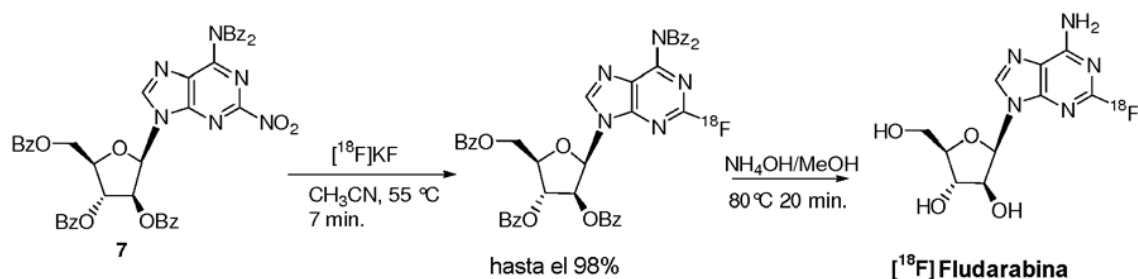
- El ion fluoruro [^{18}F] F^- en agua se adsorbió sobre una resina de intercambio de iones QMA (ABX) y se eluyó con K_2CO_3 acuoso (500 μl , 1 mg/ml) y Kryptofix (K_{222} , 15-25 mg) en acetonitrilo (500 μl). Se evaporó el agua bajo una corriente de nitrógeno a 110°C mediante destilación azeotrópica usando acetonitrilo (3 x 1 ml). Se añadió el precursor 1 (5-5,5 mg en 500-800 μl de acetonitrilo) al complejo [^{18}F]KF seco. Un calentamiento a 55-60°C durante de 5 a 10 min (preferiblemente, 8 min) permite obtener la [^{18}F]fluoroadenosina 2 esperada con un rendimiento radioquímico de más del 90% (cromatografía en capa fina de SiO_2 eluida con CH_2Cl_2 /acetona 95/5, Packard Instant Imager). Se diluyó la disolución con 500 μl de acetato de etilo (AcOEt) y se adsorbió sobre un cartucho de sílice Sep-Pak (WATERS). La elución con 3-3,5 ml de AcOEt seguido por 5 ml de aire seco y la evaporación del disolvente permitió obtener la [^{18}F]2-fluoroadenosina 2 protegida con un rendimiento global del 86% (corregida la disminución) a partir de [^{18}F]KF.
- Se realizó la desprotección de modo convencional mediante la adición de 500 μl de metanol seguido de 500 μl de amoníaco acuoso (al 29% en agua) y calentamiento a 65-70°C durante 20 min. Después de enfriamiento, se añadió ácido acético (0,7 ml, al 40% en agua o 0,3 ml de ácido acético puro) y se purificó la disolución clara mediante una cromatografía HPLC semipreparativa sobre una columna $\mu\text{Bondapak}$ (agua/etanol 97/3, 5 ml/min) para obtener la [^{18}F]-fluoroadenosina 4 con un rendimiento global del 50% (corregida la disminución).

Método B (que no forma parte de la presente invención)

- El método B es una alternativa para obtener de modo selectivo la fluoroadenosina [^{18}F] monohidrolizada 3. La desprotección posterior puede realizarse entonces usando condiciones más drásticas (80-85°C) para obtener la [^{18}F]-fluoroadenosina 4 y esta estrategia mejora la etapa de desprotección (90%).

- A la [^{18}F]fluoroadenosina 2 en bruto en acetonitrilo (obtenida según el método A) se le añadió 2-feniletilamina (1 mg) en 100 μl de acetonitrilo y se calentó la disolución durante 10 min a 60°C. Un análisis en CCF y HPLC mostró una formación cuantitativa del producto intermedio marcado monodesprotegido que es el compuesto de [^{18}F] 3. Se diluyó la disolución con 500 μl de AcOEt y se adsorbió sobre un cartucho de sílice Sep-Pak (WATERS). La elución con 3,5 ml de AcOEt seguido por 5 ml de aire seco y la evaporación del disolvente permite obtener el compuesto de [^{18}F] 3 con un rendimiento no optimizado del 60% (corregida la disminución).

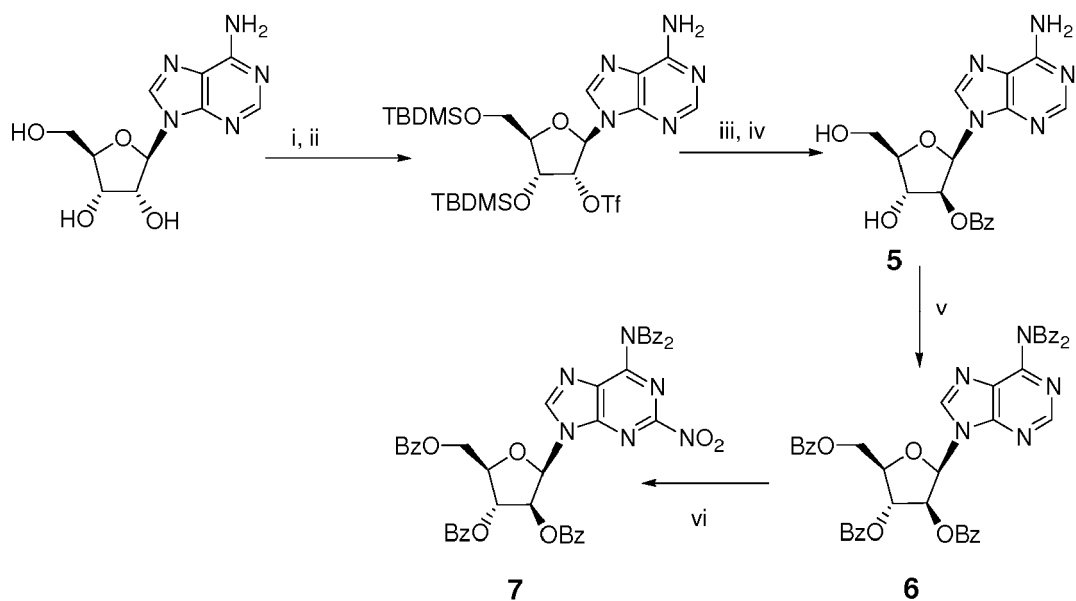
- Se realizó la desprotección final mediante la adición de 500 μl de metanol seguido por 400 μl de amoníaco (al 29% en agua) y calentamiento a 80-85°C durante 20 min. Después de enfriamiento, se añadió ácido acético (0,7 ml, al 40% en agua) y se purificó la disolución clara mediante una cromatografía HPLC semipreparativa sobre una columna $\mu\text{Bondapak}$ (agua/etanol 97/3, 5 ml/min) para proporcionar la 2-fluoroadenosina de [^{18}F] marcada 4.

EJEMPLO 2: PREPARACIÓN DE [^{18}F]FLUDARABINA.Esquema 6: Síntesis de la [^{18}F]fludarabina

45 QUÍMICA

La síntesis del precursor 7 puede obtenerse mediante protección y nitración de la 9(β -D-arabinofuranosil)-9H-purina según los protocolos descritos para su análogo de ribosa (artículo de Braendvang *et al.*, 2006, Synthesis, 18, 2993 y la solicitud internacional WO 2005/056571).

- De modo alternativo, el compuesto 7 también puede obtenerse partiendo de adenosina o de guanosina (esquema 6) (artículo de Gimisis *et al.*, 1998, Tetrahedron, 54, 573 y la solicitud internacional WO 9412514).



Esquema 7: Síntesis del precursor 7.

5 Los reactivos y rendimientos de las diferentes etapas de la síntesis del precursor 7 (esquema 7) son:

i: TBDMSCl, DABCO, AgNO₃, THF, 53%.

ii: Tf₂O, DMAP, DIPEA, Py, 67%.

iii: PhCOOK, DMSO, 96%.

10 iv: Bu₄NF, THF, 81%.

v: PhCOCl, Py, 95%.

vi: TBAN, TFAA, CH₂Cl₂, 45%.

Síntesis de la 6-*N,N*-dibenzoil-9-(2',3',5'-tri-*O*-benzoil-β-*D*-arabinofuranosil)-9H-purina 6.

15

Se añadió cloruro de benzoilo (750 μl, 6,49 mmol) a una disolución del compuesto 5 (181 mg, 0,82 mmol) en piridina anhidra (7 ml) y se calentó la mezcla a reflujo durante 6 h. Después de enfriamiento y extracción (CH₂Cl₂), se lavó la fase orgánica con NaHCO₃ acuoso saturado (10 ml) y salmuera (2 x 10 ml), y se secó sobre Na₂SO₄. La filtración y la evaporación a presión reducida produjeron el producto en bruto en forma de un sólido de color amarillo pálido, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (CH₂Cl₂:acetona, 95:5) para proporcionar 606 mg (96%) de 6.

20

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃): δ = 4,73 (m, 3 H, H_{4'} y H_{5'}); 5,91 (m, 2 H, H_{3'} y H_{2'}); 6,48 (d, 1 H, H_{1'}, *J* = 4,2 Hz); 7,20-7,39 (m, 15 H, H_{Ar}); 7,68-7,72 (m, 5 H, H_{Ar}); 7,96-8,00 (m, 5 H, H_{Ar}); 8,38 (s, 1 H, H₂); 8,58 (s, 1 H, H₈).

25 6-*N,N*-dibenzoil-9-(2',3',5'-tri-*O*-benzoil-β-*D*-arabinofuranosil)-2-nitro-9H-purina 7.

Se preparó una mezcla nitrada mediante la adición de anhídrido 2,2,2-trifluoroacético (160 μl, 1,15 mmol) durante 2 min a una disolución de nitrato de tetrabutilamonio (351 mg, 1,15 mmol) en cloruro de metileno seco (15 ml) a 0°C. Después de 45 min, se añadió la disolución a 6 (606 mg, 0,77 mmol) en cloruro de metileno seco (15 ml) a 0°C. Después de 14 h a temperatura ambiente (y protegida de la luz), se vertió la mezcla de reacción en una mezcla fría de agua (30 ml), de NaHCO₃ acuoso saturado (20 ml) y de CH₂Cl₂-Et₂O (1:2, 20 ml). Se extrajo la fase acuosa con CH₂Cl₂-Et₂O (1:2, 2 x 20 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con salmuera (2 x 20 ml), se secaron (Na₂SO₄), y se evaporaron a vacío (sin calentamiento por encima de 40°C). Se purificó el producto mediante cromatografía ultrarrápida (CH₂Cl₂-acetona 95:5) para producir 201 mg (45%) de 7.

35

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃): δ = 4,79 (m, 3 H, H_{4'} H_{5'}); 5,86 (m, 2 H, H_{3'} H_{2'}); 6,83 (d, 1 H, H_{1'}, *J* = 5,1 Hz); 7,21-7,47 (m, 15 H, H_{Ar}); 7,66-7,73 (m, 6 H, H_{Ar}); 7,95 (dd, 2 H, *J* = 1,4 y 7,8 Hz, H_{Ar}); 8,05 (dd, 2H, *J* = 1,4 y 7,8 Hz, H_{Ar}); 8,52 (s, 1 H, H₈).

40

¹³C-RMN (62,9 MHz, CDCl₃): δ = 63,5 (C_{5'}); 76,3 (C_{2'}); 77,1 (C_{3'}); 81,6 (C_{4'}); 84,7 (C_{1'}); 127,8 (C₅); 128,6; 128,9; 129,1; 129,2; 129,3; 129,5; 129,6; 129,8; 130,1; 130,2; 130,5; 133,7; 133,8; 133,9; 134,5; 134,6; 147,7 (C₈); 153,0 (C₆); 153,1 (C₂); 154,0 (C₄); 165,1 (C=O); 165,8 (C=O); 166,6 (C=O); 171,8 (2 x C=O).

RADIOQUÍMICA

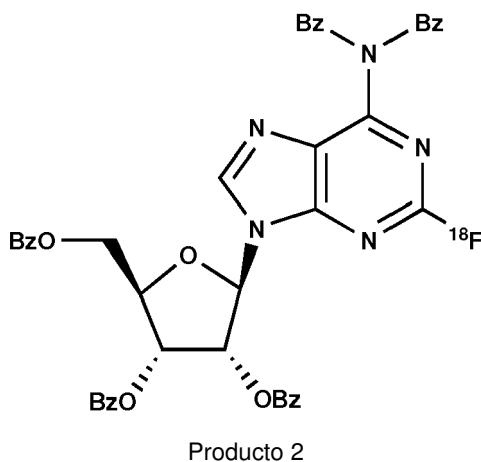
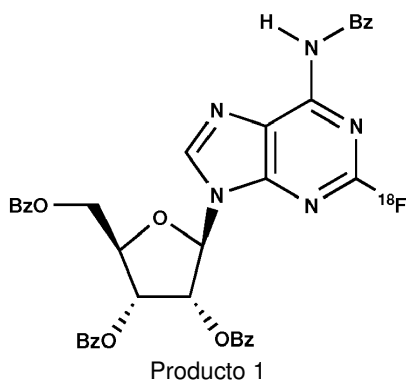
45

[¹⁸F]-FLUDARABINA:

Usando de 4,8 a 5,5 mg de 6-*N,N*-dibenzoil-9-(2',3',5'-tri-*O*-benzoil-β-*D*-arabinofuranosil)-2-nitro-9*H*-purina 7 y los procedimientos (A o B) descritos anteriormente, se obtuvo la [¹⁸F]-fludarabina con un rendimiento radioquímico global del 63% (corregida la disminución) aproximadamente 85 min después de la purificación mediante HPLC semipreparativa (agua/etanol 97/3, 5 ml/min).

EJEMPLO 3: EVOLUCIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN DE FLUORACIÓN EN FUNCIÓN DE LA SAL DE POTASIO USADA COMO FUENTE DE CATIONES.

Se efectúa la reacción de fluoración en DMSO a 140°C en presencia de sal de potasio (0,5-1 mg de K₂CO₃ o 3-5 mg de K₂SO₄) y de Kryptofix K2.2.2 (20 mg) usando 5 mg de precursor (2-nitropurina). Los productos de reacción obtenidos presentan la siguiente estructura:



El análisis de la mezcla de reacción se realiza mediante radio-CCM (SiO₂, eluyente CH₂Cl₂/acetona 95/5) a partir de una toma de muestras de 15-25 μl efectuada cada 5 minutos.

Se identifican los productos radiactivos mediante coelución con referencias no radiactivas (producto 1 R_f = 0,49; producto 2 R_f = 0,75; véase la figura 1).

La figura 2 muestra que en presencia de K₂SO₄, se forma el producto 1 (parcialmente desprotegido) de modo mayoritario durante la reacción de fluoración. La composición de la mezcla evoluciona en función del tiempo y el producto 1 se convierte principalmente en el mayoritario al cabo de 15 minutos en detrimento del producto 2 (desprotección progresiva del producto 2 en estas condiciones de reacción).

Cuando se realiza la reacción de fluoración en presencia de K₂CO₃, se forma el producto 2 (totalmente protegido) de modo mayoritario y su proporción permanece estable en el transcurso del tiempo (del 61 al 70%), tal como se presenta en la figura 3.

La figura 4 permite observar la influencia de la naturaleza de la sal de potasio (K₂SO₄ frente a K₂CO₃) sobre la formación del producto 1. El uso de K₂SO₄ permite obtener el producto 1 de modo mayoritario y después de 20 minutos de reacción, el producto 1 representa el 95% (razón 1/2 = 81/4) de los productos de fluoración.

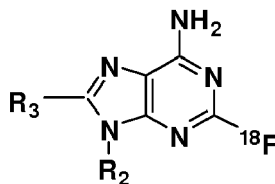
Bibliografía

- Artículo de Jacobson K.A. y Gao Z.-G. Nat. Rev. Drug Discovery 2006, 5, 247;
Solicitud internacional WO 03/099342;
Artículo de Robins M.J. y Uznanski B., 1981, Can. J. Chem. 59, 2608;
- 5 Artículo de Horti *et al.*, 2006, J. Labelled Compd. Radiopharm., 49, 811;
Solicitud internacional WO 2005/044312;
Artículo de Hocek *et al.*, 2005, Eur. J. Org. Chem. 14, 3026;
Solicitud de patente EP 1 956 013;
- 10 Artículo de Irie *et al.*, 1982, Int. J. Appl. Radiat. Isot. 33(6), 445;
Solicitud internacional WO 2005/056571;
Artículo de Wanner *et al.*, Med. Chem. Lett. 10, 2000b, 2141-2144;
Artículo de Wanner y Koomen, J. Chem. Soc., Perkin Trans 1, 2001, 1908-1915;
Artículo de Degati *et al.*, Tetrahedron lett., 41, 2000, 1291-1295;
- 15 Artículo de Nowak *et al.*, J. Org Chem. 70, 2005, 7455-7458;
Artículo de Ishido *et al.*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1977, 657-660;
Artículo de Braendvang *et al.*, 2006, Synthesis, 18, 2993;
Artículo de Gimisis *et al.*, 1998, Tetrahedron, 54, 573;
Solicitud internacional WO 94/12514.

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un derivado de 2-fluoro-purina marcado con el radioisótopo ^{18}F de fórmula



5

en la que

10

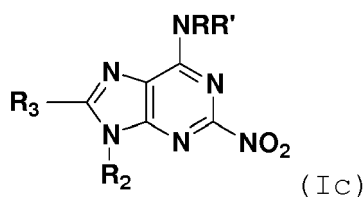
R_2 representa H, un grupo alquilo eventualmente sustituido, un grupo arilo eventualmente sustituido, un grupo furanosa eventualmente sustituido o un grupo piranosa eventualmente sustituido,

15

R_3 representa H, un grupo alquilo eventualmente sustituido, un grupo arilo eventualmente sustituido, un halógeno, un grupo $-\text{OR}_8$ o un grupo $-\text{SR}_8$, representando R_8 H, un grupo alquilo eventualmente sustituido o un grupo arilo eventualmente sustituido,

comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas sucesivas que consisten en:

- a) hacer reaccionar un derivado de 2-nitro-purina protegido de fórmula (Ic)



20

en la que

25

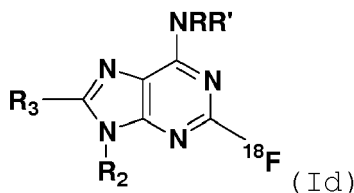
R y R' son grupos protectores, idénticos o diferentes, elegidos de un grupo alquilo eventualmente sustituido, un grupo acilo eventualmente sustituido, un grupo arilo eventualmente sustituido, un grupo bencilo eventualmente sustituido, un grupo benzoilo eventualmente sustituido, un grupo electroattractor, un grupo sulfonilo eventualmente sustituido, un grupo tritilo, un grupo sililo, un grupo terc-butoxicarbonilo (BOC), un grupo fluorenilmetoxicarbonilo (FMOC) y un derivado de imida o un derivado de imina, y

30

R_2 y R_3 son tal como se definieron anteriormente, con una fuente de iones fluoruro F^- marcados con ^{18}F en un disolvente que es acetonitrilo, a una temperatura de 55 a 60°C y durante un periodo comprendido entre 1 y 30 min, para obtener un derivado de 2- ^{18}F fluoro-purina protegido y eventualmente un derivado de 2- ^{18}F fluoro-purina parcialmente desprotegido,

35

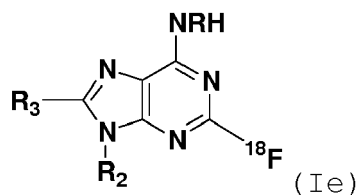
siendo dicho derivado de 2- ^{18}F fluoro-purina protegido de fórmula (Id)



40

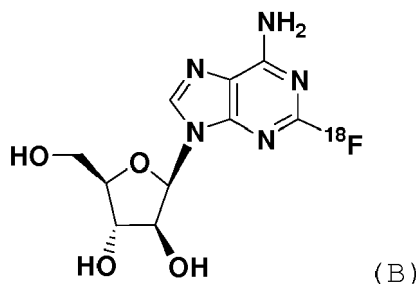
siendo R_2 , R_3 , R y R' tal como se definieron anteriormente,

siendo dicho derivado de 2- ^{18}F fluoro-purina parcialmente desprotegido de fórmula (Ie)



siendo R_2 , R_3 y R tal como se definieron anteriormente,

- 5 b) desproteger dicho derivado de 2-[^{18}F]fluoro-purina protegido y dicho derivado de 2-[^{18}F]fluoro-purina
parcialmente desprotegido eventualmente obtenido para obtener el derivado de 2-[^{18}F]fluoro-purina
10 haciendo reaccionar dicho derivado de 2-[^{18}F]fluoro-purina protegido y dicho derivado de 2-[^{18}F]fluoro-purina
parcialmente desprotegido eventualmente obtenido con alcohol, seguido de amoniaco acuoso y después
calentando a una temperatura comprendida entre 50 y 90°C durante un periodo comprendido entre 5 y
45 min.
2. Procedimiento de preparación según la reivindicación 1, caracterizado porque la fuente de iones fluoruro
15 marcados con ^{18}F puesta en práctica en la etapa de fluoración comprende dichos iones fluoruro y un
contraión.
3. Procedimiento de preparación según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha etapa (a) consiste en
20 hacer reaccionar un derivado de 2-nitro-purina protegido de fórmula (Ic) tal como se define en la
reivindicación 1 con una fuente de iones fluoruro F^- marcados con [^{18}F], con K_2SO_4 como contraión, para
preparar un derivado de 2-[^{18}F]fluoro-purina parcialmente desprotegido de fórmula (Ie) tal como se define en
la reivindicación 1.
4. Uso de un compuesto de fórmula (B)



- 25 o de una sal del mismo
- o de una composición farmacéutica o de diagnóstico, que comprende al menos un compuesto de fórmula
(B) en un vehículo farmacéuticamente aceptable
- 30 para estudios de obtención de imágenes mediante PET aplicados al campo de la leucemia linfóide crónica.
5. Compuesto o composición según la reivindicación 4, para uso en la evaluación del tratamiento de la
35 leucemia linfóide crónica y el mapeo *in vivo* de células hematopoyéticas malignas.

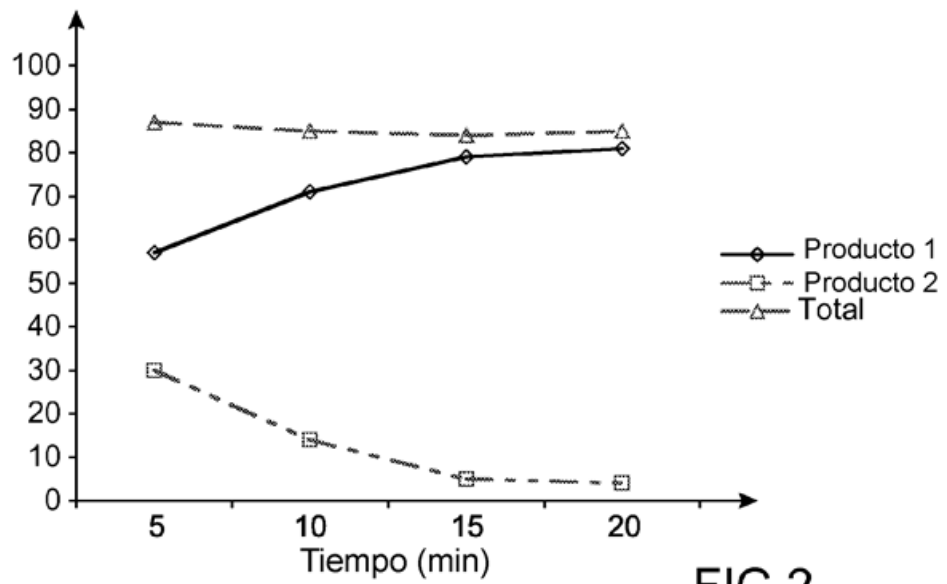
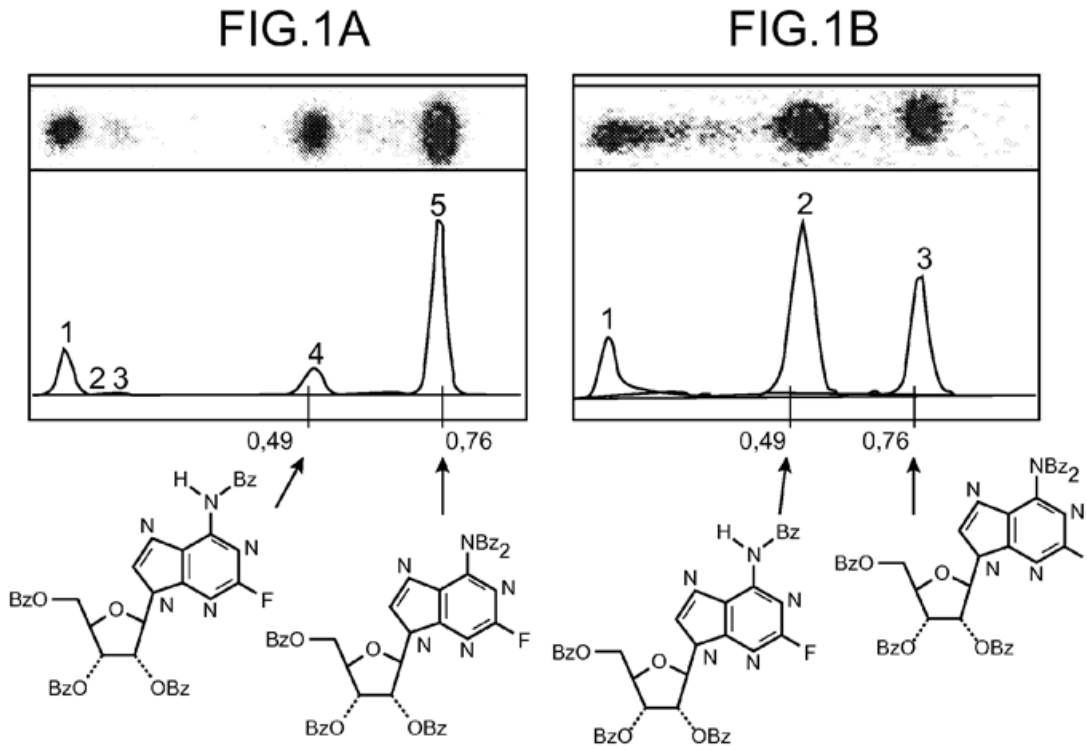


FIG.2

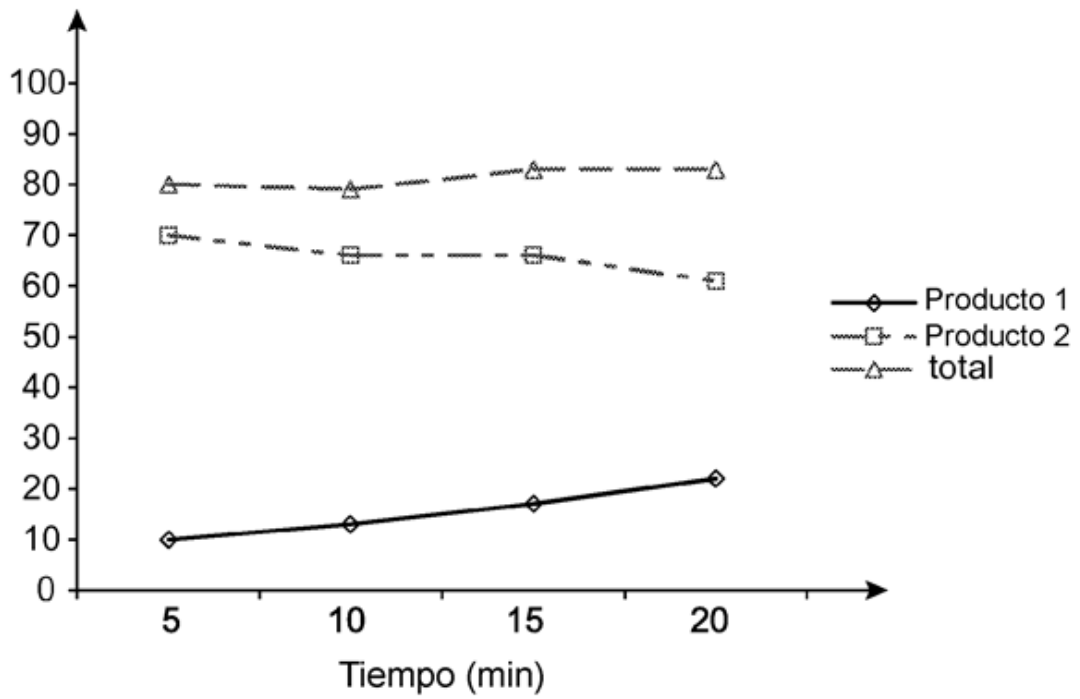


FIG. 3

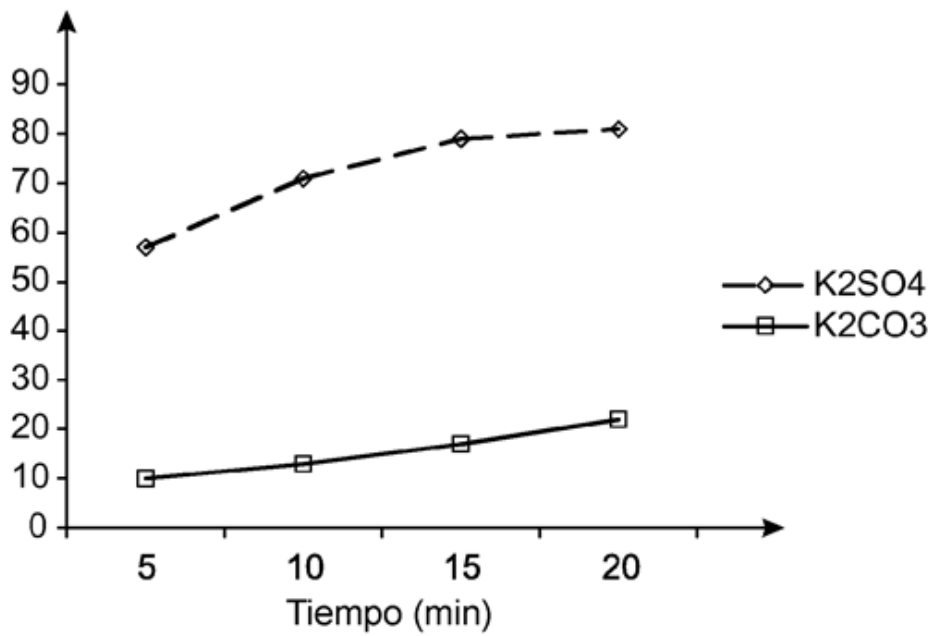


FIG. 4