

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 627**

51 Int. Cl.:

**C07D 475/04** (2006.01)

**C07B 59/00** (2006.01)

**A61K 31/522** (2006.01)

**A61K 51/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2013 PCT/EP2013/059584**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13167653**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2013 E 13721738 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2864329**

64 Título: **Análogos de folato/antifolato marcados con <sup>18</sup>F**

30 Prioridad:

**08.05.2012 EP 12167126**

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

**11.03.2019**

73 Titular/es:

**MERCK & CIE (100.0%)  
Im Laternenacker 5  
8200 Schaffhausen, CH**

72 Inventor/es:

**SCHIBLI, ROGER;  
MOSER, RUDOLF;  
MÜLLER, CRISTINA MAGDALENA;  
AMETAMEY, SIMON MENSAH;  
BETZEL, THOMAS y  
GROEHN, VIOLA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**Observaciones :**

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

**ES 2 703 627 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

Análogos de folato/antifolato marcados con  $^{18}\text{F}$

## Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos radiofármacos análogos de  $^{18}\text{F}$ -folato/antifolato, en los que el grupo fenilo dentro de una estructura folato se ha sustituido por una  $^{18}\text{F}$ -heterociclo, sus precursores, un método para su preparación, así como su uso en el diagnóstico de una célula o población de células que expresan un receptor folato y el seguimiento del cáncer y enfermedades inflamatorias y autoinmunes y su tratamiento.

## Antecedentes

10 El reconocimiento específico de células para la administración de restos efectores como agentes diagnósticos o terapéuticos es un campo en el que se ha investigado ampliamente, lo que ha llevado al desarrollo de aplicaciones médicas diagnósticas y/o terapéuticas no invasivas. En especial, en el campo de los procedimientos y tratamientos de medicina nuclear, en los que se emplean materiales radiactivos que emiten radiaciones electromagnéticas como rayos  $\gamma$  o radiación de emisión de partículas, es necesaria la localización selectiva de estos materiales radiactivos en células o tejidos diana para conseguir bien una alta intensidad de señal para la visualización de tejidos  
15 específicos, evaluar una enfermedad y/o controlar los efectos de los tratamientos, o bien una dosis de radiación elevada, para administrar dosis adecuadas de radiación ionizante a una localización específica de la enfermedad, sin el riesgo de lesiones por radiación/radiotoxicidad en otros tejidos, por ejemplo tejidos sanos. Por tanto, es de crucial interés determinar y evaluar las estructuras específicas de células y, en particular, las estructuras que están presentes en caso de cáncer (es decir, tumores) o enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como receptores,  
20 antígenos, haptenos y similares que pueden ser dianas específicas de los respectivos vehículos biológicos.

El receptor de folato (FR) se ha identificado como una de estas estructuras (Low, *Acc Chem Res.* 2008; 41:120-9). El FR es una proteína asociada a membrana de alta afinidad ( $K_D < 10^{-9}$  M). En tejidos y órganos normales, la expresión del FR está muy limitada exclusivamente a unos pocos órganos (p. ej., riñón, pulmones, plexo coroideo y placenta), donde se encuentra principalmente en la superficie luminal de las células epiteliales y, por tanto, no es  
25 accesible al folato de la circulación. El FR alfa se sobreexpresa con frecuencia en una amplia variedad de tipos celulares específicos, como tumores epiteliales (p. ej., ovárico, cuello uterino, endometrio, mama, colorrectal, riñón, pulmón, véase por ejemplo, Parker y cols., *Anal. Biochem.* 2005; 2:284-293), mientras que el FR beta se sobreexpresa con frecuencia en células de leucemia (aprox. el 70 % de las leucemias mieloides agudas [LMA] son positivas para FR beta). Por tanto, ambos pueden utilizarse como marcadores tumorales valiosos para el reconocimiento selectivo de tumores (Elnakat y Ratnam, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56:1067-84). Además, recientemente se ha descubierto que los macrófagos sinoviales activados (pero no en reposo) en pacientes diagnosticados de artritis reumatoide poseen un FR beta funcionalmente activo (Nakashima-Matsushita y cols.,  
30 *Arthritis & Rheumatism*, 1999, 42(8): 1609-16). Por tanto, los macrófagos activados pueden ser reconocidos selectivamente con conjugados de folato en articulaciones artríticas, una capacidad que abre posibilidades para el diagnóstico y tratamiento de la artritis reumatoide (Paulos y cols. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56:1205-17). Otras patologías inflamatorias que normalmente están enriquecidas en macrófagos positivos para receptores de folato incluyen artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, sarcoidosis, glomerulonefritis, osteoartritis, rechazo de trasplante de órganos, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, diabetes, lesión por isquemia/reperusión, traumatismo por impacto, infección microbiana, osteolisis protésica, esteatosis hepática y esclerosis múltiple (Piscaer y cols. 2011, *Arthritis & Rheumatism* 63, 1898; Henne y cols. 2012, *Mol Pharm*, 9:1435-40; Ayala-López y cols. 2010, *J Nucl Med* 51, 768). Los agentes terapéuticos dirigidos a folato suponen una gran promesa para el desarrollo de modalidades de tratamiento no tóxicos muy potentes para las mismas enfermedades (Hansen M.J y cols., *Targeted Drug Strategies for Cancer and Inflammation*, Springer Science+Business Media, 2011, 181-193). El FR beta también se sobreexpresa en macrófagos asociados a tumores (MAT). Los MAT muestran principalmente funciones protumorales, favoreciendo la supervivencia, proliferación y diseminación de las células tumorales. Los estudios clínicos han mostrado una correlación entre los recuentos de MAT y un mal pronóstico para, entre otros, los cánceres de mama, próstata, ovario, cuello uterino, endometrio, esófago, páncreas, glioblastoma y vejiga (Kurahara H. y cols., *Ann Surg Oncol.*, 2012, 16 de febrero, Nagai T. y cols., *Cancer Immunol Immunother* (2009) 581577–1586, Puig-Kroeger A. y cols. *Cancer Res* 2009; 69 (24). 15 de diciembre, 2009, Turk M. J. y cols., *Cancer Letters* 213 (2004) 165–172). Por tanto, los macrófagos asociados a tumores pueden reconocerse selectivamente con conjugados de folato. Esto abre posibilidades para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Otra estructura específica de células de este tipo es el transportador de folato acoplado a protones (PCFT). El PCFT se expresa en el intestino delgado proximal, donde media en la absorción del folato a pH ácido (Qiu y cols., *Cell.* 2006, 1 de diciembre; 127(5):917-28) y en tejidos como hígado y riñón, que no experimentan condiciones de pH bajo (Zhao y cols., *Expert Rev Mol Med.* 2009, 28 de enero; 11:e4). El pH intersticial de los tumores sólidos es, a menudo, ácido (Helmlinger y cols., *Nat Med.* febrero de 1997; 3(2):177-82; Raghunand y cols., *Biochem Pharmacol.* 1999, 1 de febrero; 57(3):309-12), lo que favorece el transporte de PCFT. Se identificó una ruta de transporte a bajo

pH destacada en 29 de las 32 líneas celulares de tumores sólidos humanos (Zhao y cols., Clin Cancer Res. 2004, 15 de enero; 10(2):718-27), y se notificaron altos niveles de transcritos de PCFT humano (hPCFT) en una amplia variedad de tumores humanos (Kugel Desmoulin y cols., Am Assoc Cancer Res 51:1103). La determinación de la función de hPCFT en la actividad antifolato y en la selectividad tumoral sigue en desarrollo. Previamente se ha descrito el transporte de antifolatos clásicos mediante PCFT (Zhao y cols., Mol Pharmacol., septiembre de 2008; 74(3):854-62. Epub 2008 4 de junio). Un agente de reconocimiento específico del transportador de folato acoplado a protones abre posibilidades para el diagnóstico y tratamiento de los tumores.

Los folatos y sus derivados se han estudiado intensivamente durante los últimos 15 años como agentes de reconocimiento específico para la administración de agentes terapéuticos y/o diagnósticos a poblaciones celulares portadoras de receptores de folato para conseguir una concentración selectiva de agentes terapéuticos y/o diagnósticos en dichas células en relación con las células normales.

Se han conjugado diversas sondas al ácido fólico que se han evaluado a nivel (pre)clínico, como radiofármacos de folato (Leamon y Low, Drug Discov. Today 2001; 6:44-51 y Jammaz y cols, J. Label Compd. Radiopharm. 2006; 49:125-137; Müller & Schibli, 2011 J. Nucl. Med. 52, 1; Müller, Current Pharm Design, 2012), conjugados de folato con agentes quimioterapéuticos (Leamon y Reddy, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1127-41; Leamon y cols., Bioconjugate Chem. 2005; 16:803-11), proteínas y toxinas proteicas (Ward y cols. Drug Target., 2000; 8:119-23; Leamon y cols., J. Biol. Chem. 1993; 268:24847-54; Leamon y Low, J. Drug Target. 1994; 2:101-12), oligonucleótidos complementarios (Li y cols., Pharm. Res. 1998; 15:1540-45; Zhao y Lee, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1193-204), liposomas (Lee y Low, Biochim. Biophys. Acta-Biomembr. 1995; 1233:134-44; Gabizon y cols., Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1177-92), moléculas de hapteno (Paulos y cols., Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1205-17), medios de contraste para RMN (Konda y cols., Magn. Reson. Mat. Phys. Biol. Med. 2001; 12:104-13) etc.

Los radiofármacos de folato pueden ser en particular muy útiles para mejorar el diagnóstico y la evaluación de la eficacia del tratamiento antineoplásico. Esto puede incluir la evaluación y/o predicción de una respuesta al tratamiento y, por consiguiente, la mejora de la dosimetría de radiación. Una técnica de visualización típica es la tomografía por emisión de positrones (PET), donde se administra a un sujeto un radionucleido que emite positrones y cuando se produce la desintegración radioactiva, los rayos gamma resultantes de la aniquilación de los positrones se detectan mediante el escáner de PET. Debido a su alta sensibilidad y a métodos de cuantificación bien elaborados, la PET se ha establecido *per se* como una de las tecnologías de estudio por imagen funcional más sofisticadas para evaluar la captación regional y la afinidad de ligandos o sustratos metabólicos en el cerebro y en otros órganos y, por tanto, proporciona medidas de estudio por imagen basadas en la actividad metabólica. Pueden utilizarse radiofármacos para PET adecuados basados en un isótopo metálico en combinación con un quelante para atrapar el metal (p. ej.,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ) o con un isótopo unido covalentemente, típicamente isótopos emisores de positrones con semividas cortas como  $^{11}\text{C}$  (aprox. 20 min),  $^{13}\text{N}$  (aprox. 10 min),  $^{15}\text{O}$  (aprox. 2 min) y  $^{18}\text{F}$  (aprox. 110 min).

En las últimas décadas se han sintetizado varios radiofármacos de folato a base de quelatos, en particular derivados de  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y  $^{67/8}\text{Ga}$  que se han evaluado con éxito como agentes diagnósticos para el estudio por imagen de tumores positivos para el receptor de folato usando SPECT o PET (véase, por ejemplo, Siegel y cols., J. Nucl. Med. 2003, 44:700; Müller y cols., J. Organomet. Chem. 2004, 689:4712; Mathias y cols., Nucl. Med. Biol. 2003, 30(7):725; documento WO 2008/125618; Müller y cols., 2011, Nucl. Med. & Biol. 38, 715).

Más recientemente, se han descrito radiofármacos de folato portadores de un nucleido  $^{18}\text{F}$  emisor de positrones unido covalentemente (véase, por ejemplo, Bettio y cols., J. Nucl. Med., 2006, 47(7), 1153; documentos WO 2006/071754, WO 2008/098112, WO 2008/125613, WO 2008/125615, WO 2008/125617, WO 2010/040854; Ross y cols. 2010, J Nucl. Med., 51, 1756; Fischer y cols. 2012, Bioconjug. Chem.) y se ha demostrado que son más adecuados para el estudio por imagen mediante PET debido a sus excelentes características de captación de imágenes que podrían cubrir todas las consideraciones mencionadas anteriormente.

Aún más, aunque los radiofármacos de folato  $^{18}\text{F}$  conocidos muestran resultados prometedores, siguen siendo necesarios compuestos que muestren alta especificidad por FR y sean adecuados para aplicaciones clínicas de rutina y aún pueden obtenerse de manera eficaz y versátil con altos rendimientos radioquímicos.

Los solicitantes han encontrado ahora que los derivados de folato en los que el grupo fenilo del esqueleto de folato se ha sustituido por un heterociclo pueden sustituirse con un nucleido  $^{18}\text{F}$  de manera eficaz y versátil y con altos rendimientos radioquímicos. Los compuestos análogos de  $^{18}\text{F}$ -folato/antifolato obtenidos muestran una alta selectividad por el tejido positivo para FR y, por tanto, puede concluirse que estas modificaciones en el esqueleto del folato no tienen efecto negativo sobre su afinidad de unión al receptor de folato.

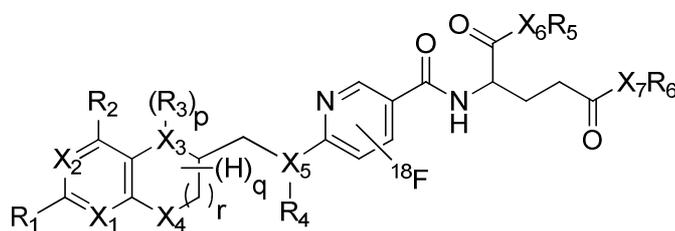
Por tanto, la presente invención se refiere a nuevos radiofármacos análogos de  $^{18}\text{F}$ -folato/antifolato, en los que el grupo fenilo, que conecta el heterociclo pirimidina condensado a través de enlazadores adecuados (como un

enlazador-CH<sub>2</sub>-NH en la posición C6 de un heterociclo de pteridina) con la porción aminoácido dentro de las estructuras del folato, ha sido sustituido por un heterociclo de 6 átomos sustituido con <sup>18</sup>F, sus precursores, un método para su preparación, así como su uso en el diagnóstico de una célula o población de células que expresan un receptor folato y el seguimiento del cáncer y enfermedades inflamatorias y autoinmunes y su tratamiento.

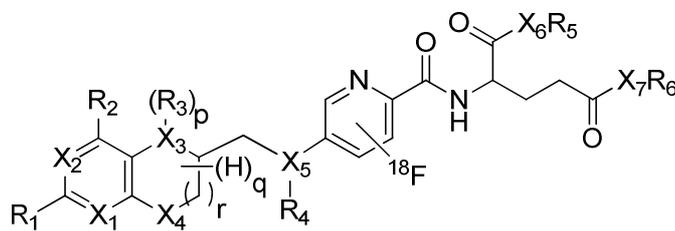
5 **Resumen de la invención**

La presente invención se refiere en un primer aspecto a nuevos radiofármacos análogos de <sup>18</sup>F-folato/antifolato y sus precursores (también denominados a partir de ahora compuestos de la invención), en los que el grupo fenilo, que conecta el heterociclo de pirimidina condensado con la porción aminoácido se ha sustituido por un heterociclo de 6 átomos sustituido con <sup>18</sup>F.

10 Más específicamente, la presente invención se refiere a compuestos de fórmulas IVa o IVb,



IVa



IVb

15 donde

X<sub>1</sub> a X<sub>5</sub> son N,

X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub> son O,

R<sub>1</sub> es -OH, -NH<sub>2</sub>

20 R<sub>2</sub> es -NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>, donde R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> se seleccionan independientemente entre sí a partir de H, formilo, alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR', -CH=CH-, -C≡C-, donde R' es H, alquilo C1-C6,

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> son independientemente entre sí H, formilo, iminometilo, nitroso, alquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, alcanoílo C1-C12, alcanoílo C1-C12 halosustituido,

25 R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> son independientemente entre sí H o un alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR', -CH=CH-, -C≡C-, donde R' es H, alquilo C1-C6,

p es 0, 1,

q tiene un valor de 1 a 7, y

r es 1.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para su preparación. En una realización preferida los radiofármacos análogos de  $^{18}\text{F}$ -folato/antifolato de la invención se obtienen mediante el radiomarcaje con  $^{18}\text{F}$  de precursores adecuados (y los posteriores pasos de desprotección).

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso en diagnóstico de una célula o población de células que expresan un receptor de folato y al seguimiento del cáncer y del tratamiento *in vitro* o *in vivo* del cáncer o seguimiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la artritis reumatoide y su tratamiento.

10 En una realización, la presente invención se refiere a usos de radiofármacos análogos de  $^{18}\text{F}$ -folato/antifolato de la invención para el diagnóstico por imagen de una célula o población de células que expresan un receptor de folato.

Más específicamente, la presente invención incluye métodos para el diagnóstico por imagen de una célula o población de células que expresan un receptor de folato, que incluye por ejemplo, métodos para la detección *in vitro* de una célula que expresa el receptor de folato, por ejemplo una célula tumoral o un macrófago activo, en una muestra de tejido. Estos métodos también pueden llevarse a cabo *in vivo*.

Por tanto, en una realización adicional la presente invención se refiere a usos de radiofármacos análogos de  $^{18}\text{F}$ -folato/antifolato de la invención para su administración conveniente y eficaz a un sujeto que necesita un diagnóstico por imagen y/o el seguimiento del tratamiento del cáncer o enfermedades inflamatorias y autoinmunes. El sujeto de los métodos de la presente invención es preferiblemente un mamífero, como un animal o un humano, preferiblemente un humano.

Estos métodos de la invención pueden realizarse en combinación con cualquier otro método de diagnóstico o tratamiento de cáncer o enfermedades inflamatorias y autoinmunes que incluyen métodos que usan otros agentes diagnósticos y/o terapéuticos ya desarrollado y utilizando tomografía axial computarizada (TAC), resonancia magnética (RM), resonancia magnética funcional (RMf), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), adquisición de imágenes óptica y ecografía.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la misma y de las reivindicaciones.

### Breve descripción de la figuras

30 Figura 1A, 1B, 1C. Esquemas de síntesis representativos para la preparación de ácidos 3'-aza-fólico  $^{18}\text{F}$ -sustituido con ácido 6-aminonicotínico ( $\text{X}$ )<sub>n</sub>-sustituido como heterociclo. ( $\text{X}$ )<sub>n</sub> representa uno o más sustituyentes para la atracción de electrones para la introducción de  $^{18}\text{F}$ , por ejemplo, Cl, Br,  $\text{NO}_2$ , F.

Figura 2. Estabilidad del ácido 3'-aza-2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorofólico en A: plasma de sangre humana, 4 h; B: glutatión humano, 1 h; C: microsomas de ratón, 1 h; D: microsomas humanos, 1 h.

Figura 3. Control de calidad del ácido 3'-aza-2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorofólico tras la purificación mediante HPLC.

35 Figura 4. Estudios metabólicos del ácido 3'-aza-2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorofólico, cromatogramas de radio-UPLC de A: control de calidad; B: muestra de sangre 5 min p.i.; C: muestra de sangre 30 min p.i.; D: tumor 30 min p.i.; E: orina 30 min p.i.; F: hígado 30 min p.i.

Figura 5. Resultados de los estudios de captación celular del ácido 3'-aza-2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorofólico: captación total (azul), fracción internalizada (amarillo) y captación en condiciones de bloqueo (rojo/no visible).

40 Figura 6. Imágenes de PET (proyección de intensidad máxima) de ratones portadores de tumores KB 120-150 minutos después de la inyección de ácido 3'-aza-2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorofólico solo (A) y después de la inyección de ácido fólico en exceso y ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3'-aza-fólico (B).

45 Figura 7. Imágenes de PET (proyección de intensidad máxima) de ratones portadores de tumores KB 120-150 minutos después de la inyección de ácido 3'-aza-2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorofólico solo (A) y después de la inyección de ácido fólico en exceso y en combinación con pemetrexed previamente inyectado (B).

### Descripción detallada de la invención

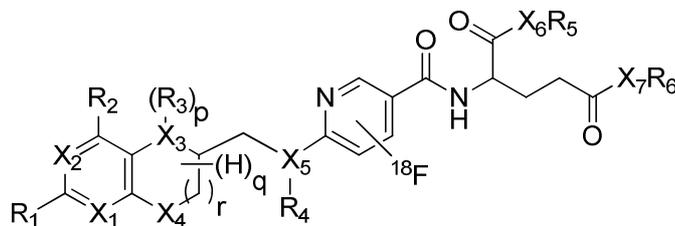
La presente invención se refiere en un primer aspecto a nuevos radiofármacos análogos de  $^{18}\text{F}$ -folato/antifolato (también denominados a partir de ahora compuestos de la invención) y sus precursores, en los que el grupo fenilo, es decir, el grupo fenilo del grupo aminobenzoílo que une el heterociclo de pirimidina condensado con la porción aminoácido (ácido glutámico) se ha sustituido por un heterociclo de 6 átomos sustituido con  $^{18}\text{F}$  que comprende un N-heteroátomo.

El término heterociclo según usa para las estructuras de folato/antifolato de este documento se refiere a un heterociclo insaturado que lleva un átomo de N, es decir, un anillo de piridina. El N-heterociclo está 1,4-unido (o en posición para) a través de un enlazador amino a la unidad del heterociclo de pirimidina condensado (o sus derivados) y través de un grupo carbonilo a la unidad de aminoácido (ácido glutámico) para obtener un aza-folato y derivados del mismo según la invención. Según se usa en este documento, un «heterociclo de pirimidina condensado» incluye una pirimidina fusionada con un heterociclo adicional de 6 átomos, es decir, un biciclo pteridina. Según se usa en este documento, el término «aminoácido» se refiere a ácido glutámico.

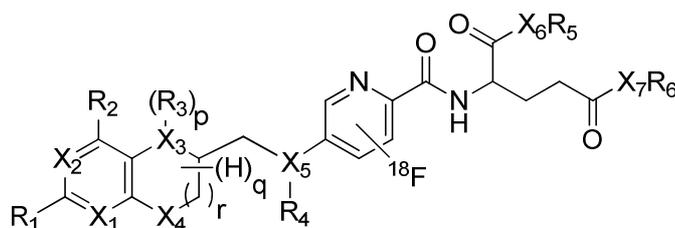
Se entiende que los derivados de un compuesto  $^{18}\text{F}$ -folato/antifolato de la invención pueden incluir variaciones adicionales en la unidad del heterociclo pirimidina, que incluye un estado de oxidación diferente del anillo de pteridina para obtener formas más reducidas como un dihidrofolato o un tetrahydrofolato, así como el tipo de un sustituyente de carbono en las posiciones N5 y/o N10, el patrón de sustitución de la diversas unidades y otros derivados.

Como se indicó anteriormente en este documento, en el caso de los compuestos  $^{18}\text{F}$ -folato/antifolato de la invención que llevan un heterociclo de 6 átomos, se prefieren N-heterociclos (también denominados aza-folatos). Los representantes preferidos de dichos aza-folatos según se usa en este documento se basan en un esqueleto de aza-folato, es decir, ácido N-[4[[[2-amino-1,4-dihidro-4-oxo-6-pteridinil)metil]amino]-azaheterocicloil]-glutámico, donde azaheterocicloilo se refiere a derivados 2'- o 3'-piridinilo del mismo, e incluye ácido aza-fólico opcionalmente sustituido, ácido aza-folínico y pteridinas que se unen al receptor de folatos, como por ejemplo, tetrahydropterinas, dihidro-aza-folatos, tetrahydro-aza-folatos.

En una realización en particular, los nuevos radiofármacos análogos de folato/antifolato son compuestos de fórmula IVa o IVb,



IVa



IVb

donde

X<sub>1</sub> a X<sub>5</sub> son N,

X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub> son O,

R<sub>1</sub> es -OH, -NH<sub>2</sub>

5 R<sub>2</sub> es -NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>, donde R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> se seleccionan independientemente entre sí a partir de H, formilo, alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR', -CH=CH-, -C≡C-, donde R' es H, alquilo C1-C6,

10 R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> son independientemente entre sí H, formilo, iminometilo, nitroso, alquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, alcanoilo C1-C12, alcanoilo C1-C12 halosustituido,

R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> son independientemente entre sí H o un alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR', -CH=CH-, -C≡C-, donde R' es H, alquilo C1-C6,

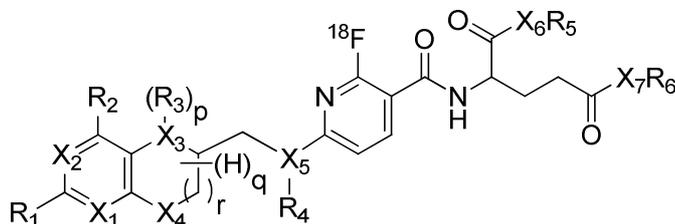
15 p es 0, 1,

q tiene un valor de 1 a 7, y

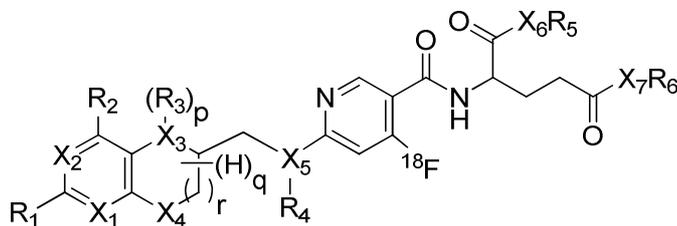
r es 1.

Las realizaciones preferidas de los compuestos de fórmula IVa y IVb incluyen compuestos de fórmulas IVc, IVd e IVe,

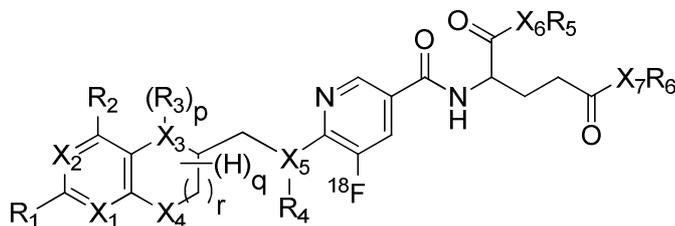
20



IVc



IVd



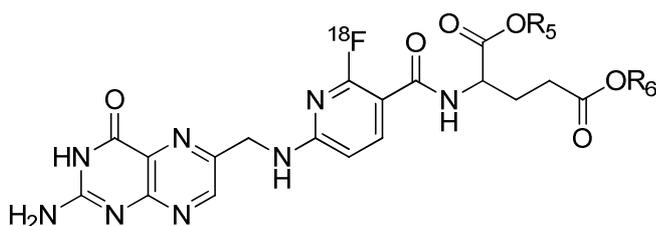
IVe

donde

X<sub>1</sub> a X<sub>7</sub>, R<sub>1</sub> a R<sub>9</sub>, R', n, p, q y r se definen como anteriormente en este documento.

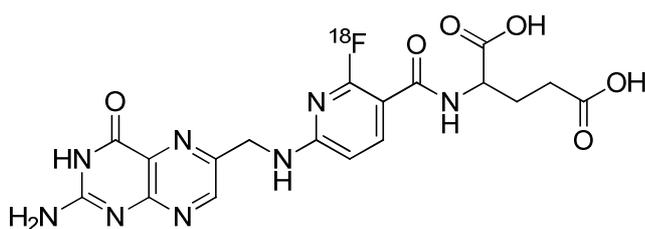
- 5 Las realizaciones especialmente preferidas de compuestos de fórmulas IVa a IVe incluyen compuestos, donde por ejemplo, X<sub>1</sub> a X<sub>5</sub> son N, R<sub>1</sub> es NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> es O, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son ambos H, p es 0 y q es 1.

Por tanto, en una realización específica adicional, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmulas IVf e IVg



IVf

10



IVg

donde

- 15 R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> son independientemente entre sí H o un alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR', -CH=CH-, -C≡C-, donde R' es H, alquilo C1-C6.

- 20 En realizaciones específicas adicionales los grupos R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> preferiblemente pueden ser independientemente entre sí H, formilo, iminometilo, nitroso, alquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, alcanóilo C1-C12, alcanóilo C1-C12 halosustituido. Más preferiblemente, los grupos R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> son independientemente entre sí H, metilo o formilo.

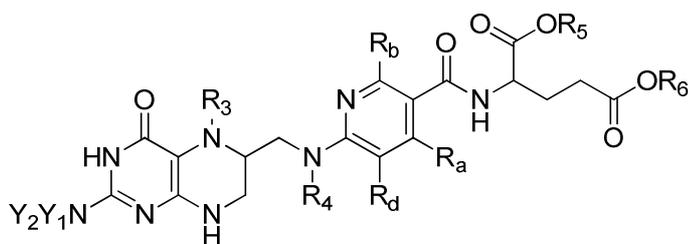
5 En realizaciones específicas adicionales, los grupos  $R_5$ ,  $R_6$  según aparecen en todos los compuestos de la invención son independientemente entre sí H o un alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o  $NO_2$ , y donde uno o más de los grupos  $CH_2$  no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por  $-O-$ ,  $-CO-$ ,  $-CO-O-$ ,  $-CO-NR'$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-C\equiv C-$ , donde  $R'$  es H, alquilo  $C_1$ - $C_6$ . Más preferiblemente, los grupos  $R_5$ ,  $R_6$  son independientemente entre sí H, metilo, etilo o terc-formilo.

Se entiende que las abreviaturas «N» y «C» son representativas de todos los grados de saturación posibles, es decir, N incluye enlaces  $-NH-$  y  $-N=$  y C incluye enlaces  $-CH_2-$  y  $-CH=$ .

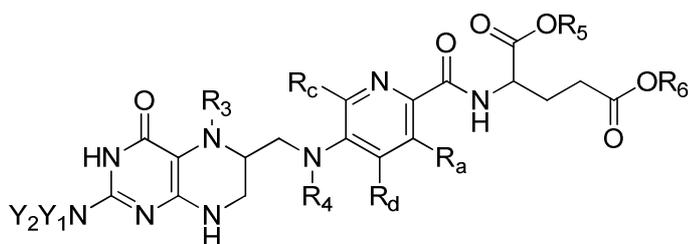
10 También se entiende que  $(H)_q$  representa todos los sustituyentes de H en el anillo indicado (es decir, en  $X_3$ ,  $C_6$ ,  $C_7$  y  $X_4$ ). Por ejemplo  $q = 5$  para un análogo no sustituido completamente saturado ( $X_3 = X_4 = N$ ,  $p = 0$ ) o  $q = 7$  para un análogo 5,8-dideaza no sustituido completamente saturado ( $X_3 = X_4 = C$ ,  $p = 0$ ) y  $q = 1$  para un análogo completamente insaturado con  $X_3 = X_4 = N$ ,  $p = 0$ .

Las realizaciones preferidas de compuestos de la invención incluyen compuestos, donde por ejemplo,  $X_1$  a  $X_5$  son N,  $R_1$  es  $NY_1Y_2$ ,  $R_2$  es O,  $p$  es 1 y  $q$  es 3.

15 Por tanto, en una realización específica adicional la presente invención se refiere a un compuesto de fórmulas IXa, IXb,



IXa



IXb

20

donde

$R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$ ,  $R_d$  son independientemente entre sí  $^{18}F$  o H, a condición de que uno de  $R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$ ,  $R_d$  sea  $^{18}F$ ,

$R_3$ ,  $R_4$  son independientemente entre sí H, formilo, iminometilo, nitroso, alquilo  $C_1$ - $C_{12}$ , alcoxi  $C_1$ - $C_{12}$ , alcanóilo  $C_1$ - $C_{12}$ , alcanóilo  $C_1$ - $C_{12}$  halosustituido,

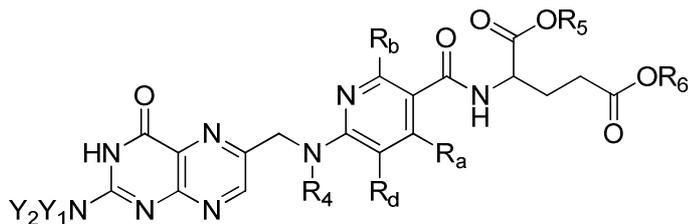
25  $R_5$ ,  $R_6$  son independientemente entre sí H o un alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o  $NO_2$ , y donde uno o más de los grupos  $CH_2$  no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por  $-O-$ ,  $-CO-$ ,  $-CO-O-$ ,  $-CO-NR'$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-C\equiv C-$ , donde  $R'$  es H o alquilo  $C_1$ - $C_6$ , y

30  $Y_1$ ,  $Y_2$  se seleccionan independientemente entre sí a partir de H, formilo o alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o  $NO_2$ , y donde uno o más de los

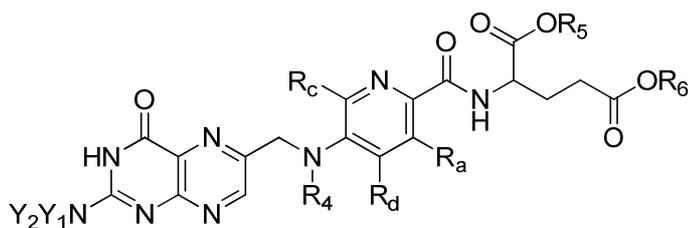
grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR', -CH=CH-, -C≡C-, donde R' es H o alquilo C1-C6.

Las realizaciones preferidas de compuestos de la invención también incluyen compuestos, donde por ejemplo, X<sub>1</sub> a X<sub>5</sub> son N, R<sub>1</sub> es NY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> es O, p es 0 y q es 1.

- 5 Por tanto, en una realización específica adicional la presente invención se refiere a un compuesto de fórmulas XIIa, XIIb,



XIIa



XIIb

10

donde

R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>c</sub>, R<sub>d</sub> son independientemente entre sí <sup>18</sup>F o H, a condición de que uno de R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>c</sub>, R<sub>d</sub> sea <sup>18</sup>F,

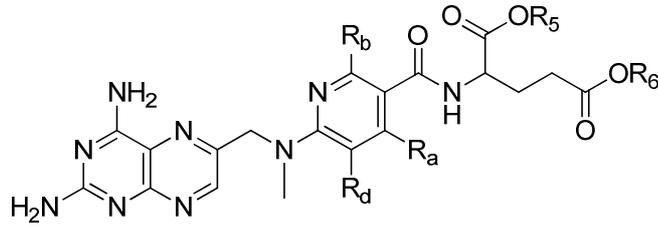
R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> son independientemente entre sí H, formilo, iminometilo, nitroso, alquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, alcanoílo C1-C12, alcanoílo C1-C12 halosustituido,

- 15 R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> son independientemente entre sí H o un alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR', -CH=CH-, -C≡C-, donde R' es H o alquilo C1-C6, y

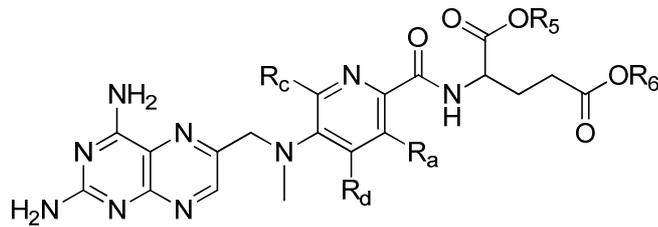
- 20 Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre sí a partir de H, formilo o alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR', -CH=CH-, -C≡C-, donde R' es H o alquilo C1-C6.

Otras realizaciones son compuestos de la invención donde X<sub>1</sub> a X<sub>5</sub> son N, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son NH<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> es H, R<sub>4</sub> es CH<sub>3</sub>, p es 0 y q es 1.

- 25 Por tanto, en una realización específica adicional la presente invención se refiere a un compuesto de fórmulas XVa, XVb,



XVa



XVb

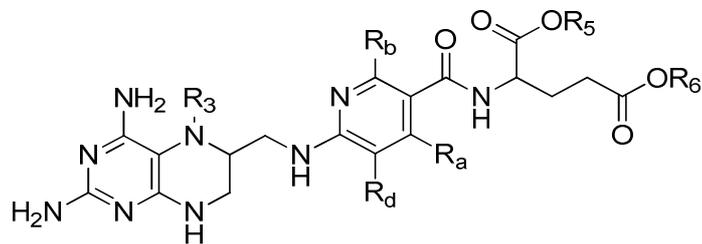
5 donde

R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>c</sub>, R<sub>d</sub> son independientemente entre sí <sup>18</sup>F o H, a condición de que uno de R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>c</sub>, R<sub>d</sub> sea <sup>18</sup>F, y

10 R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> son independientemente entre sí H o un alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR', -CH=CH-, -C≡C-, donde R' es H o alquilo C1-C6.

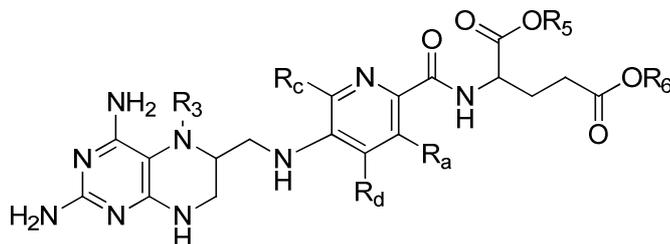
Otras realizaciones son compuestos de la invención donde X<sub>1</sub> a X<sub>5</sub> y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son N, R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = R<sub>6</sub> es H, R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub> o formilo, p es 1 y q es 4.

Por tanto, en una realización específica adicional la presente invención se refiere a un compuesto de fórmulas XVIIIa, XVIIIb,



XVIIIa

15



XVIIIb

donde

R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>c</sub>, R<sub>d</sub> son independientemente entre sí <sup>18</sup>F o H, a condición de que uno de R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>c</sub>, R<sub>d</sub> sea <sup>18</sup>F,

5 R<sub>3</sub> es H, metilo o formilo, y

R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> son independientemente entre sí H o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por al menos uno de CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR', -CH=CH-, -C≡C-, donde R' es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

10 El término «alquilo», cuando se utiliza de manera individual o en combinación, se refiere a grupos alquilo lineales o ramificados que contienen el número indicado de átomos de C, conteniendo típicamente de 1 a 12, preferiblemente de 1 a 8, más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo y similares.

15 Según se usa en este documento, el término «alqueno» (es decir, un grupo alquilo como se define anteriormente que tiene al menos un enlace doble), de manera individual o en combinación con otros grupos, se refiere a grupos alqueno de cadena lineal o ramificada que contiene de 2 a 12 átomos de carbono, como metileno, etileno, propileno, isopropileno, butileno, t-butileno, sec-butileno, isobutileno, amileno, isoamileno, pentileno, isopentileno, hexileno y similares. Los grupos alqueno preferidos contienen de 2 a 8 átomos de carbono.

20 El término «alquino» (es decir, un grupo alquilo como se define anteriormente con al menos un enlace triple) según se usa en este documento se refiere a una cadena lineal o ramificado de átomos de carbono con uno o más enlaces carbono-carbono triple. Los grupos alquino preferidos contienen de 2 a 12, más preferiblemente de 2 a 8 átomos de carbono.

El término «alcoxi» según se usa en este documento se refiere a un alquilo, como se define anteriormente, sustituido con oxígeno, como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, terc-butoxi y similares.

25 El término «alcanoilo» según se usa en este documento se refiere a formilo, o un alquilo, como se define anteriormente, sustituido en el extremo terminal con un carbonilo como acetilo, propanoilo, butanoilo, pentanoilo y similares.

30 El término «alquilamino» según se usa en este documento se refiere a un alquilo, como se definió anteriormente, sustituido con nitrógeno, que incluye ambos monoalquilamino, como metilamino, etilamino, propilamino, terc-butilamino y similares, y dialquilamino como dimetilamino, dietilamino, metilpropilamino y similares.

El término «halo» según se usa en este documento se refiere a cualquier elemento del grupo 17 e incluye fluoro, cloro, bromo, yodo y astatina(o).

La expresión «opcionalmente sustituido» preferiblemente incluye sustitución con hidroxilo, alcoxi, (di)alquilamino, alquilsulfonilo, alquilcarbonilo, alquilcarbonilo, alcoxycarbonilo, carboxilo, Hal, CN, NO<sub>2</sub>.

35 En una realización preferida R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente entre sí H, -OR'', -NHR'' donde R'' es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcanoilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, carbonilo(alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y carbonil(alquilamino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), más preferiblemente R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente entre sí -OH, NH<sub>2</sub>.

En una realización preferida R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente entre sí H, metilo o formilo.

En una realización preferida R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son independientemente entre sí H, metilo, etilo o terc-butilo.

En una realización preferida R' es H, metilo o etilo.

En una realización preferida R<sub>8</sub> es H, metilo o etilo.

5 En una realización preferida Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> son independientemente entre sí H, metilo o etilo.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método de síntesis de un compuesto de la invención. Los solicitantes han encontrado que los radiofármacos de folato de la invención pueden obtenerse mediante radiomarcaje directo con [<sup>18</sup>F]fluoruro.

10 El nucleido <sup>18</sup>F normalmente está disponible como [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub> electrófilo y, como generalmente se usa en este documento, como [<sup>18</sup>F]fluoruro nucleófilo. En forma de [<sup>18</sup>F]fluoruro, el flúor-18 se produce con mayor eficacia. Además, esta es la única posibilidad de no preparar suficientemente radiotrazadores sin portador.

15 Por tanto, en una realización específica, un método de producción de la invención comprende los pasos de proporcionar un precursor que es un azafolato portador de un sustituyente susceptible de sustitución mediante un [<sup>18</sup>F]fluoruro, y hacer reaccionar dicho precursor con [<sup>18</sup>F]fluoruro activado mediante catalizadores de transferencia de fase como carbonato de tetrabutilamonio o aminopolíéters (p. ej., Kryptofix® 2.2.2) en combinación con carbonato u oxalato de potasio para formar un compuesto de la invención.

20 Típicamente, un sustituyente susceptible de sustitución mediante un [<sup>18</sup>F]fluoruro, es un grupo de atracción de electrones que puede actuar como grupo saliente y, por tanto, puede intercambiarse por un [<sup>18</sup>F]fluoruro entrante o también puede actuar como un activador para la introducción de [<sup>18</sup>F]fluoruro. Entre los grupos de atracción de electrones adecuados se incluyen -NO<sub>2</sub>, -CN, -SO<sub>3</sub>R', -COOR', -COR', -F, -Cl, -Br. En una realización preferida los radiofármacos de folato se obtuvieron en un método de marcaje directo basado en un intercambio de <sup>18</sup>F para nitro o <sup>18</sup>F para cloro.

25 En una reacción típica, el precursor se disolvió en un solvente orgánico adecuado y se agregó a <sup>18</sup>F-fluoruro-criptato seco. La mezcla resultante se calentó a una temperatura adecuada y un tiempo de reacción adecuado, por ejemplo, alrededor de 160 °C durante 10 min. Tras la purificación en un cartucho corto, se llevó a cabo la desprotección en condiciones básicas o ácidas y calentando suavemente durante 10 min. La solución de producto sin procesar se neutralizó e inyectó en un sistema de HPLC semipreparativo. Se recogió el producto radiactivo y los solventes de HPLC se eliminaron mediante otra extracción en fase sólida o mediante una corriente de nitrógeno, vacío y calentamiento suave. Para la formulación, el producto seco se redisolvió con solución fisiológica y se transfirió a un vial estéril usando un filtro estéril.

30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona usos de radiofármacos de folato de la presente invención para su administración conveniente y eficaz a un sujeto que necesita un diagnóstico por imagen.

35 Por tanto, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico por imagen de una célula o población de células que expresan un receptor de folato, comprendiendo dicho método los pasos de administrar al menos un radiofármaco de folato de la invención en una cantidad para diagnóstico por imagen, y obtener una imagen diagnóstica de dicha célula o población de células.

Dicho estudio por imagen puede realizarse en una célula o población de células que expresan un receptor de folato *in vitro* o *in vivo*.

40 Por tanto, la presente invención proporciona un método para la detección *in vitro* de una célula que expresa el receptor de folato en una muestra de tejido que incluye poner en contacto dicha muestra de tejido con al menos un radiofármaco de folato de la invención en cantidades eficaces y durante tiempo suficiente y condiciones que permitan que se produzca la unión y detectar dicha unión mediante estudio por imagen como autorradiografía y similares.

45 En un aspecto adicional la presente invención proporciona usos de radiofármacos de folato de la presente invención para su administración conveniente y eficaz a un sujeto que necesita un diagnóstico por imagen o seguimiento del tratamiento del cáncer o enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico y tratamiento simultáneos que comprende los pasos de administrar a un sujeto que lo necesita al menos un radiofármaco de folato de la presente invención en una cantidad eficaz para el diagnóstico en combinación con un compuesto terapéuticamente activo, y obtener una imagen diagnóstica de dichos tejidos para seguir la evolución del tratamiento.

- 5 El sujeto de los métodos de la presente invención es preferiblemente un mamífero, como un animal o un humano, preferiblemente un humano.

La dosis depende de la naturaleza del efecto deseado, tal como la forma de diagnóstico o tratamiento, de la clase y frecuencia del tratamiento, de la instrumentación diagnóstica, de la forma de aplicación de la preparación, y de la edad, peso, nutrición y estado del sujeto, tipo de tratamiento concomitante, si lo hubiera.

- 10 No obstante, la dosis más preferida puede adaptarse al sujeto individual, según entiende y puede determinar un experto en la materia, sin necesidad de experimentación. Normalmente, esto supone el ajuste de una dosis estándar, por ejemplo, reducción de la dosis si el paciente tiene bajo peso corporal.

El tratamiento puede iniciarse con una cantidad más pequeña, por debajo de la cantidad óptima, la cual puede aumentarse para conseguir el efecto óptimo.

- 15 Los radiofármacos de folato de la presente invención pueden administrarse como dosis repetidas o preferiblemente como una única dosis. Por ejemplo, los radiofármacos de folato de esta invención pueden administrarse a un sujeto mediante inyección en bolo intravenoso. Entre las formas adecuadas para la inyección se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles de los radiofármacos de folato de la presente invención mencionados anteriormente.

- 20 En el caso de una solución inyectable, la dosis unitaria preferida es de aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 10 ml. Tras, por ejemplo, la administración intravenosa, el estudio por imagen del órgano o del tumor *in vivo* puede realizarse, si se desea, de 30 min a 4 horas, después de la administración al sujeto del reactivo radiomarcado. Típicamente, se acumulará una cantidad suficiente de la dosis administrada en la zona objetivo.

- 25 Los radiofármacos de folato se purifican preferiblemente mediante HPLC. Tras eliminar los solventes de la purificación por HPLC los productos se disolvieron preferiblemente en soluciones fisiológicas como NaCl al 0,9 % o una solución de tampón fosfato 0,15 M, antes de la aplicación, el radiofármaco formulado se transfiere a un vial estéril a través de un filtro estéril.

- 30 Los radiofármacos de folato de la invención pueden también utilizarse para la detección *in vitro* de una célula que expresa el receptor de folato en una biopsia de tejido obtenido de un sujeto. Por tanto, en una realización adicional, la presente invención proporciona un método para la detección *in vitro* de una célula que expresa el receptor de folato, por ejemplo, una célula tumoral o un macrófago activado, en una muestra de tejido que incluye poner en contacto dicha muestra de tejido con un radiofármaco de folato de la presente invención en cantidades eficaces y durante tiempo suficiente y condiciones que permitan que se produzca la unión y detectar dicha unión mediante técnicas de estudio por imagen.

- 35 Las muestras pueden recogerse mediante procedimientos conocidos por un experto, por ejemplo, realizando una biopsia de tejido, recogiendo un líquido corporal o aspirando muestras de tráquea o pulmonares y similares.

- 40 Entre las muestras de tejido que se analizan se incluyen aquellas de cualquier tejido sospechoso de contener una célula que expresa un receptor de folato, como células tumorales, células epiteliales, riñones, gastrointestinal o el sistema hepatobiliar, macrófagos activados, monocitos y otros. Las muestras pueden cortarse, por ejemplo, con un microtomo, para facilitar su exploración y observación microscópica. Las muestras también pueden fijarse con un medio de fijación adecuado antes o después de la incubación con uno de los radiofármacos de folato de la presente invención para mejorar la calidad histológica de los tejidos de la muestra.

- 45 El tiempo y condiciones suficientes para la unión del radiofármaco de folato de la presente invención a un receptor de folato en la célula incluyen condiciones de cultivo tisular estándar, es decir, las muestras pueden cultivarse *in vitro* e incubarse con uno de los compuestos o composiciones de la presente invención en medio fisiológico. Estas condiciones son bien conocidas por el experto. Alternativamente, las muestras pueden fijarse y, a continuación, incubarse con un radiofármaco de folato de la presente invención en un tampón isotónico o fisiológico.

- 50 Para todas las aplicaciones es conveniente preparar los compuestos o composiciones de la presente invención en el lugar, o cerca, del sitio donde se van a utilizar. Todos los compuestos y/o métodos descritos y reivindicados en este documento pueden hacerse y ejecutarse sin excesiva experimentación a la luz de la presente memoria descriptiva. Será aparente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a la presente invención sin alejarse del alcance de la misma que se define en las reivindicaciones adjuntas. Los ejemplos proporcionados

en este documento pretenden ser ilustrativos y no exhaustivos; por tanto, los ejemplos mostrados no deben considerarse una limitación de la invención en ningún sentido (véase también Betzel y cols. *Bioconj. Chem.* 2013, 24: 205-214).

## Ejemplos

5 *General:* Los reactivos y solventes se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Acros Organics o VWR International AG si no se menciona otra cosa. Todos los compuestos químicos se utilizaron según se suministraron. Los microsomas humanos y de ratón (hembras CD-1) y los sistemas de regeneración de NADPH se obtuvieron de BD biosciences.

10 *Radio-HPLC analítica:* La radiocromatografía líquida de alta resolución (HPLC) analítica se realizó en un sistema de HPLC Agilent serie 1100 equipado con un radiodetector GabiStar (Raytest) usando una columna RP-18, Luna PFP(2) C18, (5 µm, 250 × 4,6 mm, Phenomenex) con el siguiente sistema de solventes y gradiente: el eluyente A era un tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,05 M; pH 7,4) y el eluyente B era MeOH. Se utilizó un gradiente de 0-30 min, 100-70 % A a un caudal de 1 ml/min. La actividad específica se determinó a partir de una curva de calibración  
15 obtenida a partir de concentraciones diferentes del compuesto de referencia sin marcar. Para determinar la cantidad del precursor clorado (ácido 3'-aza-2'-clorofólico), se utilizó una curva patrón obtenida a partir de diferentes concentraciones de ácido 3'-aza-2'-clorofólico.

*Radio-HPLC semipreparativa:* Para la purificación, se realizó una radio-HPLC en un sistema de HPLC semipreparativa equipado con Smartline Pump 1000, Smartline Manager 5000, Smartline UV Detector 2500 (Knauer) y un radiodetector GabiStar (Raytest). El ácido [<sup>18</sup>F]-3'-aza-2'-fluorofólico se purificó en una columna RP-  
20 18, Luna PFP(2) C18, (5 µm, 250 × 10 mm, Phenomenex) con el siguiente sistema de solventes: el eluyente A era una solución de EtOH al 0,1 % en tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,05 M; pH 7,4) y el eluyente B era una solución de EtOH al 40 % en tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,05 M; pH 7,4). Se utilizó un gradiente de 0-10 min, 100-85 % de A, 10-25 min, A al 85 % isocráticamente a un caudal de 4 ml/min.

*Radio-UPLC:* Para los estudios de estabilidad, se utilizó un sistema de cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC™, Waters) equipada con una columna C18 Acquity UPLC BEH (1,7 µm; 2,1 × 50 mm; Waters) y un detector de coincidencia (FlowStar LB513, Berthold) con el siguiente sistema de solventes: el eluyente A era un tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,05 M; pH 7,4) y el eluyente B era acetonitrilo. Se usó un gradiente de 0-4,0 min, 100-40 % de A, a un caudal de 0,6 ml/min.

*Producción de [<sup>18</sup>F]fluoruro sin vehículo añadido:* El [<sup>18</sup>F]fluoruro sin vehículo añadido se obtuvo mediante la  
30 reacción nuclear de <sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F en un ciclotrón Cyclone 18/9 (IBA). Se irradió <sup>18</sup>O-agua isotópicamente enriquecida al 97 % mediante una corriente de protones de 18 MeV usando un objetivo de 2,1 ml. El volumen objetivo (1,95 ml) se transfirió a una célula caliente usando una corriente de helio. El [<sup>18</sup>F]fluoruro sin vehículo añadido (40-80 GBq) se atrapó en un cartucho de intercambio aniónico (Sep-Pak Light Accell Plus QMA, Waters), precondicionado con una solución de carbonato de potasio acuoso (0,5 M; 5 ml) y agua (10 ml).

*Determinación de logD:* Se llevó a cabo la determinación del valor de logD usando el método de agitación en  
35 matraz, donde se determinó el coeficiente de partición del radiotrazador entre n-octanol y solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Wilson y cols. 2001 *Applied Radiation and Isotopes*). Se mezclaron n-octanol (0,5 ml) y PBS (0,5 ml) en un tubo Eppendorf que contenía la muestra radioactiva (5-10 µl). Los tubos se agitaron durante 15 min a temperatura ambiente en un agitador calefactado y posteriormente se centrifugaron (3 min, 5000 rpm). De  
40 cada tubo Eppendorf, se transfirieron 50 µl de cada fase a un vial de recuento en un contador y. El valor de logD se calculó según la siguiente ecuación:  $\log D_{7,4} = \log [\text{actividad}(\text{fase octanol})/\text{actividad de la fase de PBS}]$ .

*Cultivo celular:* Las células KB (línea celular de carcinoma de cuello uterino humano, subclon HeLa; ACC-136) se obtuvieron de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Las células se cultivaron como monocapas a 37 °C en atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. Es importante  
45 destacar que las células se cultivaron en un medio de cultivo celular sin folato, FFRPMI (RPMI modificado, sin ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> y rojo fenol; Cell Culture Technologies GmbH, Gravesano/Lugano, Suiza). El medio FFRPMI se suplementó con suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 % (FCS, como única fuente de folato), L-glutamina y antibióticos (penicilina/estreptomicina/fungizona). El tratamiento de cultivo rutinario se realizó dos veces a la semana con EDTA (2,5 mmol/l) en PBS.

## 50 Ejemplo 1: Síntesis del precursor éster di-terc butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-nitrofólico

(a) Síntesis de éster di-terc butílico del ácido N-(6-amino-2-cloronicotinoil)-L-glutámico

Se disolvió ácido 6-amino-2-cloronicotínico (6 g; 34,8 mmol; obtenido de Anichem Inc.) en N,N-dimetilformamida (232 ml) a temperatura ambiente. La solución se enfrió hasta 0 °C y se añadió trietilamina (11 ml; 7,39 g; 73,0 mmol). Tras la adición de HBTU (hexa-fluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; 14,5 g; 38,2 mmol) la mezcla se agitó durante 5 min a 0 °C y, a continuación, se añadió clorhidrato de di-*terc* butil-L-glutamato (10,8 g; 36,5 mmol). Se retiró el baño frío y la mezcla de reacción se agitó durante 18 horas. Tras enfriar a -20 °C, los sólidos se drenaron y se lavaron con DMF (20 ml). El filtrado se evaporó hasta sequedad al vacío y el residuo se disolvió en una mezcla de acetato de etilo (400 mg) y éter de metil-*terc*-butilo (200 g). La solución se lavó tres veces con agua (150 ml en total), tres veces con una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> 1 M (150 ml en total) y tres veces con una solución acuosa saturado de NaCl (150 ml en total). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio (10 g) y se evaporó hasta sequedad al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (n-hexano/acetato de etilo 7:3 a 5:5) para obtener éster di-*terc* butílico del ácido N-(6-amino-2-cloronicotinoil)-glutámico. Rendimiento: 6,8 g (36,5 mmol; 47,3 %).

EM-AR (ESI, muestra disuelta en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): m/z [MH]<sup>+</sup> calculado para C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 414,1790; encontrado: 414,1789

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ = 1,39 (s, 9H, OtBu), 1,41 (s, 9H, OtBu), 1,71-2,07 (m, 2H, C(β)H<sub>2</sub>), 2,33 (t, 2H, C(γ)H<sub>2</sub>), 4,18-4,29 (m, 1H, C<sub>α</sub>H), 6,40 (d, 1H, 4'H<sub>arom</sub>, J<sup>2</sup> = 8,3Hz), 6,69 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7,47 (d, 1H, 5'H<sub>arom</sub>, J<sup>2</sup> = 8,3Hz), 8,36 (d, 1H, NH, J<sup>3</sup> = 7,6 Hz).

RMN <sup>13</sup>C (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 26,6, 28,2, 31,6, 52,9, 80,2, 81,1, 106,3, 118,9, 140,1, 146,2, 160,6, 166,2, 171,2, 172,0.

(b) Síntesis del éster di-*terc* butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-clorofólico

Se disolvió éster di-*terc* butílico de N-(6-amino-2-cloronicotinoil)-glutámico (0,5 g; 1,27 mmol) y N<sup>2</sup>-acetil-6-formilpterina (0,3 g; 1,21 mmol) en ácido acético (30 ml). Tras la adición de ortosilicato de tetraetilo (0,54 ml; 1,27 mmol) la mezcla se agitó a 55 °C durante 6 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente durante toda la noche, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (0,27 g; 2,42 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la adición de n-hexano (18 g) y agua (8 g) se separó la capa orgánica y la capa acuosa se evaporó a sequedad al vacío. El residuo se resuspendió en una mezcla de agua (9 g) y acetonitrilo (1 g). Se extrajeron los sólidos y se lavaron dos veces con agua (10 g en total) para obtener éster di-*terc* butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-clorofólico sin procesar (0,77 g). El producto sin procesar se purificó mediante digestión repetida en mezclas de agua y acetonitrilo con un porcentaje creciente de acetonitrilo del 10 al 25 % para obtener éster di-*terc* butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-clorofólico. Rendimiento: 0,61 g (0,911 mmol; 75 %).

EM-AR (ESI, muestra disuelta en MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /1:1): m/z [MH]<sup>+</sup> calculado para C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>ClN<sub>8</sub>NaO<sub>7</sub>: 653,2209; encontrado: 653,2211

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ = 1,37 (s, 9H, OtBu), 1,39 (s, 9H, OtBu), 1,75-1,82 (m, 1H, C(β)H), 1,92-1,99 (m, 1H, C(β)H'), 2,20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,28-2,32 (m, 2H, C(γ)H<sub>2</sub>), 4,21 (m, 1H, C(α)H), 4,72 (d, 2H, C(6)CH<sub>2</sub>, J = 5,8 Hz), 6,71 (s, 1H, 4'H<sub>arom</sub>), 8,00 (ta, 1H, NH), 8,04 (s, 1H, 5'H<sub>arom</sub>), 8,50 (d, 1H, NH(Glu), J = 7,5 Hz), 8,83 (s, 1H, C(7)H), 11,9 (sa, 1H, NH), 12,3 (sa, 1H, NH).

RMN <sup>13</sup>C (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 24,4, 26,5, 28,1, 28,2, 31,5, 44,5, 52,8, 80,3, 81,1, 107,1, 119,6, 130,9, 139,7, 145,9, 149,7, 150,2, 152,4, 154,9, 158,6, 159,7, 166,1, 171,1, 171,9, 174,6.

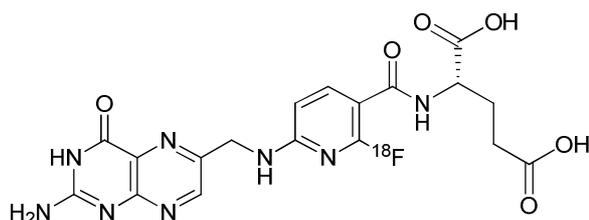
(c) Síntesis de éster di-*terc* butílico del ácido N-(6-amino-2-nitronicotinoil)-L-glutámico

La síntesis se logró siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1a) pero utilizando ácido 6-amino-2-nitronicotínico en lugar de ácido 6-amino-2-cloronicotínico.

(d) Síntesis del éster di-*terc* butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-nitrofólico

La síntesis se logró siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1b) pero utilizando éster di-*terc* butílico del ácido N-(6-amino-2-nitronicotinoil)-L-glutámico en lugar de éster di-*terc* butílico del ácido N-(6-amino-2-cloronicotinoil)-glutámico.

**Ejemplo 2: Síntesis de ácido 3'-aza-2'-[<sup>18</sup>F]fluorofólico sin vehículo añadido**



El [<sup>18</sup>F]fluoruro sin vehículo añadido atrapado en un cartucho de intercambio aniónico se eluyó directamente en un recipiente de reacción de 5 ml sellado, usando una solución de carbonato de cesio (2,8 mg) y Kryptofix 2.2.2 (5 mg) en una mezcla de acetonitrilo (1,4 ml) y agua (0,6 ml). El solvente se eliminó a 90 °C al vacío y se aplicó una corriente de nitrógeno. Posteriormente, se añadió acetonitrilo seco (3 × 1 ml) y se evaporó a sequedad. A continuación, se aplicó solo vacío durante 10 min a 90 °C.

El precursor, éster di-terc butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-clorofólico (2,50 mg; 3,96 μmol) o alternativamente éster di-terc butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-nitro-fólico, se añadió al complejo [<sup>18</sup>F]fluoruro-criptato seco en sulfóxido de dimetilo (300 μl). La mezcla se calentó a 160 °C durante 10 min. Tras 10 min de enfriamiento y la adición de agua (5 ml), la mezcla se pasó a través de un cartucho en fase inversa (Sep-Pak C18 Plus; Waters), que se acondicionó previamente con metanol (5 ml) y se lavó con agua (10 ml). El cartucho cargado se lavó con agua (3 × 8 ml). El compuesto intermedio protegido marcado con <sup>18</sup>F, éster di-terc butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-fluorofólico, se eluyó con acetonitrilo (2 ml) en otro recipiente de reacción de 5 ml sellado. El volumen de acetonitrilo se concentró hasta aproximadamente 0,1 ml a presión reducida y una corriente de nitrógeno a 90 °C. Para la hidrólisis, se añadió una solución de cloruro de hidrógeno (4 M; 1,25 ml) y la mezcla se calentó durante 10 min a 60 °C. Después de 5 min de enfriamiento, la mezcla se neutralizó mediante la adición de una solución de hidróxido sódico (5 M; 1,0 ml) y se diluyó con tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,05 M; pH 7,4; 2,5 ml) hasta un volumen total de 5 ml. La solución se inyectó en el sistema de radio-HPLC semipreparativa. La fracción de producto recogida (t<sub>R</sub> = 21 min), que contenía EtOH al 6 %, se pasó a través de un filtro estéril a un vial estéril apirógeno, listo para su uso en experimentos adicionales (*in vitro* e *in vivo*).

El rendimiento radioquímico corregido por desintegración oscilaba entre el 5 y el 15 % (0,5–2,75 GBq). El control de calidad se realizó mediante una radio-HPLC analítica (figura 2). La pureza radioquímica era superior al 98 % y la actividad específica oscilaba de 45 a 126,8 GBq/μmol.

La cantidad de subproducto clorado era inferior a 17 μg/ml de la solución de producto formulado (intervalo: 1–16,3 μmol/ml). El tiempo de síntesis total fue de aproximadamente 85 min y la identidad del ácido [<sup>18</sup>F]-3'-aza-2'-fluorofólico se confirmó mediante coinyección con el compuesto de referencia ácido 3'-aza-2'-[<sup>19</sup>F]fluorofólico. En la tabla 1 se muestra un resumen de las condiciones de radiomarcaje.

**Tabla 1** Condiciones para la síntesis de ácido 3'-aza-2'-[<sup>18</sup>F]fluorofólico:

<b>Paso 1 - Radiomarcaje</b>	
Precursor	4,0 μmol (2,5 mg)
Solvente	300 μl de DMSO
Temperatura	160 °C
Tiempo de reacción	10 min
<b>Paso 2 - Purificación del aza-folato marcado con <sup>18</sup>F</b>	
Cartucho de tc18 plus	Eliminación del [ <sup>18</sup> F]fluoruro sin reaccionar y de las sales
<b>Paso 3 - Desprotección del aza-folato marcado con <sup>18</sup>F</b>	
HCl 4 N	1,25 ml
Temperatura	60 °C
Tiempo de reacción	10 min
NaOH 5 N (neutralización)	1,0 ml
<b>Paso 4 - Purificación del radiotrazador final (5)</b>	

Pureza radioquímica	>98 %
Rendimiento radioquímico (corregido por desintegración)	5-15 %
Radiactividad	Máx 2,75 GBq

Medida de  $\log D_{7,4}$ : Para la evaluación de la lipofilidad, se encontró que el coeficiente de partición del ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3'-aza-2'-fluorofólico en n-octanol/PBS era de  $-4,2 \pm 0,1$  ( $n = 10$ ), lo que indicaba propiedades muy hidrófilas del ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3'-aza-2'-fluorofólico.

### 5 Ejemplo 3: Radiosíntesis modular según las normas de BPF del ácido 3'-aza-2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorofólico

La producción según las normas de BPF del radiotrazador ácido 3'-aza-2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorofólico se realizó en un módulo de síntesis automático. El [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro sin vehículo añadido se atrapó en un cartucho de intercambio aniónico y se eluyó directamente del reactor utilizando una mezcla de carbonato de cesio (2,8 mg en 0,35 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ) y Kryptofix 2.2.2 (6,5 mg en 0,35 ml de acetonitrilo). El solvente se eliminó a 120 °C a presión reducida y una corriente de nitrógeno. Se añadió acetonitrilo (0,1 ml) y se evaporó hasta sequedad.

La solución precursora de éster di-terc butílico del ácido  $\text{N}^2$ -acetil-3'-aza-2'-clorofólico (2,50 mg; 3,96  $\mu\text{mol}$ ) en DMSO (400  $\mu\text{l}$ ) se añadió al complejo [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro-criptato seco. La mezcla se calentó a 150 °C durante 17 minutos. A continuación, se añadió directamente HCl 4 M (1,0 ml) en el reactor y la hidrólisis se realizó a 60 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se diluyó con  $\text{H}_2\text{O}$  (9 ml) y se cargó en un cartucho MCX activado y se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ml). El radiotrazador se eluyó lavando el cartucho con una solución hecha con MeOH al 10 % en tampón fosfato 50 mM pH 7,4 (4 ml). El eluyente se inyectó en el sistema de radio-HPLC semipreparativa. La fracción de producto recogida ( $t_{\text{R}} = 21,1$  min) se acidificó con HCl 4 M (0,5 ml) y se cargó en otro cartucho MCX. Tras lavar el cartucho con  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ml), el radiotrazador se eluyó con EtOH al 10 % en tampón fosfato 50 mM pH 7,4 (5 ml) y se diluyó con NaCl al 0,9 % ac. (9 ml).

El rendimiento radioquímico corregido por desintegración al final de la síntesis oscilaba entre el 7 y el 16 % (2,4–6,0 GBq). El control de calidad se realizó mediante una radio-HPLC analítica. La pureza radioquímica era superior al 99 % y la actividad específica oscilaba de 47 a 62 GBq/ $\mu\text{mol}$ .

La cantidad de subproducto clorado era inferior a 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de la solución de producto formulado. El tiempo de síntesis total era de aproximadamente 75 min. En la tabla 2 se muestra un resumen de las condiciones de radiomarcaje.

**Tabla 2:** Condiciones para la síntesis del ácido 3'-aza-2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorofólico en un módulo automático.

<b>Paso 1 - Radiomarcaje</b>	
Precursor	4,0 $\mu\text{mol}$ (2,5 mg)
Solvente	400 $\mu\text{l}$ de DMSO
Temperatura	150 °C
Tiempo de reacción	17 min
<b>Paso 2 - Desprotección del aza-folato marcado con <math>^{18}\text{F}</math></b>	
HCl 4 M	1,0 ml
Temperatura	60 °C
Tiempo de reacción	10 min
$\text{H}_2\text{O}$ (dilución)	9,0 ml
<b>Paso 3 - Purificación del radiotrazador final</b>	
Cartucho MCX (60 mg)	Atrapamiento del radiotrazador y eliminación del [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro sin reaccionar y las sales
Elución	4 ml de MeOH al 10 % en tampón fosfato 50 mM pH 7,4

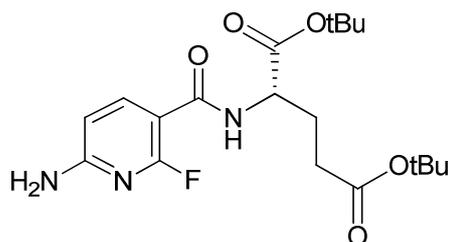
HPLC	Luna PFP(2), 250 × 10 mm, MeOH al 7 % en tampón fosfato 20 mM pH 7,4
Cartucho MCX (30 mg)	Atrapamiento de la fracción de producto de HPLC, eliminación del solvente de HPLC
<b>Paso 4 – Formulación</b>	
Elución	EtOH al 10 % en tampón fosfato 50 mM pH 7,4 (5 ml) y NaCl al 0,9 % (9 ml)
Pureza radioquímica	>99 %
Rendimiento radioquímico (corregido por desintegración)	7-16 %
Radiactividad	Máx. 6,0 GBq

#### Ejemplo 4: Síntesis de ácido [<sup>18</sup>F]-3',5'-diaz-2'-fluorofólico sin vehículo añadido

La síntesis se realizó de manera análoga a los ejemplos 1 a 3 pero utilizando ácido 2-amino-4-cloro-5-pirimidincarboxílico (obtenido de Abby Pharmatech, LLC) en lugar de ácido 6-amino-2-cloronicotínico.

#### 5 Ejemplo 5: Síntesis de compuestos [<sup>19</sup>F] de referencia

(a) Síntesis de éster di-*terc* butílico del ácido N-(6-amino-2-fluoronicotinoil)-L-glutámico



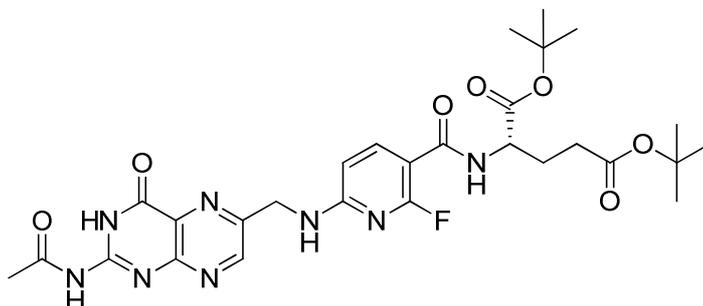
10 A una solución de clorhidrato del ácido 6-amino-2-fluoronicotínico (5,72 g; 29,7 mmol, obtenido de Anichem Inc.) en N,N-dimetilformamida (50 ml) se le añadió N-hidroxisuciniimida (6,83 g; 59,3 mmol). Tras enfriar a 0 °C se añadió trietilamina (15,01 g; 148,3 mmol) gota a gota durante 10 minutos. La mezcla se calentó hasta temperatura ambiente y se añadió N,N-diisopropilcarbodiimida (6,9 ml; 44,5 mmol) durante 5 minutos. Después de 29 horas se  
15 añadió una solución de clorhidrato de éster di-*terc* butílico del ácido glutámico (17,6 g; 59,3 mmol) en N,N-dimetilformamida (114 ml) gota a gota durante 5 minutos. Después de 21 horas los sólidos se drenaron y se lavaron dos veces con N,N-dimetilformamida (en total 40 ml). El filtrado y los lavados se combinaron y diluyeron con acetato de etilo (500 ml) y diisopropiléter (500 ml). La solución se lavó cinco veces con agua (en total 1000 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio (60 g) y sobre óxido de aluminio (10 g) y se evaporó hasta sequedad al vacío. Se añadió acetonitrilo (57,9 g) al residuo y los sólidos se drenaron y lavaron con acetonitrilo (en total 20 g).  
20 Los lavados y el filtrado se combinaron y evaporaron a sequedad al vacío a 40 °C. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (n-hexano/acetato de etilo 7:3 a 0:1, R<sub>f</sub> = 0,46, n-hexano/acetato de etilo 7:3) para obtener éster di-*terc* butílico del ácido N-(6-amino-2-fluoronicotinoil)-L-glutámico como un sólido cristalino tras la evaporación de las fracciones del producto. Rendimiento: 2,27 g (5,7 mmol; 19 %).

25 EM-AR (ESI, muestra disuelta en agua/CH<sub>3</sub> CN/1:1): m/z [MH]<sup>+</sup> calculado para C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 398,2086; encontrado: 398,2083

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,37 (s, 9H, OtBu), 1,41 (s, 9H, OtBu), 1,79-1,98 (m, 2H, C(β)H<sub>2</sub>), 2,29 (t, 2H, C(γ)H<sub>2</sub>), 4,33 (m, 1H, C(α)H), 6,36 (dd, 1H, 4<sup>H</sup><sub>arom</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,4 Hz, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 2,2 Hz), 6,91 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 7,78-7,87 (m, 2H, NH, 5<sup>H</sup><sub>arom</sub>).

30 RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 26,1, 27,6, 27,7, 31,1, 52,3, 79,7, 80,7, 101,6 (d, 2J<sub>CF</sub>=27,4 Hz), 104,7 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 2,8 Hz), 142,1 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 3,0 Hz), 160,0 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 237,0 Hz), 160,7 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 19,3 Hz), 162,9 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 6,5 Hz), 170,8, 171,5.

(b) Síntesis del éster di-*terc* butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-fluorofólico



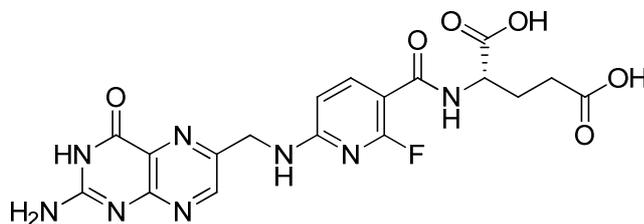
Se resuspendió N<sup>2</sup>-acetil-6-formilpterina (1,17 g; 5,03 mmol) en ácido acético (25 ml) a temperatura ambiente. Se añadió una solución de éster di-*tert* butílico del ácido N-(6-amino-2-fluoronicotinoil)-L-glutámico (1,00 g; 2,52 mmol) en ácido acético (35 ml) gota a gota a la suspensión durante 30 min. Tras 2 horas a temperatura ambiente se había formado una solución transparente y se añadió un tamiz molecular de 4A (10 g). Después de otras 2,5 horas se añadió una segunda porción de tamiz molecular 4A (10 g). A las 2 horas se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (0,5 g; 2,39 mmol) y, después de otra hora, se añadió una segunda porción de triacetoxiborohidruro de sodio (0,5 g; 2,39 mmol). Después de 16 horas a temperatura ambiente se añadió una tercera porción de triacetoxiborohidruro sódico (0,53 g; 2,52 mmol). Tras otras 2,5 horas se extrajeron los sólidos de la mezcla de reacción y se lavaron con ácido acético (30 ml). El filtrado se añadió gota a gota a una mezcla de agua (150 ml) y acetonitrilo (30 ml). A continuación, se añadió agua (100 ml) gota a gota. La mezcla se enfrió a 4 °C durante dos horas y se extrajo el producto precipitado. El producto se resuspendió cuatro veces en agua (40 g en total) y, a continuación, se secó al vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para obtener éster di-*tert* butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-fluorofólico como un polvo blanquecino. Rendimiento: 1,10 g (1,79 mmol; 71 %).

EM-AR (ESI, muestra disuelta en agua/CH<sub>3</sub>CN/1:1): m/z [MH]<sup>+</sup> calculado para C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>7</sub>: 615,2685; encontrado: 615,2677

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,37 (s, 9H, OtBu), 1,40 (s, 9H, OtBu), 1,80-2,07 (m, 2H, C(β)H<sub>2</sub>), 2,21-2,32 (t, 2H, C(γ)H<sub>2</sub>), 4,29 (m, 1H, C(α)H), 4,71 (d, 2H, C(6)CH<sub>2</sub>); 6,56 (dd, 1H, 4'H<sub>arom</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,4 Hz, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 2,2 Hz), 7,83 (dd, 1H, 4'H<sub>arom</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 10,0 Hz), 7,91 (dd, 1H, NH(Glu), <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 4,5 Hz), 8,29 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,7 Hz), 8,88 (s, 1H, C(7)H), 11,94 (sa, 1H, N(3)H), 12,28 (sa, 1H, NHAc).

RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 23,9, 26,1, 27,7, 27,6, 31,1, 44,1, 52,3, 79,7, 80,7, 102,5 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 28,3 Hz), 105,4, 130,5, 141,7, 149,3, 149,4, 151,7, 154,5, 158,9 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 17,8 Hz), 159,3, 159,8 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 237,6 Hz), 162,9 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 6,5 Hz), 170,7, 171,5, 174,1.

(c) Síntesis de ácido 3'-aza-2'-fluorofólico



Se resuspendió éster di-*tert* butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-fluorofólico (0,6 g; 1 mmol) en una mezcla de ácido clorhídrico acuoso 1 M (16 ml) y acetonitrilo (1,6 ml). La suspensión se calentó hasta 60 °C durante 2 horas. Tras enfriar hasta 4 °C, se extrajo el producto precipitado, se lavó con agua (10 ml en total) y se secó al vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para obtener ácido 3'-aza-2'-fluorofólico sin procesar como un polvo de color amarillo claro. Rendimiento: 0,4 g (0,9 mmol; 88 %). Se disolvió ácido 3'-aza-2'-fluorofólico sin procesar (0,27 g; 0,59 mmol) en una mezcla de agua (2 ml) y una solución acuosa de hidróxido sódico 1 M (1,2 ml). La solución se trató con carbón (0,027 g) durante 15 minutos a 70 °C. Se extrajo el carbón y el filtrado se enfrió hasta 0 °C. El producto se precipitó mediante la adición de ácido clorhídrico acuoso 2 M (0,59 ml). El precipitado se aisló mediante centrifugación. Las aguas madre se decantaron del sólido y este se lavó tres veces con agua (cantidad total: 14,2 ml). El residuo sólido se secó al vacío a 20 °C para obtener el ácido 3'-aza-2'-fluorofólico como un polvo de color amarillo. Rendimiento: 78 mg, (0,17 mmol; 29 %).

EM-AR (ESI, muestra disuelta en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> usando ácido 3-hidroxipicolínico como matriz): m/z [MH]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>6</sub>: 461,1328; encontrado: 461,1328.

5 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1,88-1,96 (m, 1H, C(β)H), 2,03-2,10 (m, 1H, C(β)H'), 2,14-2,24 (m, 2H, C(γ)H<sub>2</sub>), 4,24-4,26 (m, 1H, C(α)H), 4,57 (s, 2H, C(6)CH<sub>2</sub>), 6,47 (dd, 1H, 5'H<sub>arom</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,6 Hz, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 1,8 Hz), 7,85 (dd, 1H, 4'H<sub>arom</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10,1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 8,6 Hz), 8,5 (s, 1H, C(7)H).

RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, D<sub>2</sub>O): 23,4, 28,7, 34,1, 44,3, 55,8, 101,7, 101,9, 105,9, 128,2, 142,2, 146,6, 147,4, 155,7, 159,4, 159,8, 164,2, 165,2, 165,3, 173,2, 178,8, 181,5, 182,3.

(d) Síntesis de éster di-*terc* butílico del ácido N-(2-amino-4-fluoropirimidin-5-carbonil)-L-glutámico

10 La síntesis se consiguió siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 5a) pero utilizando ácido 2-amino-4-fluoro-5-pirimidincarboxílico (obtenido de Abby Pharmatech, LLC) en lugar de ácido 6-amino-2-fluoronicotínico.

(e) Síntesis del éster di-*terc* butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3',5'-diaz-2'-fluorofólico

La síntesis se logró siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 5b) pero utilizando éster di-*terc* butílico del ácido N-(2-amino-4-fluoropirimidin-5-carbonil)-L-glutámico en lugar de éster di-*terc* butílico del ácido N-(6-amino-2-fluoronicotinil)-L-glutámico.

15 (f) Síntesis de ácido 3',5'-diaz-2'-fluorofólico

La síntesis se logró siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 5c) pero utilizando éster di-*terc* butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3',5'-diaz-2'-fluorofólico en lugar de éster di-*terc* butílico del ácido N<sup>2</sup>-acetil-3'-aza-2'-fluorofólico.

### Ejemplo 6: Coeficiente de partición

20 Para la determinación de logD<sub>7,4</sub> se preparó un tampón fosfato, preparando una solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,743 g; 12,81 mmol) y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (9,596 g; 53,91 mmol) en agua (1000 ml). Se preparó una solución saturada de tampón fosfato en n-octanol y una solución saturada de n-octanol en tampón fosfato. La solución de PBS (500 μl) y la solución de n-octanol (500 μl) se pipetearon en un tubo Eppendorf y se añadió el radiotrazador (5–10 μl). El tubo Eppendorf se agitó durante 15 min a temperatura ambiente en un agitador calefactado. Las dos fases se separaron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 3 min. Se transfirió una alícuota de cada fase (50 μl) a un tubo Eppendorf vacío para su recuento en un contador γ (Wizard, PerkinElmer). El valor de logD<sub>7,4</sub> se determinó calculando el logaritmo de la relación entre los recuentos en n-octanol y la fase de PBS. Los valores representan la media de 10 determinaciones de dos experimentos independientes.

La determinación del logD<sub>7,4</sub> revela las propiedades hidrófilas del ácido [<sup>18</sup>F]-2'-fluoro-3'-aza-fólico, lo que tiene como resultado un valor de -4,2 ± 0,1.

30 **Ejemplo 7: Experimentos de estabilidad**

(a) Estabilidad en plasma humano

35 Se probó la estabilidad del radiotrazador en plasma de sangre humana durante un periodo de 4 horas a 37 °C. El producto formulado (200 μl) se diluyó con tampón fosfato sódico (100 μl) y se añadió una alícuota (60 μl, 15 MBq) al plasma humano (500 μl) preincubado a 37 °C. La mezcla se agitó en un Thermomixer compacto (Eppendorf) a 37 °C y 500 rpm. Tras varios puntos temporales (0, 30, 60, 120, 150 y 240 min) se tomaron alícuotas tras la adición del trazador. Se añadió a cada alícuota (70 μl) MeOH enfriado en hielo (150 μl) para precipitar las proteínas. Para separar el sobrenadante del precipitado, la suspensión se centrifugó durante 10 min a 13 400 rpm (Eppendorf MiniSpin) a temperatura ambiente. El sobrenadante se pasó a través de un microfiltro (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Minisart RC 25, 0,45 μm) y se analizó en el sistema de radio-UPLC.

40 (b) Experimentos de estabilidad usando microsomas hepáticos

45 A una mezcla de tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,4; 0,5 M; 200 μl), se añadió sistema A regenerador de NADPH (50 μl), sistema B regenerador de NADPH (10 μl), una alícuota de ácido [<sup>18</sup>F]-3'-aza-2'-fluorofólico (38 μl, aprox. 15 MBq) y se completó con agua (677 μl) hasta un volumen de 975 μl y se preincubó a 37 °C. A continuación, se añadieron microsomas de hígado de ratón o humano (20 mg/ml, 25 μl) y se incubó a 37 °C. Tras varios puntos temporales (0, 20, 40 y 60 min) se tomaron alícuotas (100 μl) y la reacción enzimática se detuvo vertiendo la solución en metanol enfriado en hielo (200 μl). Cada muestra se diluyó con tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,4;

0,05 M; 600 µl). Cada punto temporal se realizó por triplicado y se analizó en un sistema radio-UPLC. Como control negativo, las muestras se incubaron sin microsomas o sin el sistema de regeneración de NADPH.

Como experimento control positivo, se incubó testosterona en lugar del trazador radiactivo con la mezcla de reacción.

#### 5 (c) Experimentos de estabilidad usando glutatión hepático

Se diluyeron glutatión (0,1 M; 100 µl), fracción S9 (20 mg/ml; 50 µl) y tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,4; 0,5 M; 200 µl) con agua (612 µl) hasta un volumen de 772 µl y se añadió ácido  $[\text{}^{18}\text{F}]\text{-3'-aza-2'-fluorofólico}$  (38 µl, aprox. 15 MBq). La mezcla se incubó a 37 °C. En varios puntos temporales se tomaron alícuotas (100 µl) y la reacción se detuvo vertiendo la muestra en metanol enfriado en hielo (200 µl). Cada muestra se diluyó con tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,4; 0,05 M; 600 µl). Cada punto temporal se realizó por duplicado y se analizó en un sistema radio-UPLC.

En resumen, el análisis de HPLC en todos los puntos temporales de investigación (durante un periodo de tiempo de 1 h) tuvo como resultado la detección de un único producto intacto, lo que indica que no se produjeron procesos de radiodefluoración o metabólicos y el ácido 3'-aza-2'- $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluorofólico}$  fue completamente estable durante el periodo completo de investigación (figura 2).

#### Ejemplo 8: Estudios de internalización *in vitro*

Se sembraron células KB en placas de 12 pocillos que se cultivaron durante toda la noche (~700 000 células en 2 ml de medio FFRPMI/pocillo). Se añadió ácido  $[\text{}^{18}\text{F}]\text{-3'-aza-2'-fluorofólico}$  (25 µl, 170 kBq) a cada pocillo. En algunos casos las células se incubaron con ácido fólico en exceso (100 µM) para bloquear los FR sobre la superficie de las células KB. Tras la incubación durante 1 o 2 h a 37 °C, las células se lavaron tres veces con PBS para determinar la captación celular total de ácido 3'-aza-2'- $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluorofólico}$ . Para evaluar la fracción de ácido 3'-aza-2'- $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluorofólico}$  que se internalizó, las células KB se lavaron con un tampón de deshidratación (solución acuosa de ácido acético 0,1 M y NaCl 0,15 M, pH 3) para liberar el radiotrazador unido a FR de la superficie de la célula. La lisis celular se realizó mediante la adición de 1 ml de NaOH 1 N a cada pocillo. Las suspensiones celulares se transfirieron a tubos de 4 ml y las muestras se contaron en un contador  $\gamma$ . Tras la homogeneización mediante agitación en vórtex, se determinó la concentración de proteínas para cada muestra mediante un kit de determinación de proteínas Micro BCA para estandarizar la radiactividad medida al contenido medio de 0,3 mg de proteína en un único pocillo. Los estudios de captación celular del radioproducto mostraron una captación e internalización específicas ya que se bloqueaban con un exceso de ácido fólico. Después de dos horas de incubación, la captación fue de aproximadamente el 78,17 % del total de la captación celular y la fracción de internalización representaba el 18,56 %. La inhibición conjunta con ácido fólico en exceso dio lugar a una inhibición de radiotrazador del 0,03 % (figura 5).

#### Ejemplo 9: Estudios de metabolitos *ex vivo*

Para la determinación de los radiometabolitos *in vivo* se inyectó por vía intravenosa ácido 3'-aza-2'- $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluorofólico}$  (60-70 MBq) en ratones portadores de tumores KB ( $n = 2$ ). Después de 5 min, se extrajeron muestras de sangre de la vena opuesta y los animales se sacrificaron 30 min después de la inyección del radiotrazador. Se obtuvieron muestra de sangre completa, hígado, tumor y orina. Las muestras de sangre se centrifugaron a 5000 g durante 5 min a 4 °C. Las proteínas de las muestras de plasma se precipitaron mediante la adición del mismo volumen de metanol enfriado en hielo seguido de centrifugación. Los sobrenadantes del plasma y la muestra de orina se diluyeron con tampón PBS y se analizaron mediante radio-UPLC. Los tejidos hepático y tumoral se homogeneizaron en un volumen igual de PBS usando un homogeneizador Polytron PT 1200 C (Kinematica AG). Tras la adición del mismo volumen de MeOH enfriado en hielo, la mezcla se centrifugó a 5000 g durante 5 min y 4 °C. El sobrenadante se aclaró del resto de las proteínas mediante adición de metanol enfriado en hielo, seguido de centrifugación. Las fracciones del sobrenadante resultante se diluyeron con tampón PBS y se analizaron mediante radio-UPLC.

El análisis de las muestras de plasma (5 min y 30 min), así como las muestras de orina y tumor no mostraron cantidad detectables de metabolitos. Por el contrario, los análisis de la muestra hepática mostraron signos de metabolismo (figura 4).

#### Ejemplo 10: Afinidad de unión al receptor de folato

Los ensayos de unión con el compuesto no radiactivo de referencia ácido 3'-aza-2'-fluorofólico se realizaron con células tumorales KB resuspendidas en PBS a pH 7,4 (7000 células/240 µl por tubo Eppendorf). Las células se incubaron por triplicado con ácido  $^3\text{H}$ -fólico (10  $\square$ l; 0,84 nM) y concentraciones crecientes de ácido 3'-aza-2'-fluorofólico (5,0 x 10<sup>-7</sup> a 5,0 x 10<sup>-12</sup> M en 250 µl de PBS a pH 7,4) en un agitador a 4 °C durante 30 min. La unión

inespecífica se determinó en presencia de ácido fólico en exceso ( $10^{-4}$  M). Tras la incubación, los tubos Eppendorf que contenían las suspensiones celulares se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Los pellets de células se lisaron mediante la adición de 0,5 ml de NaOH 1 M y se transfirieron a tubos de centelleo que contenían 5 ml de líquido de centelleo (Ultima Gold; Perkin Elmer). La radioactividad se midió usando un analizador de líquido de centelleo (Tri-Carb 1900 TR, Packard) y se determinó la concentración inhibidora del 50 % a partir de las curvas de desplazamiento usando el software *GraphPad Prism* (versión 5.01).

La determinación de la afinidad de unión a FR del compuesto de referencia no radiactivo ácido 3'-aza-2'-fluorofólico dio lugar a un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $0,81 \pm 0,18$  nM. Este valor está en el mismo rango que el valor de  $\text{IC}_{50}$  determinado para el ácido fólico nativo ( $\sim 0,9$  nM) lo que indica que se mantenía en gran medida la afinidad de unión del derivado de ácido fólico ácido 3'-aza-2'-fluorofólico.

### Ejemplo 11: Estudios de biodistribución

El departamento de veterinaria local aprobó los experimentos *in vivo* que se realizaron según la ley suiza de protección de animales. Se obtuvieron ratones desnudos atómicos hembras de seis a ocho semanas de edad (CD-1 Foxn-1/nu) de Charles River Laboratories (Sulzfeld, Alemania). Se alimentó a los animales con una dieta para roedores deficiente en folato que se inició 5 días antes de la inoculación de las células tumorales. Los ratones se inocularon con células KB ( $5 \times 10^6$  células en 100  $\mu\text{l}$  de PBS) en el tejido subcutáneo de cada hombro. Los experimentos con los animales se realizaron aproximadamente 14 días después de la inoculación de las células tumorales. Los estudios de biodistribución se realizaron por triplicado. El ácido  $[^{18}\text{F}]$ -3'-aza-2'-fluorofólico se diluyó en PBS pH 7,4 hasta la concentración de radiactividad deseada ( $\sim 5$  MBq por ratón) para su administración inmediata a través de una vena lateral de la cola. Los estudios de bloqueo se realizaron mediante la inyección de ácido fólico en exceso (100  $\mu\text{g}$  en 100  $\mu\text{l}$  de PBS) inmediatamente antes de la administración del ácido 3'-aza-2'- $[^{18}\text{F}]$ fluorofólico.

Los animales se sacrificaron a los 30 min, 60 min y 190 min después de la administración del radiofolato ácido 3'-aza-2'- $[^{18}\text{F}]$ fluorofólico. Los tejidos y órganos seleccionados se extrajeron, se pesaron y se contó su radiactividad en un contador  $\gamma$ . Los resultados se notifican como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de peso de tejido [% DI/g], usando los recuentos de referencia de una muestra definitiva del producto original inyectado que se contó a la vez.

En la tabla 2 se resumen los valores obtenidos que representan el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido [% DI/g] como promedio de tres o cuatro animales (tabla 2).

**Tabla 2** Datos de biodistribución del ácido  $[^{18}\text{F}]$ -3'-aza-2'-fluorofólico ( $[^{18}\text{F}]$ -3) en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de tumores de células KB

Órgano o tejido	30 min p.i. (n = 4)	60 min p.i. (n = 4)	90 min p.i. (n = 4)	60 min p.i. bloqueado* (n = 3)
<b>% DI/g en:</b>				
Sangre	1,2 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,3
Corazón	2,1 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2
Pulmones	2,0 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,3
Bazo	1,3 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
Hígado	13,7 $\pm$ 2,9	10,6 $\pm$ 0,9	10,3 $\pm$ 2,4	10,9 $\pm$ 3,4
Vesícula biliar	8,1 $\pm$ 2,9	8,4 $\pm$ 1,8	9,3 $\pm$ 0,6	15,8 $\pm$ 9,3
Riñones	54,8 $\pm$ 6,1	53,6 $\pm$ 3,2	57,3 $\pm$ 8,4	5,9 $\pm$ 4,5
Estómago	2,8 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,9	2,7 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3
Intestino	1,4 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,6
Heces	1,2 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 2,0	1,8 $\pm$ 0,3	6,0 $\pm$ 1,1
Glándulas salivales	9,0 $\pm$ 1,3	15,0 $\pm$ 6,1	14,1 $\pm$ 0,9	0,6 $\pm$ 0,2
Hueso	2,1 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,3

Músculo	1,7 ± 0,4	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,4	0,3 ± 0,1
Tumor	11,7 ± 0,9	11,9 ± 1,7	12,6 ± 1,8	1,7 ± 0,4
<b>Cocientes:</b>				
Tumor/Hígado	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,4	0,2 ± 0,1
Tumor/Riñones	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2
Tumor/Sangre	11,1 ± 4,1	21,6 ± 2,3	23,8 ± 4,1	2,2 ± 0,3
*En el grupo de bloqueo, cada animal recibió 100 µg de ácido fólico en PBS 10 min antes de la inyección del radiotrazador.				

### Ejemplo 12: Estudios por imagen con PET

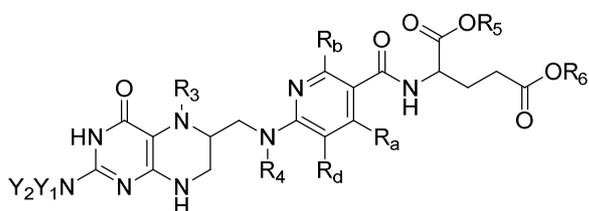
5 Los experimentos mediante PET se realizaron con un tomógrafo eXplore VISTA PET/CT (GE). Se inyectaron 10-18 MBq de ácido 3'-aza-2'-[<sup>18</sup>F]fluorofólico (100-150 µl por inyección) a través de la vena lateral de la cola. Para los estudios de bloqueo, los animales recibieron un exceso de ácido fólico (100 µg en 100 µl) mediante inyección intravenosa 10 minutos antes de la inyección de radiotrazador. Se anestesió a los animales con isoflurano en una mezcla de aire/oxígeno. Las exploraciones mediante PET se realizaron a los 120-150 min p.i. Tras la adquisición, los datos de PET se reconstruyeron en periodos de tiempo definidos por el usuario. Los conjuntos de datos combinados de PET y TAC se analizaron con el software PMOD (versión 3.2).

10 Se realizaron exploraciones PET dinámicas de los ratones 1,5-90 min p.i. de ácido 3'-aza-2'-[<sup>18</sup>F]fluorofólico y a los 60-150 min p.i. Las exploraciones PET estáticas de ácido [<sup>18</sup>F]-2'3'-aza-fólico se realizaron típicamente con un tiempo de exploración de 120 a 150 min p.i. Los ejemplos de resultados se muestran en las figuras 6A/F y 7. La exploración inicial estática (120-150 min p.i.) mostró una captación alta (SUV 1.9) y específica (12,6 ± 1,8 % DI/g) en xenoinjertos de células tumorales KB (figuras 6A y 7A). La captación en otros órganos no diana fue insignificante, con las únicas excepciones de hígado, riñones y glándulas salivales. Los estudios realizados con la inyección conjunta de ácido fólico (120-150 min p.i.) mostraron una reducción de la captación del radiotrazador en el tejido tumoral y en los riñones (figura 6B).

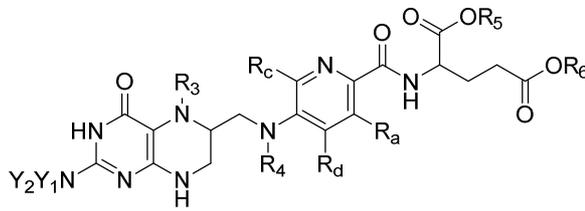
20 La inyección previa de pemetrexed (400 µg, 60 min antes del radiotrazador) en PBS (100 µl) mostró una reducción de la captación renal del radiotrazador y una reducción muy fuerte de la acumulación en el hígado, manteniéndose una alta captación del tumor (figura 7B).

## REIVINDICACIONES

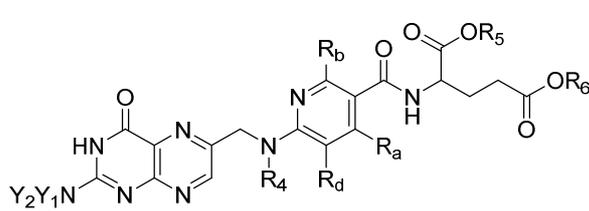
1. Un compuesto de fórmula IXa, IXb, XIIa, XIIb, XVa, XVb, XVIIIa, XVIIIb,



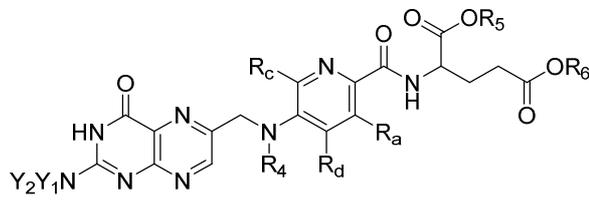
IXa



IXb

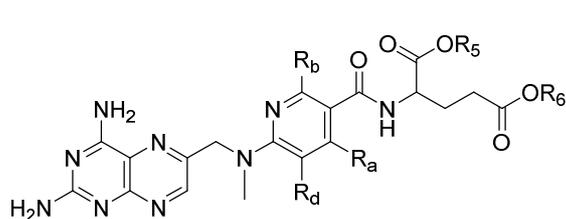


XIIa

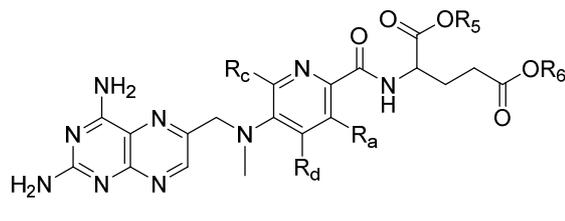


XIIb

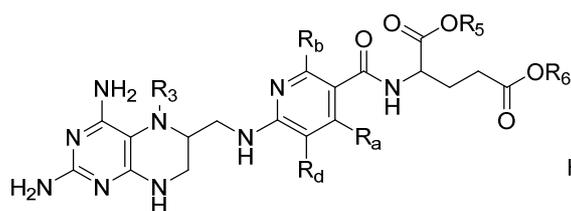
5



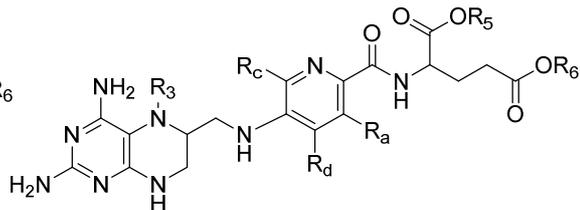
XVa



XVb



XVIIIa



XVIIIb

donde

R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>c</sub>, R<sub>d</sub> son independientemente entre sí H o <sup>18</sup>F, a condición de que uno de R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>c</sub>, R<sub>d</sub> sea <sup>18</sup>F,

10 R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> son independientemente entre sí H, formilo, iminometilo, nitroso, alquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, alcanóilo C1-C12, alcanóilo C1-C12 halosustituido,

a condición de que en las fórmulas XVIIIa y XVIIIb R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> sean independientemente entre sí H, metilo, formilo,

R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> son independientemente entre sí H o un alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes

embebidos pueden estar independientemente sustituidos por  $-O-$ ,  $-CO-$ ,  $-CO-O-$ ,  $-CO-NR'-$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-C\equiv C-$ , donde  $R'$  es H o alquilo C1-C6,

$Y_1$ ,  $Y_2$  se seleccionan independientemente entre sí a partir de H, formilo o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por CN, Hal o NO<sub>2</sub>, y donde uno o más de los grupos CH<sub>2</sub> no adyacentes embebidos pueden estar independientemente sustituidos por  $-O-$ ,  $-CO-$ ,  $-CO-O-$ ,  $-CO-NR'-$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-C\equiv C-$ , donde  $R'$  es H o alquilo C1-C6

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que  $R_5$ ,  $R_6$  son independientemente entre sí H o un alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por CN, Hal o NO<sub>2</sub>.
3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que  $R_5$ ,  $R_6$  son independientemente H o un alquilo C1-C12 de cadena lineal o ramificada.
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que  $R_3$ ,  $R_4$  son independientemente entre sí H, formilo o metilo.
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedente, en el que  $Y_1$ ,  $Y_2$  son independientemente entre sí H, formilo, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> de cadena lineal o ramificada, que no está sustituido o está sustituido por CN, Hal o NO<sub>2</sub>.
6. Un método de producción de un compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 que comprende el paso de radiomarcaje directo con [<sup>18</sup>F]fluoruro.
7. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en diagnóstico por imagen de una célula o población de células que expresan un receptor de folato *in vitro* o *in vivo*.
8. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en la administración conveniente y eficaz a un sujeto que necesita un diagnóstico por imagen.
9. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método para el diagnóstico por imagen de una célula o población de células que expresan un receptor de folato, comprendiendo dicho método los pasos de administrar al menos un compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 en una cantidad para diagnóstico por imagen, y obtener una imagen diagnóstica de dicha célula o población de células.
10. Compuesto para su uso según la reivindicación 9, en el que se realiza el diagnóstico por imagen de una célula o población de células que expresan un receptor de folato *in vitro* o *in vivo*.
11. Método para la detección *in vitro* de una célula que expresa el receptor de folato en una muestra de tejido que incluye poner en contacto dicha muestra de tejido con un compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 en cantidades eficaces y durante tiempo suficiente y condiciones que permitan que se produzca la unión y detectar dicha unión mediante técnicas como autorradiografía y similares.
12. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método de diagnóstico por imagen o seguimiento de un sujeto que comprende los pasos de (i) administrar al menos un compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 en una cantidad para diagnóstico por imagen y (ii) realizar un diagnóstico por imagen usando PET mediante la detección de una señal de dicho al menos un compuesto.
13. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método de seguimiento del tratamiento del cáncer o enfermedades inflamatorias y autoinmunes en un sujeto que comprende los pasos de (i) administrar a un sujeto que lo necesita al menos un compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 en una cantidad para diagnóstico por imagen en combinación con un compuesto terapéuticamente activo de elección, y (ii) realizar un diagnóstico por imagen usando PET mediante la detección de una señal procedente de dicho al menos un compuesto para seguir la evolución del tratamiento del cáncer o de enfermedades inflamatorias y autoinmunes.
14. Compuesto para su uso según las reivindicaciones 12 y 13 usado en combinación con cualquier otro método de diagnóstico y tratamiento del cáncer o enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

Figura 1A

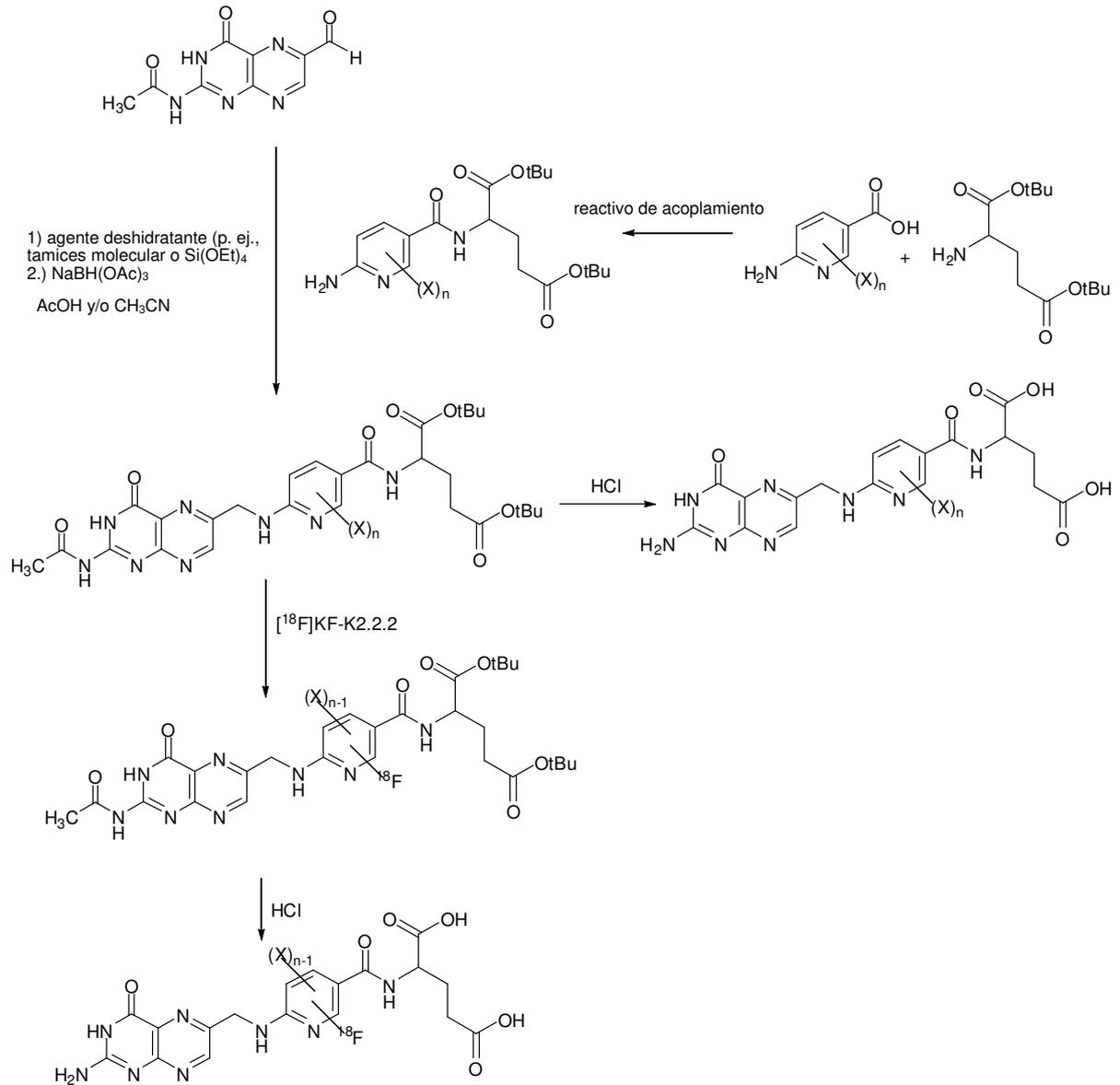


Figura 1B

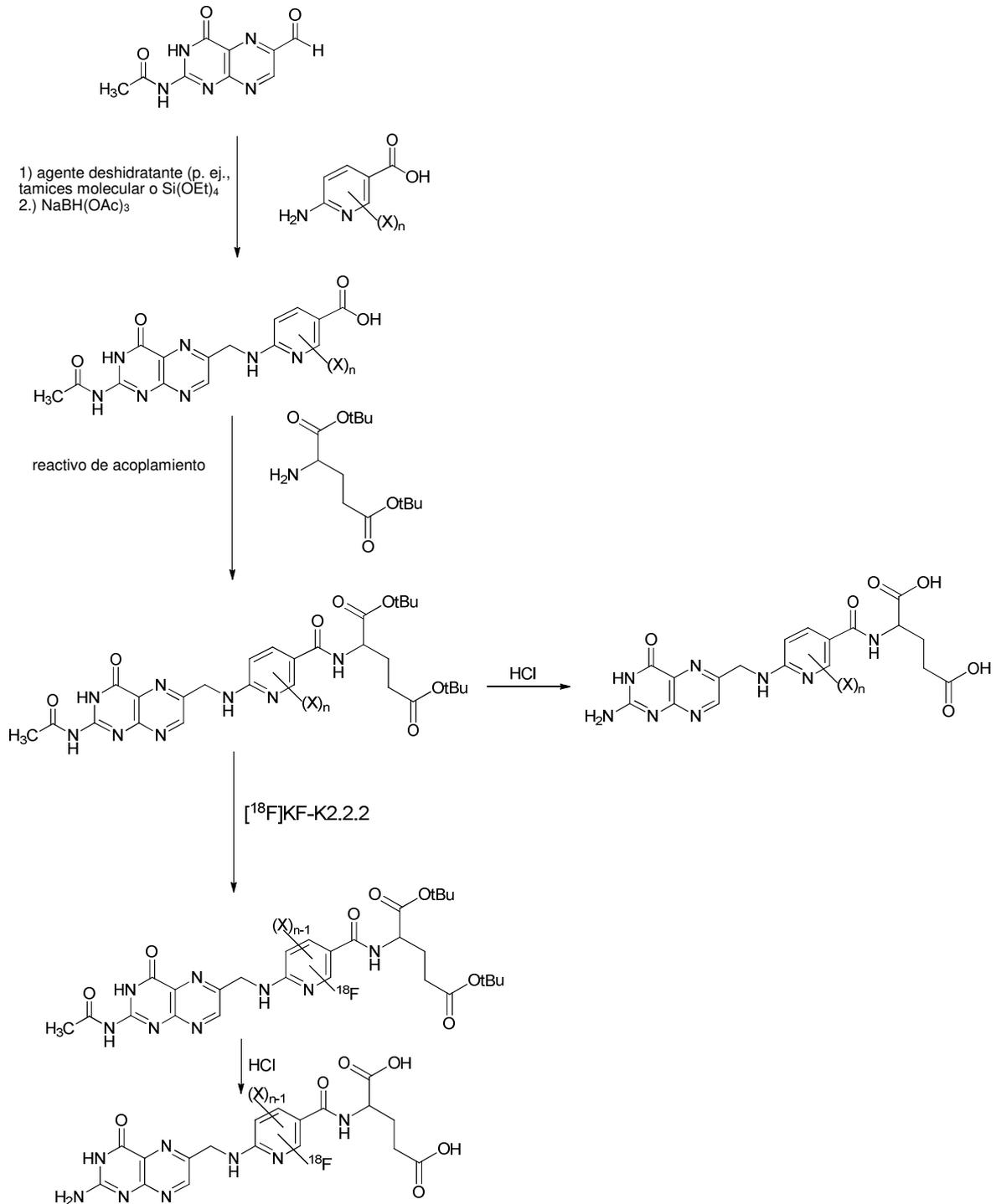


Figura 1C

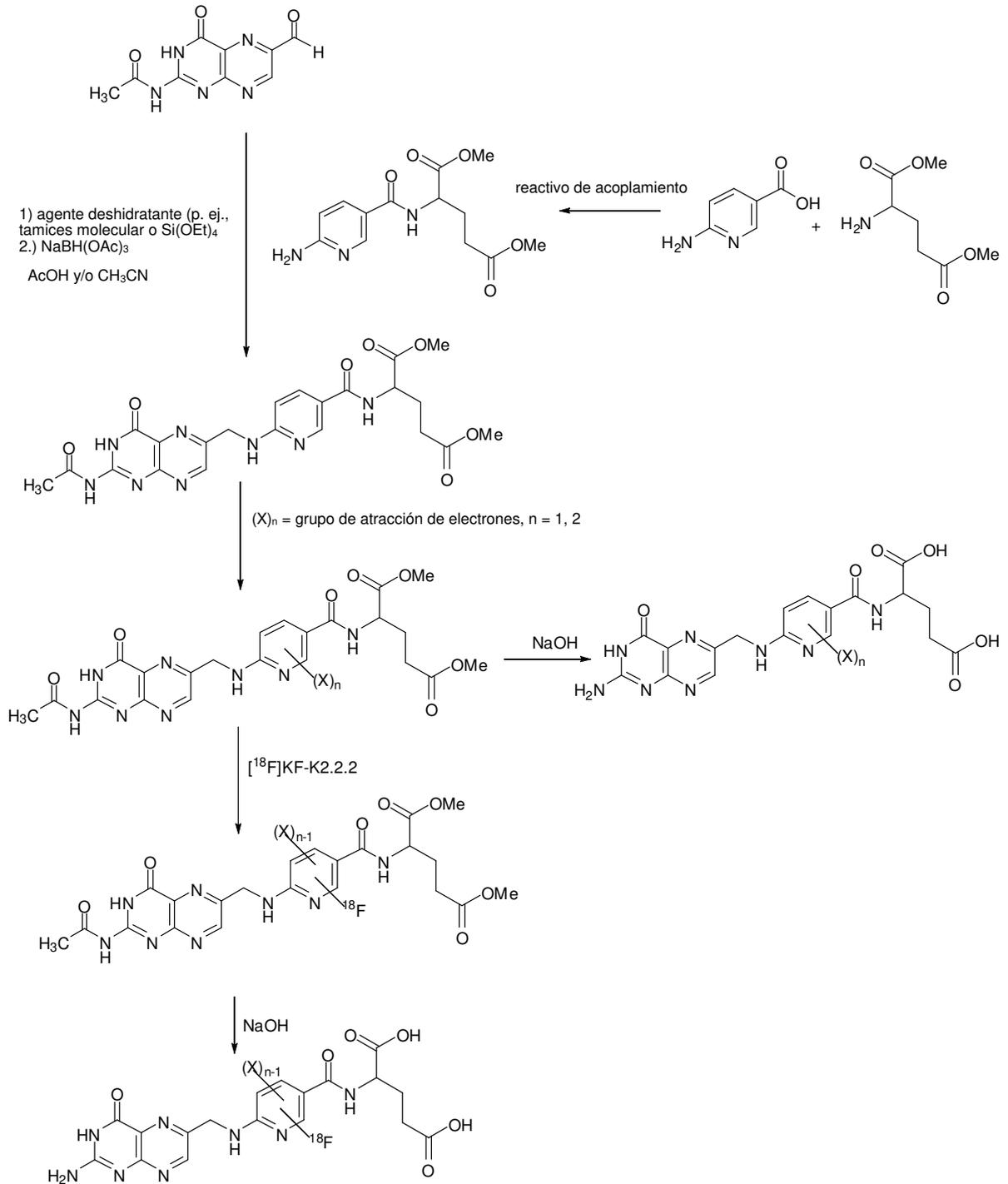


Figura 2

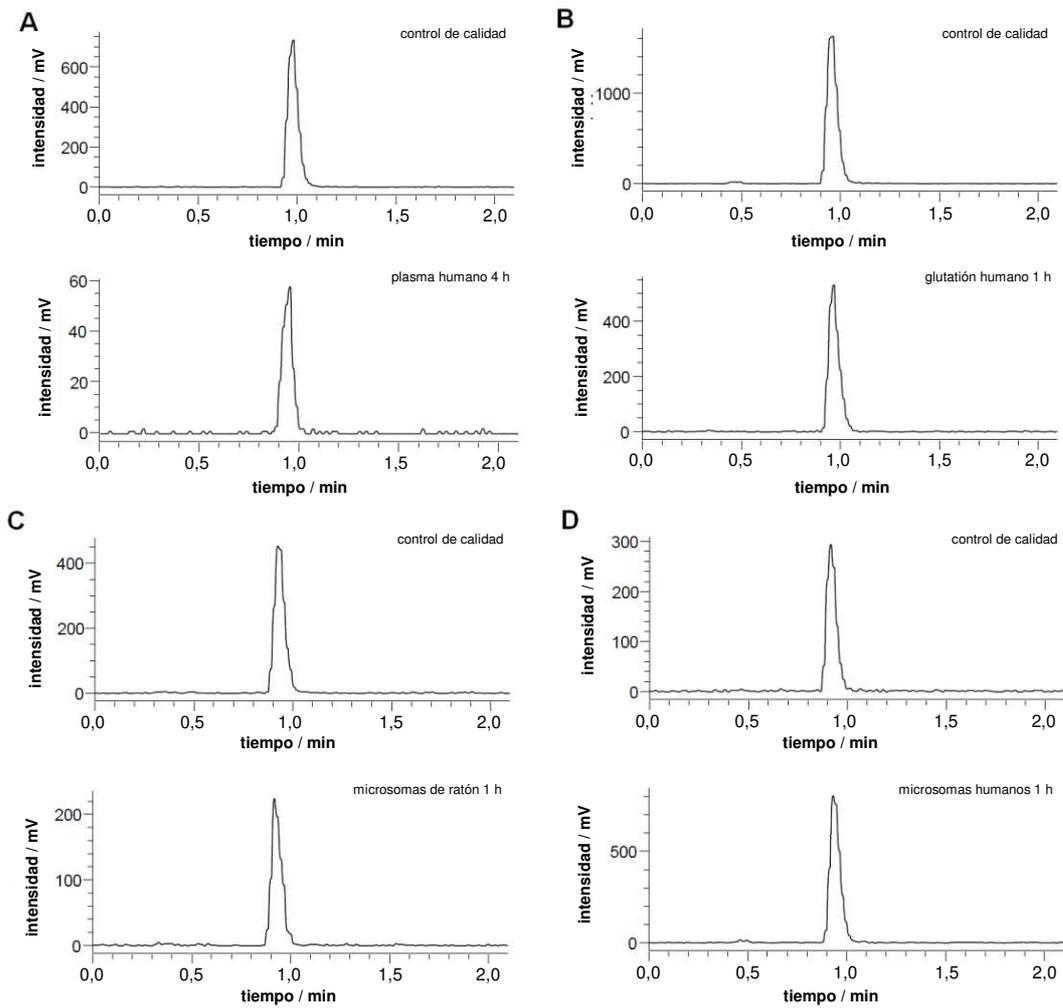


Figura 3

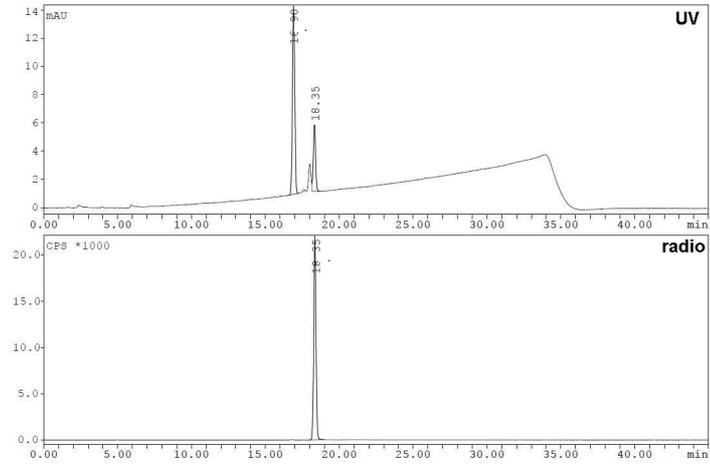


Figura 4

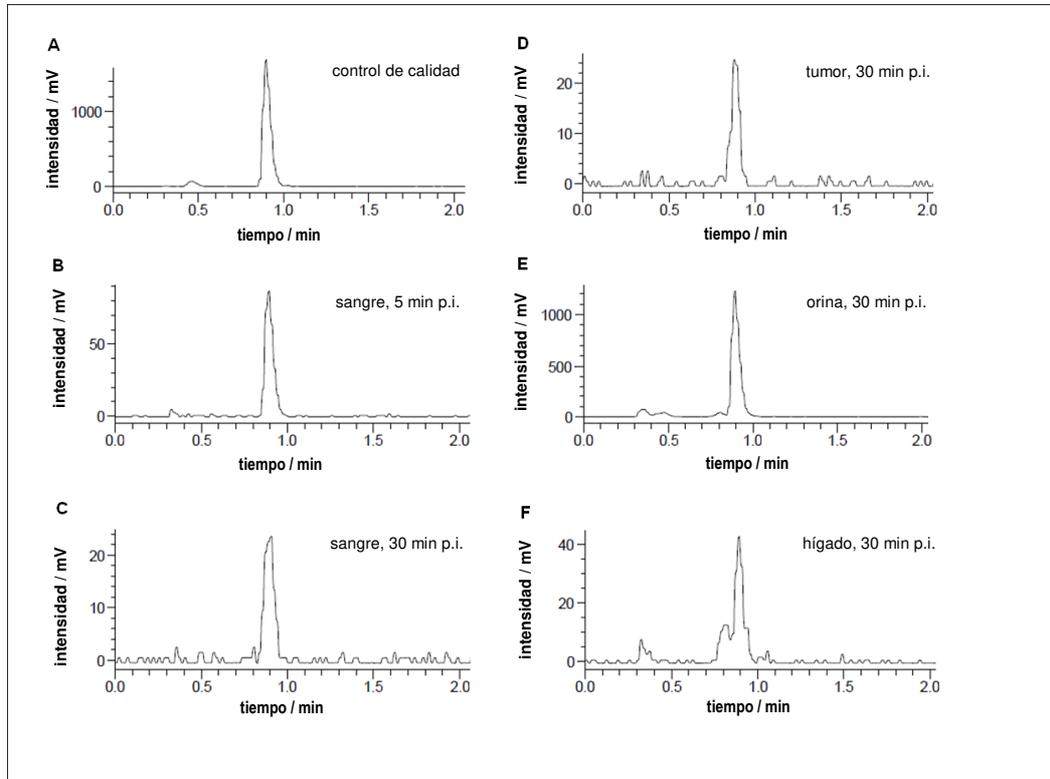


Figura 5

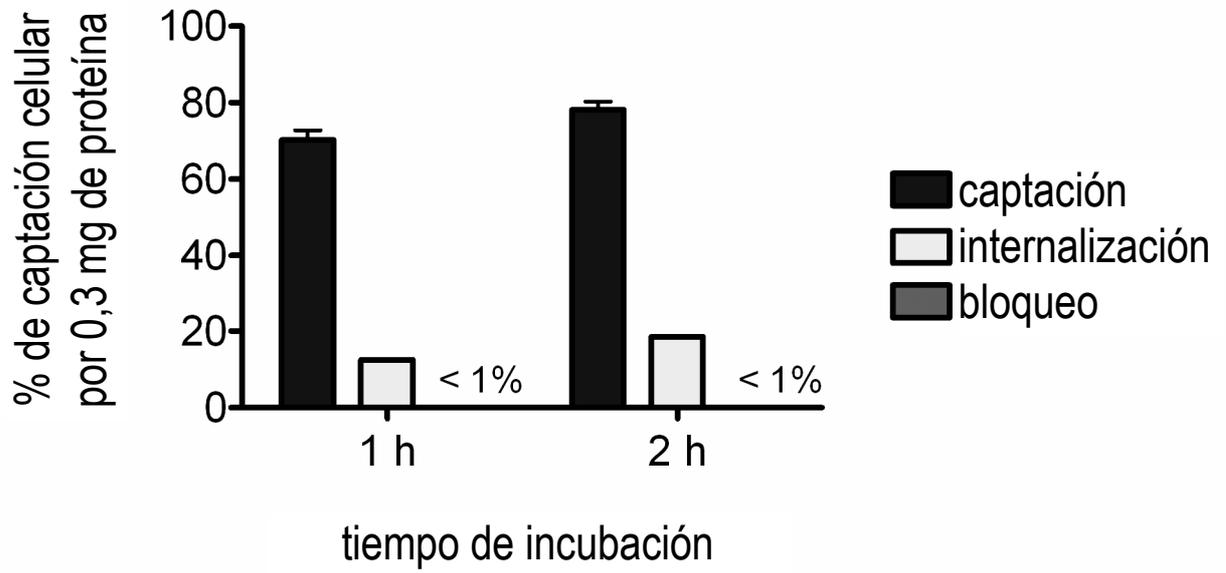


Figura 6

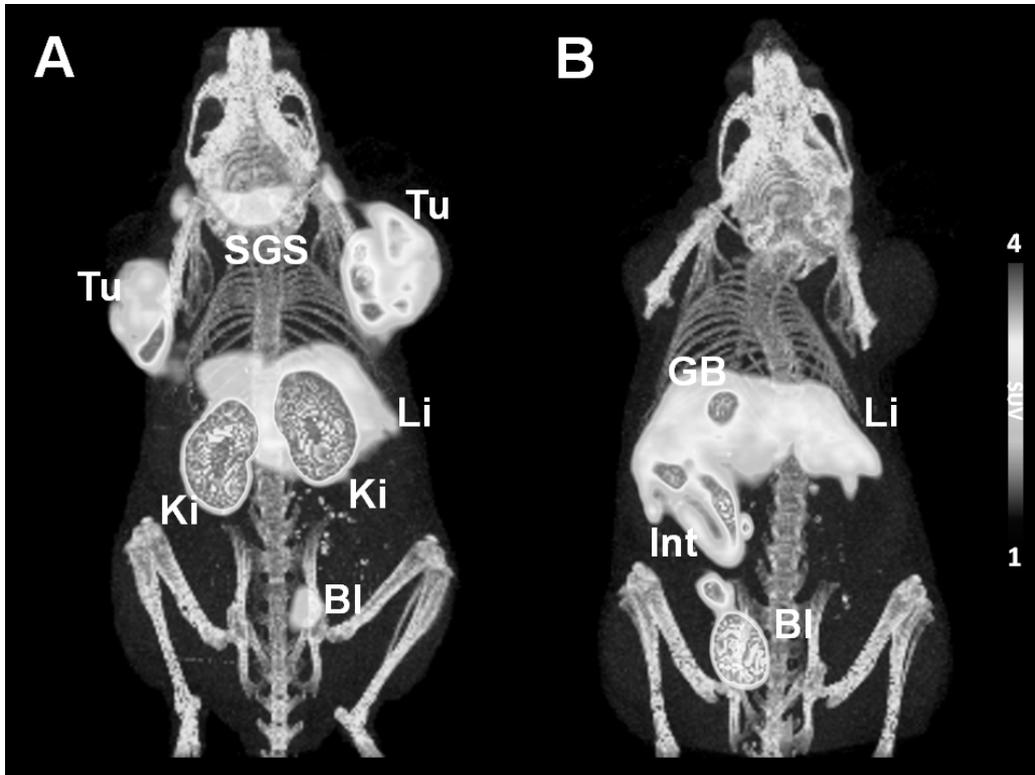


Figura 7

