

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 448**

51 Int. Cl.:

A61K 51/04 (2006.01)

C07B 59/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2005 PCT/US2005/046708**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2006 WO06071754**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2005 E 05855293 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 1827239**

54 Título: **Procedimiento de análisis por imagen mediante tomografía por emisión de positrones**

30 Prioridad:

23.12.2004 US 638924 P

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

15.11.2019

73 Titular/es:

**PURDUE RESEARCH FOUNDATION (50.0%)
3000 Kent Avenue
West Lafayette, IN 47906, US y
ENDOCYTE, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LOW, PHILIP STEWART;
VARGHESE, BINDU y
VLAHOV, IONTCHO RADOSLAVOV**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 731 448 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de análisis por imagen mediante tomografía por emisión de positrones

5 **SECTOR DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el diagnóstico/monitorización, utilizando tomografía por emisión de positrones, de estados de dolencia patógenos en los que las células patógenas expresan de forma única, expresan, de forma preferente, o sobreexpresan receptores de vitaminas. De forma más particular, las vitaminas, o sus análogos, conjugados con un radióforo útil en tomografía por emisión de positrones, se utilizan para el diagnóstico y la monitorización de dichos estados de dolencia utilizando un dispositivo extracorpóreo.

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los procedimientos de tratamiento y/o procedimientos de diagnóstico se refieren a los compuestos, composiciones farmacéuticas y fármacos de la presente invención para la utilización en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia y/o para el diagnóstico.

ANTECEDENTES

Los receptores de vitaminas se sobreexpresan en las células cancerosas. Por ejemplo, el receptor de folato, una proteína anclada a GPI de 38 KD que se une a la vitamina ácido fólico con alta afinidad (<1 nM), se sobreexpresa en los cánceres de ovario, mama, bronquios y cerebro. Después de la unión al receptor, la endocitosis rápida libera folato dentro de la célula, en la que se descarga en un compartimento endosomal a un pH bajo. De forma importante, la conjugación covalente de pequeñas moléculas, proteínas e incluso liposomas con folato no bloquea la capacidad del folato para unirse a su receptor y, por lo tanto, los conjugados de folato pueden administrarse fácilmente a las células y pueden entrar en las mismas mediante endocitosis mediada por receptores.

Debido a que la mayoría de las células utilizan un portador de folato reducido no relacionado para adquirir el ácido fólico necesario, la expresión del receptor de folato se restringe a unos pocos tipos de células. Con la excepción del riñón, el plexo coroideo y la placenta, los tejidos normales expresan niveles bajos o no detectables del receptor de folato. Sin embargo, muchos tejidos malignos, incluidos los cánceres de ovario, mama, bronquios y cerebro, expresan niveles significativamente elevados del receptor. De hecho, se estima que el 95 % de todos los carcinomas de ovario sobreexpresan el receptor de folato.

También se ha informado de que el receptor β de folato, la isoforma no epitelial del receptor de folato, se expresa en macrófagos sinoviales activados (pero no en reposo). Por lo tanto, los receptores de folato se expresan en un subconjunto de macrófagos (es decir, macrófagos activados). Los macrófagos activados pueden participar en la respuesta inmune envolviendo de forma inespecífica y matando patógenos extraños dentro del macrófago, mostrando péptidos degradados de proteínas extrañas en la superficie celular del macrófago, en la que pueden ser reconocidos por otras células inmunes y secretando citocinas y otros factores que modulan la función de los linfocitos T y B, lo que da como resultado una mayor estimulación de las respuestas inmunes. Los macrófagos activados también pueden contribuir a la fisiopatología de la dolencia en algunos casos. Por ejemplo, los macrófagos activados pueden contribuir a la aterosclerosis, la artritis reumatoide, los estados de enfermedad autoinmune y la enfermedad de injerto contra huésped, entre otros estados de dolencia. También se ha demostrado que los monocitos activados sobreexpresan el receptor de folato. En la solicitud de patente de Estados Unidos. No. 60/696.740 y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US-2002-0192157-A1 se da a conocer la sobreexpresión de los receptores de folato en macrófagos activados, y en monocitos activados.

Un ejemplo de la contribución de los macrófagos activados a los estados de dolencia es la implicación de los macrófagos activados en la progresión de la aterosclerosis. La aterosclerosis es un estado de dolencia que se inicia cuando se forma una estría grasa dentro de la pared de un vaso sanguíneo. Se cree que la formación de estrías grasas es el resultado de la acumulación de partículas de lipoproteínas en la capa íntima de la pared del vaso sanguíneo, subyaciendo la capa de la pared del vaso la capa de células endoteliales lumbales. Las partículas de lipoproteínas pueden asociarse con los componentes de la matriz extracelular en la capa íntima y pueden volverse inaccesibles para los antioxidantes del plasma, lo que da como resultado la modificación oxidativa de las partículas de lipoproteínas. Dicha modificación oxidativa puede desencadenar una respuesta inflamatoria local que da como resultado la adhesión de macrófagos activados y linfocitos T al endotelio luminal, seguido de la migración hacia la capa íntima. Las partículas de lipoproteínas oxidadas pueden actuar por sí mismas como quimioatrayentes para las células del sistema inmunológico, tales como los macrófagos y las células T, o pueden inducir a las células de la pared vascular a producir quimioatrayentes. A continuación, la lesión aterosclerótica puede formar una cápsula fibrosa con un núcleo rico en lípidos lleno de macrófagos activados. Las lesiones ateroscleróticas que son inestables se caracterizan por una inflamación local, y las lesiones que se han roto y causado un infarto de miocardio fatal se caracterizan por una infiltración de macrófagos activados y linfocitos T.

La patente de Estados Unidos No. 6.782.289, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US-2005-0244336-A1, y la publicación internacional PCT No WO2004/110250 proporcionan discusiones sobre los

posibles orígenes de la dolencia de los vasos sanguíneos. Las referencias dan a conocer sistemas basados en catéteres para la detección de conjugados radiomarcados que se unen a macrófagos activados dentro de un vaso sanguíneo u otro lumen corporal. Henkin J. y Washtein W.L. (J. Med. Chem. (1983) 26, 1193-1196) dan a conocer análogos de aminopterina con sustituciones de flúor simples como antifolatos.

5

CARACTERÍSTICAS

De este modo, la presente invención da a conocer composiciones y procedimientos para el diagnóstico/monitorización, utilizando tomografía por emisión de positrones, de estados de dolencia patógenos, que incluyen cánceres y estados de dolencia que implican macrófagos activados o monocitos activados, en los que las células patógenas expresan de forma única, expresan de forma preferente, o sobreexpresan receptores de vitamina.

10

La presente invención da a conocer un conjugado para la utilización en el diagnóstico/monitorización de un estado de dolencia mediado por monocitos activados o macrófagos activados que tienen sitios de unión accesibles para una vitamina, teniendo el conjugado la siguiente fórmula general

15

L-X

en la que L es ácido fólico y el grupo X comprende un radióforo, que comprende un radioisótopo, en el que el radioisótopo es ^{18}F .

La presente invención también da a conocer un compuesto para el diagnóstico por imagen de fórmula

20

L-X

en la que L es ácido fólico, y

en la que X comprende un radióforo, que comprende un radioisótopo que se descompone con una semivida desde 80 minutos hasta 8 horas mediante emisión de positrones, en la que dicho radioisótopo emite un par de fotones de aniquilación que se mueven en direcciones opuestas, y en la que los fotones de aniquilación se producen como resultado de la aniquilación de positrones con un electrón, y en la que el isótopo es ^{18}F .

25

También se dan a conocer procedimientos para la preparación de compuestos que comprenden: proporcionar el grupo L en una forma reactiva capaz de reaccionar con un radióforo en forma reactiva; proporcionar el radióforo en forma reactiva capaz de reaccionar con el grupo L en forma reactiva; y poner en contacto la forma reactiva del grupo L con la forma reactiva del radióforo.

30

Muchas placas ateroscleróticas inestables (es decir, activas) son capaces de romperse y causar síndromes ateroscleróticos agudos, pero no producen el estrechamiento luminal de los vasos sanguíneos, en particular en la circulación coronaria. De este modo, esta realización representa un avance significativo en el diagnóstico del riesgo de infarto de miocardio, y en la evaluación de la necesidad de intervención clínica, en pacientes que padecen aterosclerosis.

35

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

40

La figura 1 muestra el cromatograma de HPLC de folato-succinimidilo-fluorobenzoato bruto (folato-SFB).

La figura 2 muestra el espectro de masas de folato-SFB bruto.

La figura 3 muestra el espectro de masas de folato-SFB purificado.

La figura 4 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva en el que la radioactividad asociada a las células KB se midió para células KB solas (primera barra), células KB incubadas con ^3H -folato (segunda barra), células KB incubadas con ^3H -folato en presencia de folato-SFB 100 nM (tercera barra), o células KB incubadas con ^3H -folato en presencia de folato-SFB 10 μM (cuarta barra).

45

La figura 5 muestra el cromatograma de HPLC de folato-fluorobenzaldehído (folato-FBA).

La figura 6 muestra el espectro de masas de folato-FBA.

50

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención utiliza un compuesto que emite radiación (es decir, un radióforo) y que es útil en un procedimiento de diagnóstico/monitorización que emplea tomografía por emisión de positrones (es decir, un compuesto que emite radiación de positrones capaz de producir un par de fotones de aniquilación que se mueven en direcciones opuestas, produciéndose los fotones de aniquilación como resultado de la aniquilación de positrones con un electrón). El radióforo comprende, típicamente, un radioisótopo unido a otra estructura química (por ejemplo, un anillo de benceno) para formar el compuesto que emite radiación (es decir, el radióforo). Sin embargo, el radióforo puede comprender el radioisótopo solo.

60

De acuerdo con la presente invención, un compuesto (por ejemplo, un radióforo) "útil en tomografía por emisión de positrones" significa un compuesto que emite radiación de positrones capaz de producir un par de fotones de aniquilación que se mueven en direcciones opuestas, siendo producidos los fotones de aniquilación como resultado de la aniquilación de positrones con un electrón.

65

Además, de acuerdo con la presente invención, la utilización de la tomografía por emisión de positrones (PET)

requiere que el compuesto (por ejemplo, el radióforo) utilizado en la PET emita radiación de positrones capaz de producir un par de fotones de aniquilación que se mueven en direcciones opuestas, siendo producidos los fotones de aniquilación como resultado de la aniquilación de positrones con un electrón.

5 El ácido fólico conjugado con un radióforo útil en la PET, se utiliza para el diagnóstico y/o monitorización de los estados de dolencia utilizando un dispositivo extracorpóreo. La detección por PET que utiliza un dispositivo extracorpóreo también se conoce como "exploración por PET", y los dispositivos para la detección extracorpórea que utilizan PET son bien conocidos en la técnica.

10 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el diagnóstico/monitorización, utilizando PET, de estados de dolencia patógenos en los que las células patógenas expresan de forma única, expresan de forma preferente, o sobreexpresan receptores de vitaminas u otros receptores. La invención es aplicable a poblaciones de células patógenas que causan una variedad de patologías, tales como el cáncer. De este modo, la población de células patógenas puede ser una población de células cancerosas que sea tumorigénica, incluyendo los tumores benignos y los tumores malignos, o puede ser no tumorigénica. La población de células cancerosas puede surgir espontáneamente o por procesos, tales como las mutaciones presentes en la línea germinal del paciente o las mutaciones somáticas, o puede estar inducida por agentes químicos, virales o por radiación. La invención puede utilizarse para el diagnóstico/monitorización de cánceres, tales como carcinomas, sarcomas, linfomas, enfermedad de Hodgkin, melanomas, mesoteliomas, linfoma de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos, leucemias y mielomas. La población de células cancerosas puede incluir, pero sin limitación a los mismos, cánceres oral, de tiroides, endocrino, de piel, gástrico, esofágico, laríngeo, pancreático, de colon, de vejiga, de hueso, de ovario, cervical, uterino, de mama, testicular, de próstata, de recto, de riñón, de hígado y de pulmón.

25 Las células patógenas también pueden ser monocitos activados o macrófagos asociados con estados de dolencia, tales como fibromialgia, artritis reumatoide, osteoartritis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, psoriasis, osteomielitis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, esclerosis sistémica, rechazo de trasplante de órganos (GVHD), lupus eritematoso, síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, inflamaciones de la piel (por ejemplo, psoriasis), inflamaciones crónicas e inflamaciones debidas a lesiones (por ejemplo, una lesión en la cabeza o la médula espinal o una embolia).

30 Se da a conocer un procedimiento para el diagnóstico/monitorización de un estado de dolencia mediado por macrófagos activados o monocitos activados que tienen sitios de unión accesibles para una vitamina. El procedimiento comprende las etapas de administrar a un paciente al que se está evaluando el estado de dolencia una cantidad eficaz de un conjugado de fórmula general L-X, en el que L comprende una vitamina, o un análogo de la misma, y el grupo X comprende un radióforo, que permite un tiempo suficiente para que el conjugado vitamínico se una a los monocitos activados o los macrófagos activados, y para el diagnóstico/monitorización del estado de dolencia de forma extracorpórea utilizando la tomografía por emisión de positrones.

40 Se da a conocer un procedimiento para el diagnóstico/monitorización de un cáncer, en el que las células cancerosas expresan de forma única, expresan de forma preferente o sobreexpresan los receptores de vitaminas. El procedimiento comprende las etapas de administrar a un paciente a quien se le está evaluando el cáncer una cantidad eficaz de un conjugado de fórmula general L-X, en la que L comprende una vitamina, o un análogo de la misma, y el grupo X comprende un radióforo, en el que el radióforo tiene una semivida de aproximadamente 80 minutos a aproximadamente 8 horas, lo que permite un tiempo suficiente para que el conjugado de la vitamina se adhiera a las células cancerosas y el diagnóstico/monitorización del cáncer de forma extracorpórea mediante tomografía por emisión de positrones.

50 Se da a conocer un procedimiento para el diagnóstico/monitorización de placas ateroscleróticas activas asociadas con vasos sanguíneos en el que las placas comprenden macrófagos activados que tienen sitios de unión accesibles para una vitamina. El procedimiento comprende las etapas de administrar a un paciente al que se está evaluando aterosclerosis una cantidad eficaz de un conjugado de fórmula general L-X, en el que L comprende una vitamina o un análogo de la misma, y el grupo X comprende un radióforo capaz de descomponerse por emisión de positrones, lo que permite un tiempo suficiente para que el conjugado de la vitamina se una a los macrófagos activados asociados con las placas activas, y el diagnóstico/monitorización de las placas activas extracorpóreas utilizando la tomografía por emisión de positrones.

60 Este ejemplo se refiere a un procedimiento para el diagnóstico/monitorización de placas ateroscleróticas activas en las paredes de los vasos sanguíneos. Un ligando (por ejemplo, una vitamina, o un análogo de la misma) que se une a un receptor que se expresa de forma preferente, se expresa de forma única, o se sobreexpresa en la superficie de los macrófagos activados en relación con los macrófagos en reposo, se conjuga con un radióforo. Los conjugados se administran a un paciente al que se está evaluando aterosclerosis. Los conjugados se unen a macrófagos activados asociados con placas ateroscleróticas activas. La radiación emitida por el radióforo se detecta de forma extracorpórea mediante tomografía por emisión de positrones. Por consiguiente, los conjugados se pueden utilizar para distinguir las placas ateroscleróticas activas, que contienen macrófagos activados, de las placas inactivas en las que las placas están presentes en las arterias o venas de un paciente al que se está evaluando para detectar aterosclerosis.

Muchas placas ateroscleróticas inestables (es decir, activas) son capaces de romperse y causar síndromes ateroscleróticos agudos, pero no producen un estrechamiento luminal de los vasos sanguíneos, en particular en la circulación coronaria. De este modo, el procedimiento de la presente invención representa un avance significativo en el diagnóstico del riesgo de infarto de miocardio y en la evaluación de la necesidad de intervención clínica en pacientes que padecen aterosclerosis.

De acuerdo con los ejemplos en los que los conjugados se unen a los monocitos o macrófagos activados, los conjugados pueden formarse a partir de una amplia variedad de ligandos y radióforos, que incluyen cualquier ligando que se una a un receptor sobreexpresado, expresado de forma única, o expresado de forma preferente, en la superficie de los monocitos activados o macrófagos activados que no se expresan/presentan o no están presentes en cantidades significativas en la superficie de los monocitos o macrófagos en reposo. Para los macrófagos activados, dichos ligandos incluyen péptidos N-formilo (por ejemplo, f-Met-Leu-Phe), proteína del factor 1 del grupo de alta movilidad (HMGBI), fragmentos de hialuronano, HSP-70, ligandos del receptor de tipo toll, ligandos del receptor secuestrante, correceptores para la presentación de antígenos, ligandos que se unen a los marcadores CD68, BER-MAC3, RFD7, CD4, CD14 y HLA-D en macrófagos activados, ligandos que se unen a los receptores del activador del plasminógeno de urocinasa (por ejemplo, el péptido WX-360), anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que se unen, de forma preferente, a macrófagos activados, y vitaminas o análogos/derivados de vitaminas de unión al receptor.

Para los monocitos, el ligando de unión a monocitos puede ser cualquier ligando que se una a un receptor expresado o sobreexpresado en monocitos activados, que incluye los ligandos de unión a CD40, CD16, CD14, CD11b y CD62, 5-hidroxitriptamina, proteína inflamatoria de macrófagos 1- α , MIP-2, antagonistas del ligando de receptor activador para el factor nuclear kB, ligandos de unión de la proteína 1 quimiotáctica de monocitos, ligandos de unión al receptor de quimiocina 5, ligandos de unión a RANTES, ligandos de unión al receptor de quimiocina y vitaminas o análogos/derivados de vitamina de unión a receptor, y similares. Los conjugados son capaces de unirse de forma preferente, a monocitos activados o macrófagos activados en comparación con monocitos o macrófagos en reposo debido a la expresión preferente del receptor para el ligando en monocitos o macrófagos activados.

En los ejemplos descritos anteriormente, el ligando (por ejemplo, una vitamina o un análogo o derivado de la misma) puede ser cualquier ligando que se una a un receptor que se exprese de forma preferente, se exprese de forma única o se sobreexprese, en la superficie de las células cancerosas, o monocitos activados o macrófagos activados en relación con los monocitos o macrófagos en reposo. Entre los ejemplos de dichos ligandos se encuentran las vitaminas seleccionadas del grupo que consiste en ligandos de unión al receptor de folato, ligandos de unión al receptor de biotina, ligandos de unión al receptor de vitamina B₁₂, ligandos de unión al receptor de riboflavina, ligandos de unión al receptor de tiamina y otros ligandos de unión al receptor de vitamina, o análogos o derivados de los mismos.

Las fracciones de vitaminas aceptables que pueden utilizarse incluyen niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina, tiamina, biotina, vitamina B₁₂ y las vitaminas liposolubles A, D, E y K. En una realización, estas vitaminas, y sus análogos y derivados de unión al receptor, constituyen la entidad de direccionamiento que puede acoplarse con un radióforo, capaz de emitir radiación, para formar los conjugados para su utilización de acuerdo con la invención. Las fracciones de vitaminas preferentes incluyen ácido fólico, biotina, riboflavina, tiamina, vitamina B₁₂ y análogos de unión al receptor y derivados de estas moléculas de vitamina, y otras moléculas relacionadas con la unión al receptor de vitaminas (véase la patente de Estados Unidos No. 5.688.488). Un ejemplo de un análogo de vitamina es un análogo de folato que contiene un residuo de ácido glutámico en la configuración D (el ácido fólico normalmente contiene un ácido glutámico en la configuración L unida al ácido pterico).

En la presente invención, el ligando de unión al receptor de vitamina es ácido fólico.

En todos los ejemplos descritos anteriormente, el radióforo puede incluir un isótopo emisor de positrones que tiene un perfil de semivida y toxicidad adecuados. En diversas realizaciones, el radioisótopo tiene una semivida de más de 30 minutos, más de 70 minutos, más de 80 minutos, más de 90 minutos, más de 100 minutos, menos de 8 horas, menos de 6 horas, menos de 4 horas o menos de 3 horas. En otras realizaciones, el radioisótopo tiene una semivida de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas, aproximadamente 70 minutos a aproximadamente 4 horas, aproximadamente 80 minutos a aproximadamente 4 horas, aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 4 horas, aproximadamente 100 minutos a aproximadamente 4 horas, aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 70 minutos a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 80 minutos a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 100 minutos a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 8 horas, aproximadamente 70 minutos a aproximadamente 8 horas, aproximadamente 80 minutos a aproximadamente 8 horas, aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 8 horas, o aproximadamente 100 minutos a aproximadamente 8 horas.

En diversos ejemplos, el radioisótopo se selecciona de un grupo que consiste en ³⁴Cl, ⁴⁵Ti, ⁵¹Mn, ⁶¹Cu, ⁶³Zn, ⁶⁸Ga, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O y ¹⁸F. En la presente invención el radioisótopo es ¹⁸F.

En los conjugados de la fórmula general L-X, el grupo L es un ligando capaz de unirse a células cancerosas o monocitos activados o macrófagos activados en comparación con monocitos o macrófagos en reposo, tal como se ha descrito anteriormente. En una realización ilustrativa, el ligando de unión a células cancerosas o monocitos activados o macrófagos activados es ácido fólico, un análogo/derivado de ácido fólico u otra molécula de unión a receptor de folato.

El sitio de unión para el ligando (por ejemplo, una vitamina o un análogo o un derivado de la misma) puede incluir receptores para cualquier molécula de ligando capaz de unirse, de forma preferente, a un receptor expresado de forma única, sobreexpresado o expresado/presentado de forma preferente, en la superficie de las células cancerosas o monocitos activados o macrófagos activados. Una proteína presentada en la superficie expresada de forma única, sobreexpresada o expresada de forma preferente, por células cancerosas o monocitos activados o macrófagos activados es un receptor que no está presente o está presente en concentraciones insignificantes en células normales o en monocitos en reposo o macrófagos en reposo proporcionando un medio para la detección preferencial de células cancerosas o monocitos activados o macrófagos activados. Por consiguiente, cualquier receptor que esté regulado positivamente en células cancerosas o monocitos activados o macrófagos activados en comparación con monocitos en reposo o macrófagos en reposo, o que no se expresa/presenta en la superficie de células normales o monocitos en reposo o macrófagos en reposo, o cualquier receptor que no se exprese/presente en la superficie de las células cancerosas o monocitos en reposo o macrófagos en reposo en cantidades significativas podría utilizarse para la dirección a dianas. En un ejemplo ilustrativo, el sitio que se une a los conjugados utilizados de acuerdo con la presente invención es un receptor de vitamina, por ejemplo, el receptor de folato, que se une al folato o un análogo o derivado del mismo.

De acuerdo con la presente invención, los conjugados pueden unirse con alta afinidad a receptores en células cancerosas o monocitos activados o macrófagos activados. La unión de alta afinidad puede ser inherente al ligando o la afinidad de unión puede mejorarse mediante la utilización de un ligando modificado químicamente (es decir, un análogo o un derivado) o mediante el enlace químico particular, en el conjugado, entre el ligando y el radióforo.

El enlace químico en el conjugado entre el ligando y el radióforo puede ser un enlace directo o puede ser a través de un enlazador intermedio. Si está presente, un enlazador intermedio puede ser cualquier enlazador biocompatible conocido en la técnica. Típicamente, el enlazador comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 átomos de carbono, más típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono. Típicamente se emplean enlazadores de peso molecular más bajo (es decir, aquellos que tienen un peso molecular de aproximadamente 30 a aproximadamente 500). Se puede utilizar cualquier enlazador o procedimiento de enlace o química dados a conocer en las solicitudes de patente de Estados Unidos con números de serie 10/765336 o 60/590580. También se puede utilizar cualquier enlazador o procedimiento de enlace o química conocidos en la técnica.

En general, cualquier manera de formar un conjugado entre el ligando y el radióforo, entre un enlazador y el ligando, o entre un enlazador y el radióforo puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. Con o sin un enlazador, el conjugado puede formarse por conjugación de los componentes del conjugado, por ejemplo, a través de enlaces de hidrógeno, iónicos o covalentes. La unión covalente de los componentes del conjugado puede ocurrir, por ejemplo, a través de la formación de enlaces amida, éster, disulfuro o imino entre grupos ácido, aldehído, hidroxilo, amino, sulfhidrilo o hidrazo. Además, de acuerdo con la presente invención, un enlazador puede comprender un medio indirecto para asociar el ligando con el radióforo, tal como mediante la conexión a través de brazos espaciadores o moléculas puente. Los medios directos e indirectos para la asociación no deberían impedir la unión del ligando al receptor en las células cancerosas o los monocitos activados o los macrófagos activados para el funcionamiento del procedimiento de la presente invención.

Como enlace químico ilustrativo, la etilendiamina en el esquema descrito en el ejemplo 1 sirve como espaciador o enlazador entre la fluorobenzamida (es decir, el radióforo en el que la molécula de flúor es ^{18}F) y el ligando de folato. Preferentemente, el enlazador contribuye a la solubilidad en agua del conjugado o, como mínimo, no resta materialmente a la solubilidad en agua. Los enlazadores ventajosos para la solubilidad en agua incluyen polímeros solubles en agua, tales como dextrano, éteres de celulosa, enlazadores peptídicos o polietilenglicol. En una realización, dichos polímeros tienen un peso molecular inferior a 1.000.

En realizaciones ilustrativas, además de los radióforos que comprenden grupos benzamidilo, bencilico o fenilo, se contemplan otros grupos aromáticos, tales como, por ejemplo, grupos naftilo y benzoxazolilo, y similares, que están dentro del alcance de la invención.

Mediante la selección adecuada, los enlazadores pueden limitar la tasa de excreción del conjugado del paciente al permitir que el ligando se asocie con el sitio de interés, tal como las células cancerosas o los monocitos activados o los macrófagos activados antes de ser excretados en la bilis del hígado, o en la orina. Un enlazador puede facilitar o retrasar el consumo metabólico del conjugado, tal como, retrasando la captación del sistema reticuloendotelial, particularmente por el hígado. Un enlazador también puede ayudar a evitar la asociación del conjugado con órganos, células, fluidos o proteínas que no son diana. Si, por ejemplo, el conjugado se asociara con una proteína sérica, la

exploración PET proporcionaría una exploración de los vasos sanguíneos del paciente en general, en contraste con la ubicación específica de las células cancerosas o los monocitos activados o los macrófagos activados buscados. Además, el enlazador puede facilitar o acelerar una ruta preferente de excreción del conjugado, tal como a través de la orina, por ejemplo, alentando al paciente a beber líquidos significativos después de la administración del conjugado.

En el ejemplo en el que el ligando es ácido fólico, un análogo/derivado del ácido fólico, o cualquier otra molécula de unión al receptor de folato, el folato, o su análogo/derivado, se puede conjugar con el enlazador mediante un procedimiento reconocido en la técnica que utiliza anhídrido trifluoroacético para preparar γ -ésteres de ácido fólico a través de un intermedio de pteroil azida. Este procedimiento da como resultado la síntesis de folato, conjugado con el enlazador solo a través del grupo γ -carboxi de los grupos de ácido glutámico del folato. Alternativamente, los análogos de ácido fólico se pueden acoplar mediante procedimientos reconocidos en la técnica a través de la fracción α -carboxi del grupo de ácido glutámico o de las entidades de ácido carboxílico α y γ .

La cantidad de conjugado eficaz para su utilización de acuerdo con el procedimiento de la presente invención depende de muchos parámetros, que incluyen el peso molecular del conjugado, su vía de administración y su distribución tisular. Según la invención, una "cantidad eficaz" del conjugado es una cantidad suficiente para unirse a células cancerosas o monocitos activados o macrófagos activados y para ser útil en el diagnóstico/monitorización de cáncer o estados de dolencia que involucran monocitos activados o macrófagos activados. La cantidad eficaz del conjugado que se administrará a un paciente al que se está evaluando cáncer o estados de dolencia que involucran monocitos activados o macrófagos activados puede variar de aproximadamente 1 pg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, 1 ng/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o de aproximadamente 10 μ g/kg a aproximadamente 1 mg/kg, o de aproximadamente 100 μ g/kg a aproximadamente 500 μ g/kg.

El conjugado se puede administrar en una o más dosis (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 dosis) antes de la detección con el dispositivo de detección por imagen de PET extracorpóreo. El número de dosis depende del peso molecular del conjugado, su vía de administración y su distribución tisular, entre otros factores. Cuando se utiliza para el diagnóstico/monitorización de cáncer o estados de dolencia que involucran monocitos activados o macrófagos activados, el procedimiento de detección extracorpóreo se realiza típicamente aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 6 horas después de la administración del conjugado, pero el procedimiento de detección extracorpóreo se puede realizar en cualquier momento posterior a la administración del conjugado, siempre que la unión del conjugado a las células cancerosas o monocitos activados o macrófagos activados sea detectable y se permita un tiempo suficiente para la eliminación de una fracción sustancial del conjugado no unido del cuerpo.

Los conjugados administrados de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se administran al paciente, de forma preferente, por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, los conjugados pueden administrarse al paciente mediante otros procedimientos médicamente útiles, tales como en una formulación disponible por vía oral. De acuerdo con la presente invención, se puede evaluar cualquier paciente sospechoso de tener cáncer o un estado de dolencia que involucre monocitos activados o macrófagos activados, ya sea sintomático o no, que se beneficiaría de una evaluación utilizando el procedimiento de la presente invención.

Los conjugados utilizados de acuerdo con la presente invención de la fórmula L-X se utilizan en un aspecto de la presente invención para formular composiciones de diagnóstico que comprenden cantidades eficaces del conjugado y un vehículo aceptable para el mismo. Entre los ejemplos de formas de dosificación parenteral se incluyen soluciones acuosas del conjugado, por ejemplo, una solución en solución salina isotónica, glucosa al 5 % u otros vehículos líquidos farmacéuticamente aceptables bien conocidos, tales como alcoholes, glicoles, ésteres y amidas. También se puede utilizar cualquier forma de dosificación disponible por vía oral conocida en la técnica.

Los conjugados utilizados en los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva se forman para dirigir el conjugado al sitio de un tumor o al sitio de acumulación de monocitos activados o macrófagos activados (por ejemplo, macrófagos activados que se adhieren a la capa luminal endotelial de la placa o macrófagos activados presentes en el núcleo rico en lípidos de la placa) y, por lo tanto, para concentrar el conjugado en los mismos en el paciente.

Varios aspectos de la presente invención son ventajosos en la detección de células cancerosas o monocitos activados o macrófagos activados. En una realización, el radióforo comprende un isótopo elemental que es un emisor de positrones. Los emisores de positrones emiten en tres dimensiones desde el átomo fuente, pero la emisión transcurre en dos partes en direcciones exactamente opuestas. Como la antipartícula del electrón, cuando el positrón de un isótopo en descomposición entra en contacto con los electrones de la materia cercana, aniquila la energía que se emite de la aniquilación como rayos gamma. Para conservar el impulso, los fotones de rayos gamma viajan en direcciones opuestas. Debido a que el positrón tiene dos rayos de radiación disponibles para la detección, la ubicación en el paciente en el que se ha acumulado el conjugado se detecta más fácilmente y, por lo tanto, con mayor precisión, dentro de un marco de tiempo razonable para el diagnóstico del paciente. La relación señal

respecto a ruido de la aniquilación de positrones se mejora notablemente con respecto a los rayos gamma unidireccionales. Además, proyectando hacia atrás los rayos coincidentes, se ubica la ubicación de la fuente de emisión.

5 La PET se utiliza actualmente en los centros médicos como una herramienta de diagnóstico para la detección del cáncer. En el diagnóstico del cáncer, a un paciente se le puede administrar glucosa marcada con un emisor de positrones (por ejemplo, fluorodesoxiglucosa marcada con ^{18}F). La glucosa se concentra en células cancerosas de rápido crecimiento. La presencia de un cáncer puede detectarse por la concentración del agente para el análisis por imagen mediante PET. Además, la ubicación del cáncer en el cuerpo se determina al proyectar hacia atrás la radiación gamma coincidente por medio del escáner de PET. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención se puede utilizar en combinación con fluorodesoxiglucosa marcada con ^{18}F para detectar células cancerosas. El procedimiento de la invención también se puede utilizar en combinación con cualquier otro procedimiento de diagnóstico de cáncer ya desarrollado y conocido en la técnica, que incluye procedimientos que utilizan otros agentes de diagnóstico ya desarrollados y que utilizan tomografía computarizada (TC) de rayos X, análisis por imagen mediante resonancia magnética (IRM), detección por imagen de resonancia magnética funcional (IRMf), ecografía y tomografía computarizada de emisión de fotón único (TCEFU).

En otras realizaciones, el procedimiento de la presente invención se puede utilizar solo o en combinación con cualquier otro procedimiento o procedimientos conocidos en la técnica para la detección/análisis/ablación de placas ateroscleróticas. Por ejemplo, la invención se puede utilizar en combinación con procedimientos para extirpar las placas ateroscleróticas en los casos en que las placas activas causen el estrechamiento de los vasos sanguíneos. En dichos casos, los conjugados de la presente invención pueden utilizarse no solo para identificar placas ateroscleróticas activas en comparación con las placas inactivas, sino también para distinguir entre tejido aterosclerótico y tejido normal para ayudar en los procedimientos de ablación. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para analizar el estado fisiológico y morfológico de las placas ateroscleróticas. Por ejemplo, la angioplastia implica el ensanchamiento no quirúrgico de un vaso estrechado por deposición de placas, y la energía del láser, por ejemplo, dirigida a través de fibras ópticas en un dispositivo basado en catéter, puede utilizarse para extirpar o eliminar parcialmente los depósitos de placa. Los dispositivos basados en catéteres para la ablación de placas que utilizan energía láser se describen en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.817.601, 4.850.351 y 4.950.266.

La invención utiliza un isótopo de flúor emisor de positrones útil, ^{18}F . Los factores que merecen consideración en la selección de un isótopo adecuado incluyen suficiente semivida del isótopo emisor de positrones para permitir la preparación de una composición de diagnóstico en un vehículo farmacéuticamente aceptable previo a la administración al paciente, y suficiente semivida remanente para dar como resultado suficiente actividad para permitir la medición extracorpórea, por ejemplo, mediante un barrido por PET. Además, un isótopo adecuado debería tener una semivida suficientemente corta para limitar la exposición del paciente a radiación innecesaria. ^{18}F , que tiene una semivida de 110 minutos, proporciona un tiempo adecuado para la preparación de la composición de diagnóstico, así como una tasa de deterioro aceptable.

En un ejemplo ilustrativo, el isótopo debería tener suficiente actividad química para permitir que el isótopo se una a un compuesto químico y, a su vez, al ligando, se utilice o no un enlazador.

EJEMPLO 1

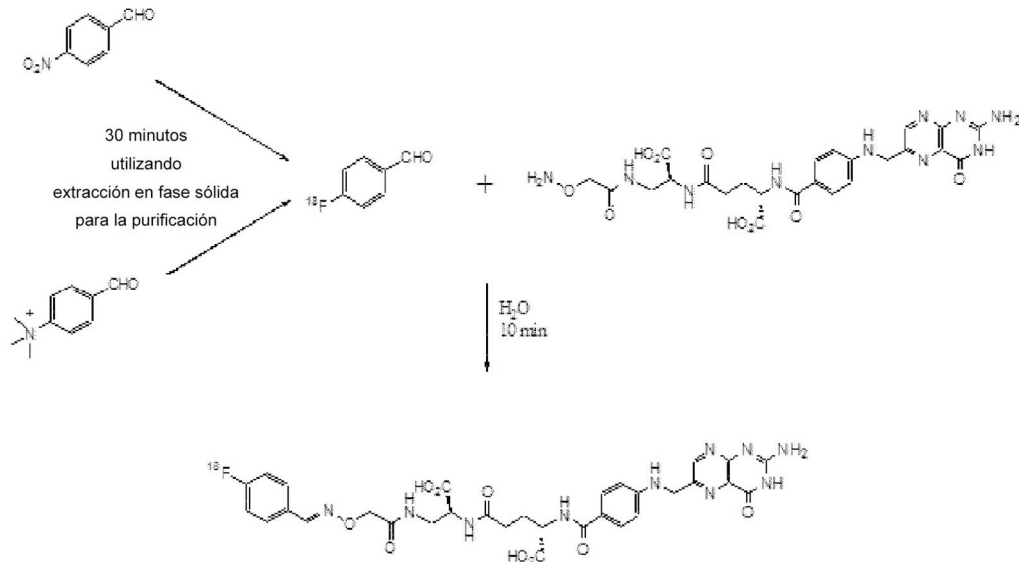
45 SÍNTESIS DE UN CONJUGADO DE FOLATO

Utilizando un isótopo adecuado, se requiere un conjugado biocompatible L-X a partir del cual preparar la composición diagnóstica. Por ejemplo, en el caso de ^{18}F , se puede preparar un conjugado L-X adecuado de acuerdo con el siguiente protocolo sintético. El conjugado sintetizado de acuerdo con este ejemplo tiene un enlazador de etilendiamina.

EJEMPLO 2

SÍNTESIS DE CONJUGADO DE FOLATO

- 5 Partiendo de procedimientos conocidos para preparar el p-fluorobenzaldehído, se puede preparar rápidamente un conjugado adecuado, tal como se describe a continuación. Los procedimientos de concentración y purificación pueden seguirse, tal como anteriormente o, de otro modo, de acuerdo con las técnicas conocidas en la técnica.



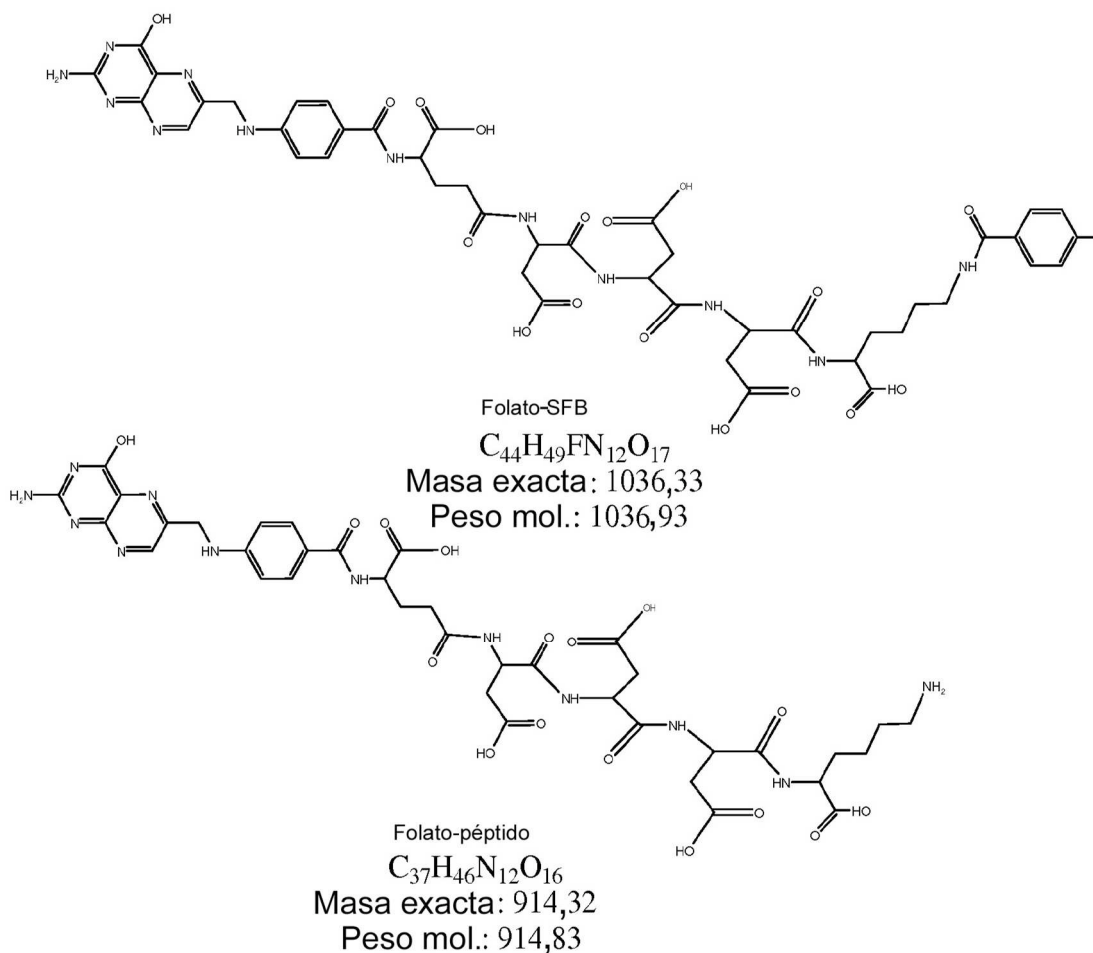
10

La síntesis se puede completar con la presteza suficiente como para tener una semivida restante significativa del emisor de positrones ¹⁸F para permitir una prueba de diagnóstico.

15

EJEMPLO 3

SÍNTESIS DE FOLATO-SFB



Síntesis de folato-péptido (resina-Lys-Asp-Asp-Glu-ácido pterico)

5

Se unió una resina Wang a lisina con grupos protectores MTT (4-metil-tritilo) y F-moc. Los grupos protectores F-moc se eliminaron utilizando piperidina al 20 %/DMF (dimetilformamida) (10 ml/g). A continuación, la resina se burbujeó 10 minutos con argón y se drenó. La eliminación de los grupos protectores F-moc y las etapas de burbujeo se repitieron dos veces más. A continuación, la resina se lavó tres veces con DMF. Una prueba de Kaiser fue positiva para los grupos de aminas libres.

10

A continuación, se añadieron Fmoc-AA (Fmoc-aminoácido), HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), HOBT (1-hidroxibenzotriazol), DIPEA (diisopropiletilamina) en DMF y se burbujearon 30 minutos. A continuación, se realizaron lavados (tres veces) con DMF, y estos tres pasos se repitieron. Una prueba de Kaiser fue negativa y no mostró aminas libres.

15

A continuación, se añadió el siguiente aminoácido y se repitieron las etapas descritas anteriormente y la resina se lavó con DCM (diclorometano) durante 15 minutos y se burbujeó en TFA al 1 % (ácido trifluoroacético)/DCM para eliminar el MTT. A continuación, la resina se lavó de nuevo con diclorometano durante 15 minutos y se burbujeó en TFA al 1 %/DCM. Las etapas se repitieron hasta que todo el color amarillo desapareció. A continuación, la resina se lavó con DCM tres veces y se volvió a hinchar con DMF.

20

Al ácido pterico (CF_3) en DMF, se añadieron HOBT, HBTU y DIPEA. La composición se volvió marrón y se burbujeó durante la noche y, a continuación, se lavó tres veces con DMF. Una prueba de Kaiser fue negativa. Los grupos F-moc se eliminaron con piperidina al 20 %/DMF (10 ml/g) y la resina se burbujeó durante 10 minutos y se drenó. La eliminación de F-moc y las etapas de burbujeo se repitieron dos veces más. A continuación, la resina se lavó tres veces con DMF, tres veces con DCM y tres veces con MeOH. La resina se secó a alto vacío durante 4 horas.

25

El TFA se escindió con una solución que comprendía TFA:TIS (trisopropil silano):H₂O 95:2,5:2,5. Esta solución se añadió a las perlas y se burbujeó durante 2-3 horas y se drenó en un matraz limpio. A continuación, las perlas se lavaron con la misma solución y se escurrieron hasta que las perlas quedaron transparentes. La solución se sometió a rotoevaporación para reducir el nivel de disolvente a 2-3 ml. A continuación, los tubos cónicos de centrifuga se

30

llenaron con 50 ml de éter helado. La mezcla de péptidos se añadió al vial de éter para que el péptido precipitara. La mezcla se centrifugó y se lavó 2-3 veces con éter y se secó al vacío para deshacerse de las trazas de éter. A continuación, el péptido se disolvió en NH₄OH al 1 % para deshacerse del grupo protector de TFA utilizando una barra de agitación para mezclar durante 30-40 minutos. A continuación, el péptido se liofilizó, se purificó por HPLC y se liofilizó.

Síntesis de SFB (succinimidilo-fluorobenzoato) no radiactivo

La síntesis de SFB no radiactivo se realizó mediante un protocolo descrito en Eur. J. Med. Mol. Imaging, vol. 31: 469-474 (2004). A partir del ácido fluorobenzoico, se estableció un baño de aceite a 90 grados centígrados. Se preparó una solución de hidróxido de tetrametilamonio al 45 % (TMAH) en agua. En un vial separado, se añadieron 10,0 mg de ácido 4-fluorobenzoico (solución 1). En un vial separado, se añadieron 40 ul de TMAH al 45 % (solución 2). A continuación, se añadieron 0,2 ml de agua y 1,0 ml de acetonitrilo y la solución 2 se añadió a la solución 1 (solución 3). La solución se evaporó hasta sequedad con un evaporador rotatorio. En otro vial, se añadieron 14 mg de TSTU a 1,2 ml de acetonitrilo (solución 4). La solución 4 se añadió a la solución 3. La mezcla se calentó a 90 grados Celsius en un baño de aceite durante 2 minutos. Se sintetizará ¹⁸F radiactivo en un ciclotrón mediante procedimientos bien conocidos en la técnica y se utilizará para preparar ácido p-(¹⁸F)fluorobenzoico, tal como se muestra en el ejemplo 1 que, a continuación, se convertirá en ¹⁸F-SFB, tal como se ha descrito anteriormente.

Síntesis de folato-SFB

El folato-péptido en PBS se combinó con SFB (en acetonitrilo) y se ajustó el pH de folato-péptido (en PBS) y el conjugado se examinó por HPLC.

EJEMPLO 4

HPLC DE FOLATO-SFB BRUTO

El folato-SFB bruto se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando condiciones similares a las descritas en Clinical Science, vol. 103: págs. 4S-8S (2002), pero con las siguientes modificaciones. La HPLC de fase inversa se realizó utilizando una columna C18 y las condiciones fueron agua con TFA al 0,1 % en ACN a una proporción de 77:23 durante 10 minutos, 60:40 durante 10 min, 50:50 durante 10 minutos, 40:60 durante 10 minutos. y utilizando un caudal de 1,0 ml/minuto. Los resultados se muestran en la figura 1.

EJEMPLO 5

ESPECTRO DE MASAS DE FOLATO-SFB BRUTO Y PURIFICADO

El folato-SFB bruto y purificado se analizaron mediante espectrometría de masas ESI utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3.

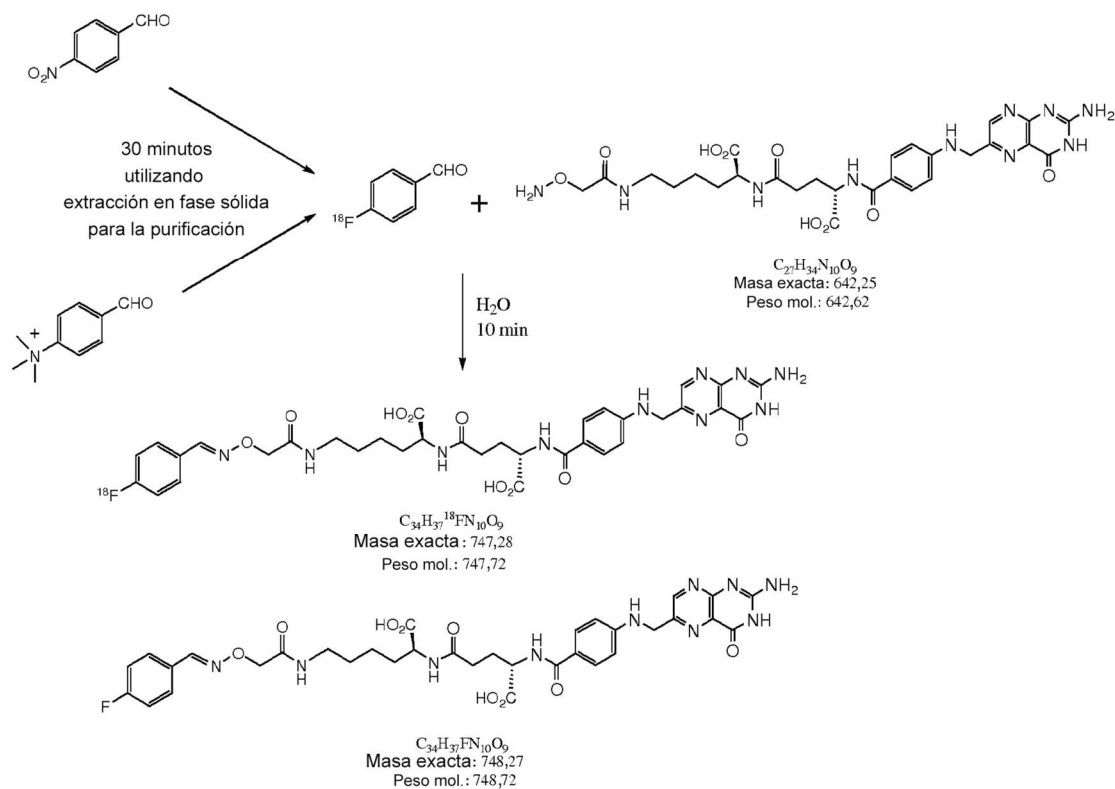
EJEMPLO 6

ENSAYO DE UNIÓN COMPETITIVA

Para determinar si el folato-SFB se une al receptor de folato, se realizó un ensayo de unión competitiva. Las células KB se colocaron en placas de 6 pocillos utilizando volúmenes iguales de células en medio de cultivo de tejidos. Tal como se muestra en la figura 4, las células se incubaron solas (primera barra), con ³H-folato 100 nM (segunda barra), con ³H-folato 100 nM en presencia de folato-SFB 100 nM (tercera barra), o con ³H-folato 100 nM en presencia de folato-SFB 10 μM (cuarta barra). Los resultados muestran que el folato-SFB compite con el ³H-folato para unirse al receptor de folato, lo que indica que el folato-SFB se une específicamente al receptor de folato.

EJEMPLO 7

SÍNTESIS DE FOLATO-FBA



EJEMPLO 8

5

HPLC DE FOLATO-FBA

El folato-FBA se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando condiciones similares a las descritas en Clinical Science, vol. 103: págs. 4S-8S (2002), pero con las siguientes modificaciones. La HPLC de fase inversa se realizó utilizando una columna C18 y las condiciones fueron agua con TFA al 0,1 % en ACN a una proporción de 77:23 durante 10 min, 60:40 durante 10 min, 50:50 durante 10 min, 40:60 durante 10 minutos y utilizando un caudal de 1,0 ml/minuto. Los resultados se muestran en la figura 5 e indican la separación del folato-péptido, folato-FBA y FBA solo en la columna.

EJEMPLO 9

ESPECTRO DE MASAS DE FOLATO-FBA PURIFICADO

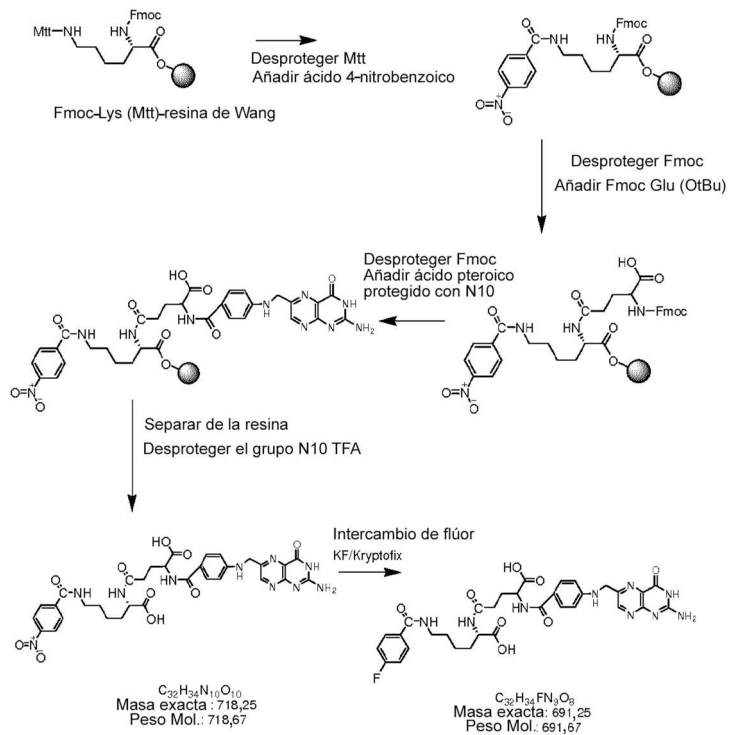
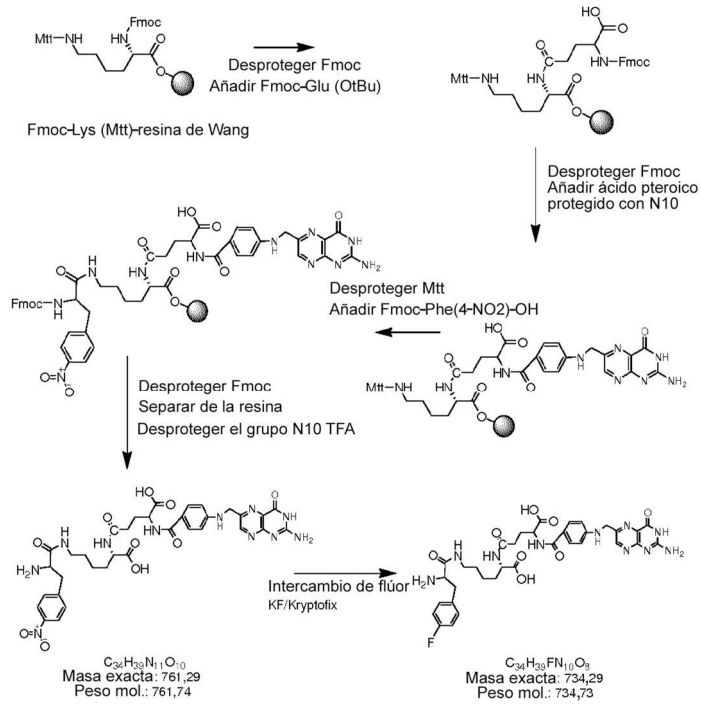
El folato-FBA y un aducto de sodio de folato-FBA se analizaron por espectrometría de masas ESI utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los resultados se muestran en la figura 6.

EJEMPLO 10

SÍNTESIS DE CONJUGADO DE FOLATO

25

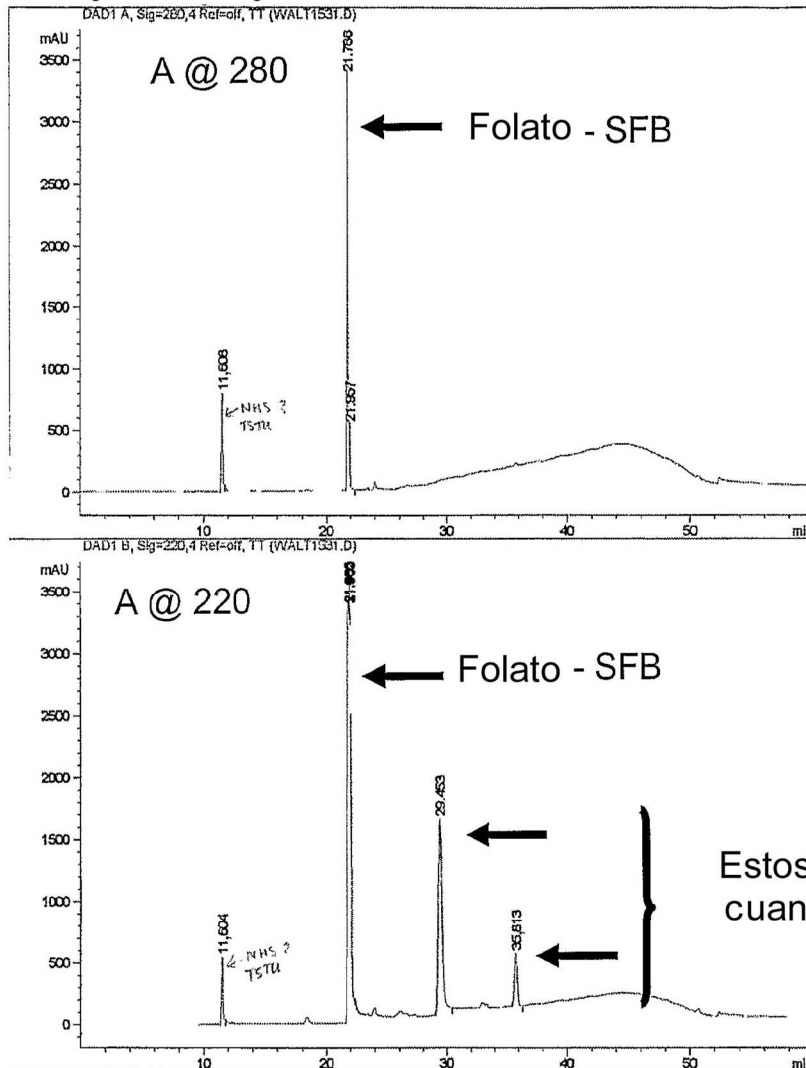
ES 2 731 448 T3



REIVINDICACIONES

1. Conjugado para la utilización en el diagnóstico/monitorización de un estado de dolencia mediado por monocitos activados o macrófagos activados que tienen sitios de unión accesibles para una vitamina, teniendo el conjugado la siguiente fórmula general
 5 L-X
 en la que L es ácido fólico y el grupo X comprende un radióforo que comprende un radioisótopo, en el que el radioisótopo es ¹⁸F.
2. Conjugado para la utilización en el diagnóstico/monitorización de un estado de dolencia, según la reivindicación 1,
 10 en el que la dolencia se selecciona del grupo que consiste en cáncer, fibromialgia, artritis reumatoide, osteoartritis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, psoriasis, osteomielitis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, esclerosis sistémica, rechazo de trasplante de órganos, lupus eritematoso, síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, inflamaciones de la piel, inflamaciones crónicas e inflamaciones debidas a lesiones.
3. Conjugado para la utilización en el diagnóstico/monitorización de un estado de dolencia, según la reivindicación 1,
 15 en el que el conjugado incluye un enlazador, en el que el enlazador es un polímero soluble en agua.
4. Conjugado para la utilización en el diagnóstico/monitorización de un estado de dolencia, según la reivindicación 1,
 20 en el que el estado de dolencia es un cáncer, en el que las células cancerosas expresan de forma única, expresan de forma preferente o sobreexpresan receptores de folato.
5. Conjugado para la utilización en el diagnóstico/monitorización de un estado de dolencia, según la reivindicación 1,
 25 en el que el estado de dolencia es una placa aterosclerótica activa asociada a vasos sanguíneos, en el que la placa comprende macrófagos activados que tienen sitios de unión accesibles para folato.
6. Compuesto para el diagnóstico por imagen de fórmula
 L-X
 30 en el que L es ácido fólico, y
 en el que X comprende un radióforo, que comprende un radioisótopo que descompone con una semivida desde 80 minutos hasta 8 horas mediante emisión de positrones, en el que dicho radioisótopo emite un par de fotones de aniquilación que se mueven en direcciones opuestas, y en el que los fotones de aniquilación se producen como resultado de la aniquilación de positrones con un electrón, y en el que el isótopo es ¹⁸F
7. Compuesto, según la reivindicación 6, en el que L está conjugado con el radióforo a través de un enlazador.
8. Compuesto, según la reivindicación 7, en el que el enlazador se selecciona del grupo que consiste en diaminas, dextranos, éteres de celulosa, péptidos y polietilenglicol.
9. Composición que comprende un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
10. Procedimiento para la preparación de un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 45 a. proporcionar el grupo L en una forma reactiva capaz de reaccionar con un radióforo en forma reactiva;
 b. proporcionar el radióforo en forma reactiva capaz de reaccionar con el grupo L en forma reactiva; y
 c. poner en contacto la forma reactiva del grupo L con la forma reactiva del radióforo.
11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que la forma reactiva del grupo L incluye un enlazador.
12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que el enlazador se selecciona del grupo que consiste en diaminas, dextrano, éteres de celulosa, péptidos y polietilenglicol.
13. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que la forma reactiva del radióforo incluye un éster activo.
14. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que la forma reactiva del radióforo incluye un aldehído.
15. Procedimiento para el análisis por imagen mediante tomografía por emisión de electrones de un monocito activado o macrófago activado que tienen sitios de unión accesibles para vitamina, comprendiendo el procedimiento:
 60 a. administrar a un paciente al que se está evaluando el estado de dolencia una cantidad eficaz de un conjugado de fórmula general
 LX
 en el que L es ácido fólico y el grupo X comprende un radióforo que comprende un radioisótopo, en el que el radioisótopo es ¹⁸F.
 b. dejar el tiempo suficiente para que el conjugado se una a los monocitos activados o los macrófagos
 65 activados; y
 c. analizar por imagen al paciente de forma extracorpórea utilizando tomografía por emisión de positrones.

Cromatograma o cromatogramas actuales



HPLC de
F-SFB bruto

FIG. 1

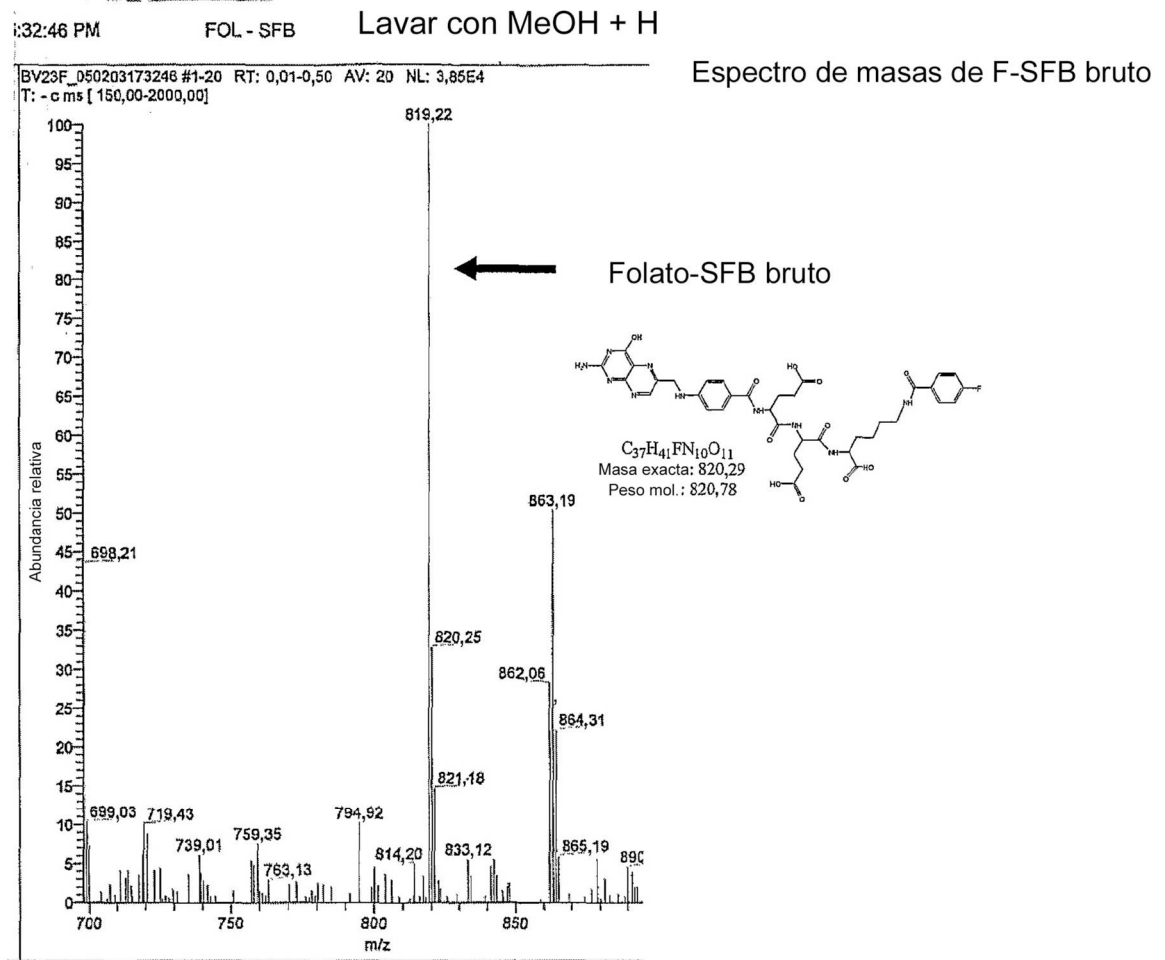


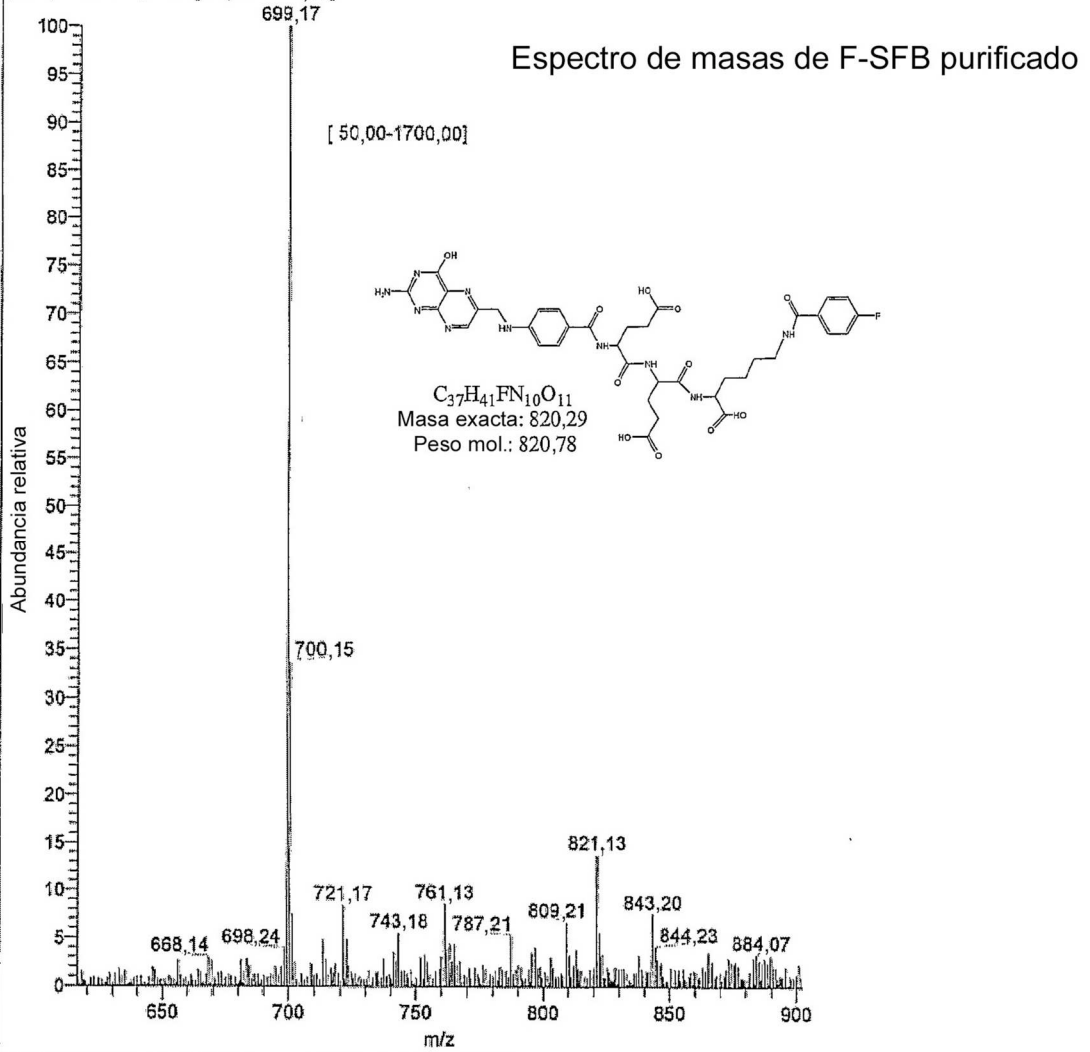
FIG. 2

5 04:01:42 PM

FOL - SFB

FUNCIONAMIENTO 1

BV28_050208160142 #1-15 RT: 0,03-0,39 AV: 15 NL: 1,58E6
 T: + c ms completa [50,00-1700,00]



BV28_050208160142 #1-15 RT: 0,03-0,39 AV: 15 NL: 1,58E6

FIG. 3

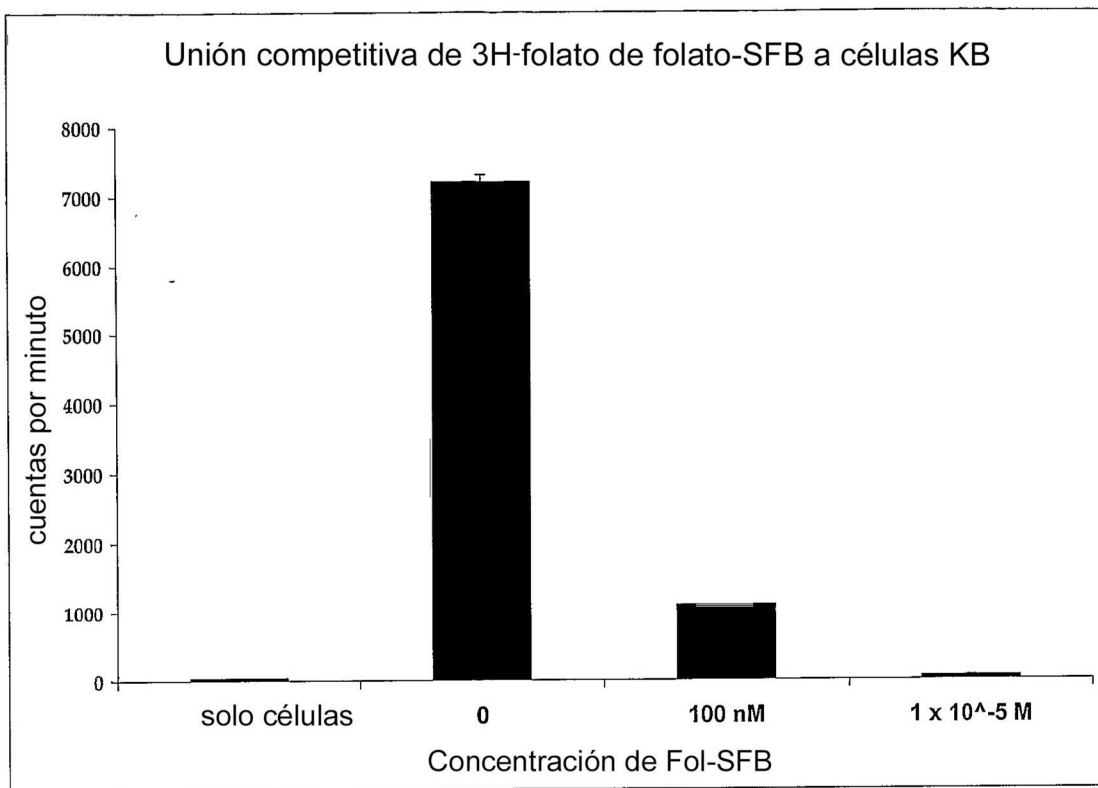


FIG. 4

HPLC de Fol FBA

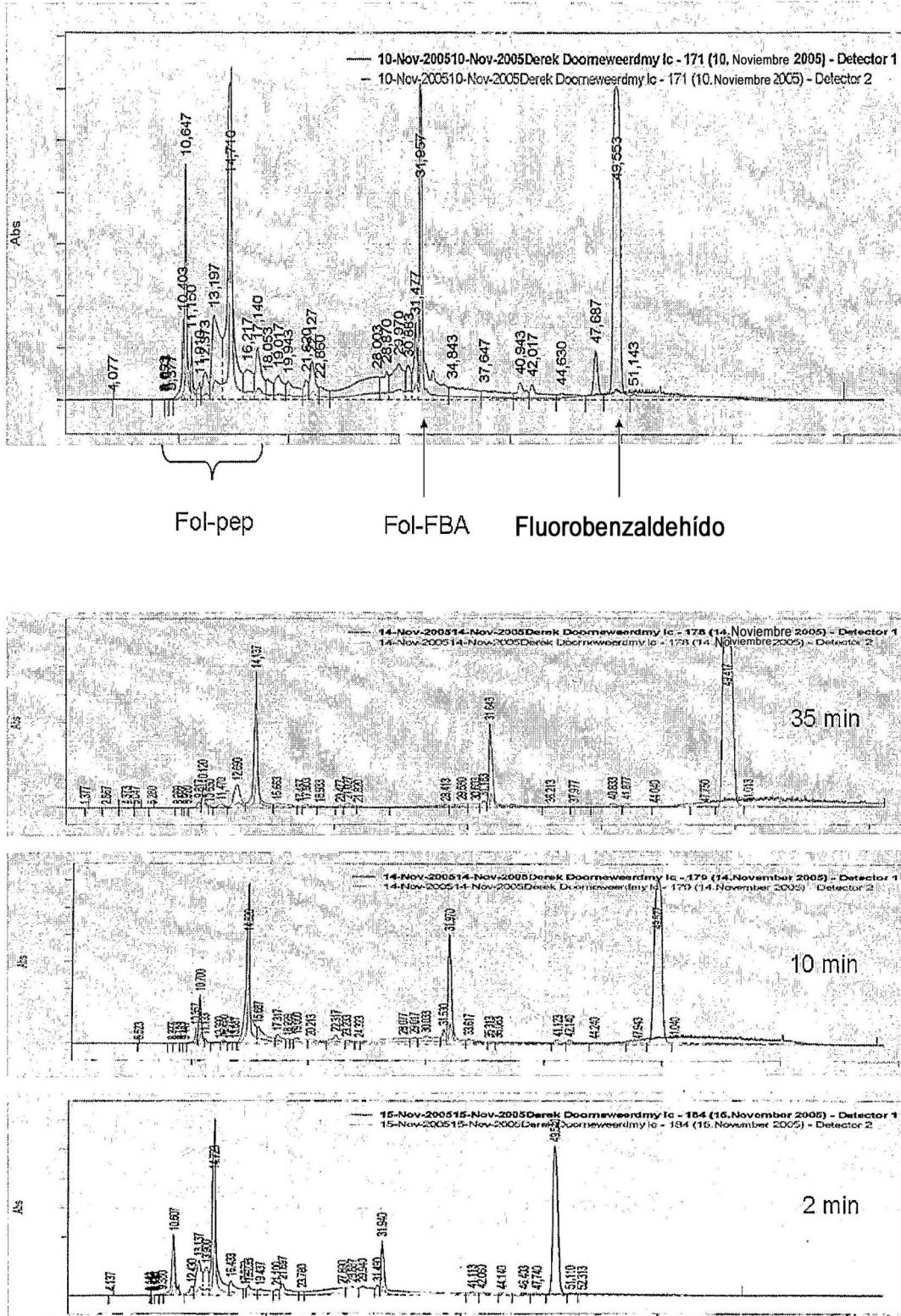


FIG. 5

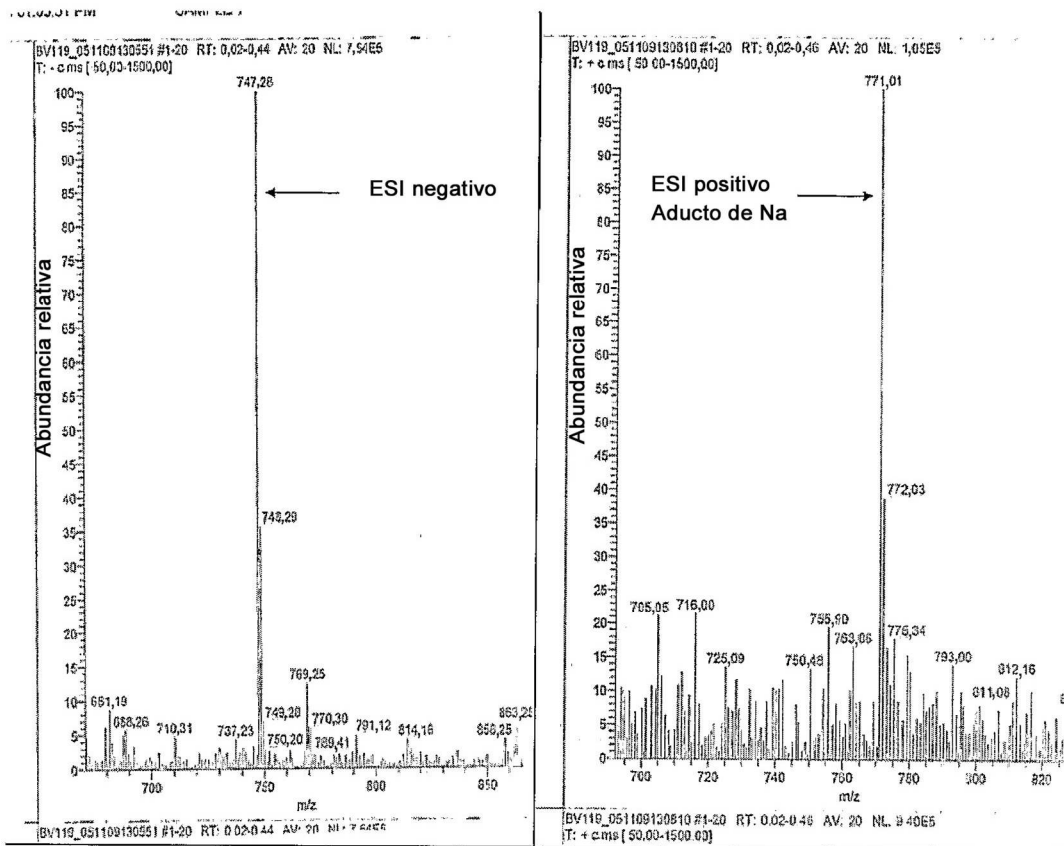


FIG. 6