

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 882 111**

51 Int. Cl.:

**C07B 59/00** (2006.01)

**C07C 59/115** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2017 PCT/EP2017/072582**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2018 WO18046662**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2017 E 17768409 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021 EP 3510007**

54 Título: **Derivado de lactato con marcador [18F] como radiotrazador para PET**

30 Prioridad:

**09.09.2016 EP 16188093**

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

**01.12.2021**

73 Titular/es:

**GRANDIS (100.0%)  
Square Vergote, 19  
1200 Woluwé-Saint-Lambert, BE**

72 Inventor/es:

**SONVEAUX, PIERRE;  
LABAR, DANIEL;  
VAN HÉE, VINCENT;  
DEHON, GWENAËL y  
FRÉDÉRIK, RAPHAËL**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 882 111 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

Derivado de lactato con marcador [<sup>18</sup>F] como radiotrazador para PET

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con un radiotrazador para tomografía por emisión de positrones (PET) para generar imágenes de captación de lactato, en donde el marcador es ácido [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico o una sal del mismo, preferiblemente una sal de [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropionato, también denominado [<sup>18</sup>F]-3-fluorolactato o [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropanoato. La invención también proporciona un proceso para la radiosíntesis de ácido [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico. La invención se relaciona además con el uso de ácido [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico para obtener imágenes de la captación de lactato en células vivas, especialmente en seres humanos.

Antecedentes de la invención

El ácido láctico juega un papel en varios procesos bioquímicos. A pH fisiológico, el ácido láctico (pKa 3.86) se disocia completamente en lactato y protón.

In vivo, el L-(+)-lactato se produce a partir de piruvato por las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), en un proceso de fermentación durante el metabolismo. El lactato se produce en células y su nivel está regulado por diversos factores, incluida disponibilidad de oxígeno y transportadores de monocarboxilato (MCT). Los MCT son transportadores pasivos, entre los cuales MCT1 a MCT4 pueden transportar lactato.

Se implica que el lactato proporciona energía durante el ejercicio. También juega un papel importante en el metabolismo cerebral. Diversos trastornos implican captación de lactato y/o se caracterizan por niveles de lactato desregulados, como por ejemplo cáncer, síndromes de fatiga, intolerancia críptica al ejercicio, hiperinsulinemia inducida por el ejercicio, retraso psicomotor severo ligado al cromosoma X, enfermedades inmunes, deterioro cognitivo relacionado con la edad, amnesia, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, diabetes, hipoglucemia y obesidad (Halestrap, *Mol Aspects Med*, 2013, 34, 337-349; Tsai et al., *Front Aging Neurosci* 2016, 8, 57; Perez-Escuredo et al., *BBA Mol Cell Res*, 2016, 1863, 2481-2497; Brinkmann et al., *J Diabetes Complications*, 2015, 27, 965-969; Carneiro et al., *Obes Rev* 2015, 16 Suppl 1, 55-66).

La plasticidad metabólica es un sello distintivo de las células cancerosas que les permite utilizar de manera óptima los recursos existentes para la producción de energía y biosíntesis. Entre los posibles combustibles, el lactato se destaca por ser el núcleo de una cooperación metabólica entre células cancerosas glucolíticas que producen lactato y células cancerosas oxidativas que usan lactato (Sonveaux et al., *J Clin Invest*, 2008, 118, 3930-3942). Esta cooperación es de naturaleza simbiótica: al administrar lactato a las células cancerosas oxidativas que tienen una preferencia metabólica por el lactato en comparación con la glucosa, las células cancerosas glucolíticas facilitan la difusión de la glucosa y su uso en el compartimento del cáncer hipóxico/glucolítico (Feron et al., *Radiother Oncol*, 2009, 92, 329-333; Kennedy et al., *Future Oncol*, 2010, 6, 127-148; Pérez-Escuredo et al., *BBA Mol Cell Res*, 2016, 1863, 2481-2497). Junto con otros procesos, la cooperatividad metabólica representa una solución evolutiva para la supervivencia y proliferación de las células cancerosas en un entorno alterado metabólicamente (Payen et al., *Cancer J*, 2015, 21, 75-87).

La cooperación metabólica se puede movilizar como un modo de resistencia a las terapias antiangiogénicas (Jimenez-Valerio G et al., *Cell Rep*, 2016, 15: 1134-43; Pisarsky L et al., *Cell Rep*, 2016, 15: 1161-74; Allen E et al., *Cell Rep*, 2016, 15: 1144-60. En general, depende de la expresión y actividad de los miembros de la familia de MCT que se encuentran en la membrana celular (Halestrap, *Mol Aspects Med*, 2013, 34, 337-349; Pisarsky et al., *Cell Reports*, 2016, 15, 1161-1174): MCT4 es el principal facilitador de la exportación de lactato por células cancerosas glucolíticas (Dimmer et al., *Biochem J*, 2000, 350 Pt 1: 219-27; Manning Fox et al., *J Physiol*, 2000, 529 Pt 2: 285-93; Chiche et al., *Int J Cancer*, 2012, 130(7), 1511-1520), y MCT1 transmite principalmente la captación de lactato por células de cáncer oxidativo (Ullah et al., *J Biol Chem*, 2006, 281, 9030-9074; Halestrap, *IUBMB Life*, 2012, 64, 1-9). En comparación con MCT1 y MCT4, MCT2 y MCT3 se expresan con menos frecuencia en cánceres (Perez-Escuredo et al., *BBA Mol Cell Res*, 2016, 1863, 2481-2497).

Dicha cooperación metabólica se encuentra en una variedad de cánceres humanos de diferentes tipos histológicos, incluidos cánceres de cabeza y cuello, mama, pulmón, estómago, colon, vejiga, próstata y cuello uterino, así como gliomas (Baltazar et al., *Histol Histopathol*, 2014, 29, 1511-1524; Pinheiro et al., *J Bioenerg Biomembr*, 2012, 44, 127-139; Miranda-Goncalves et al., *Neuro Oncol*, 2013, 15, 172-188; Afonso et al., *Mol Carcinog*, 2015, 54, 1451-1466).

Esto motivó el desarrollo y evaluación preclínica de varios inhibidores de MCT (Draoui et al., *Bioorg Med Chem*, 2013, 21, 7107-7117; Draoui et al., *Mol Cancer Ther*, 2014, 13, 1410-1418; Bueno et al., *Transplantation*, 2007, 84, 1204-1207; Ovens et al., *Biochem J*, 2010, 425, 523-530; Critchlow et al., *Cancer Res*, 2012, 72, 3224), de los cuales AZD3965 se evalúa actualmente como agente anticanceroso en ensayos clínicos de fase I para pacientes con cáncer de próstata, cáncer gástrico o linfoma difuso de células B grandes (ClinicalTrials.gov NCT01791595). El compuesto relacionado AR-C155858 es un inhibidor selectivo de MCT1 que, sin embargo, también inhibe MCT2,

pero solo cuando se enlaza a la proteína auxiliar basigina, mientras que su proteína acompañante preferida es embigina (Ovens et al., Biochem J, 2010, 425, 523-530).

Aunque se están desarrollando activamente inhibidores de MCT1 y el AZD3965 ha entrado recientemente en ensayos clínicos para el tratamiento contra el cáncer, la medición de captación de lactato y su inhibición en entornos clínicos sigue siendo una necesidad clínica insatisfecha.

En consecuencia, es importante poder obtener imágenes del flujo de lactato in vivo, ya sea para obtener imágenes de la respuesta de los tumores, pero también de patologías distintas del cáncer, así como comprender el papel del lactato y determinar los tejidos que captan lactato.

Se describió un lactato marcado con  $^{13}\text{C}$  para ese propósito (Gallagher et al., Brain, 2009, 132:2839-2849). Se pueden obtener imágenes mediante polarización dinámica (DNP), para uso preclínico. Sin embargo, la vida media muy corta del  $^{13}\text{C}$  y el equipo sofisticado requerido para la obtención de imágenes de  $^{13}\text{C}$  hacen que las aplicaciones para la obtención de imágenes in vivo sean bastante limitadas.

Por tanto, se necesita un trazador capaz de obtener imágenes de la captación de lactato y superar los inconvenientes anteriores.

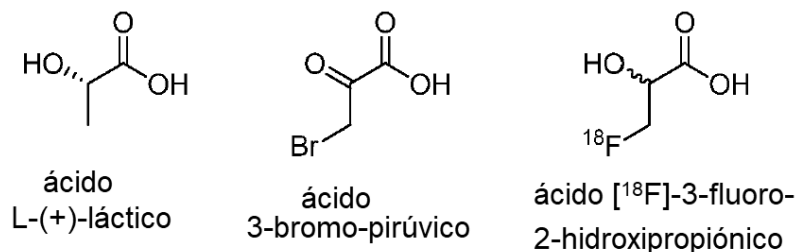
La tomografía por emisión de positrones (PET) se usa en clínicas con diversos trazadores. La  $^{18}\text{F}$ -fluorodesoxiglucosa ( $^{18}\text{F}$ -FDG), también conocida como 2-desoxi-2- $(^{18}\text{F})$ fluoro-D-glucosa, se utiliza, por ejemplo, para medir la captación de glucosa y permite detectar cánceres y sus metástasis en pacientes. La  $^{18}\text{F}$ -FDG se utiliza en la clínica habitual. Los trazadores de PET también se divulgan en el documento WO03/093412, especialmente análogos fluorados del ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (AIB) para marcar con  $^{18}\text{F}$ , que son útiles para detectar tumores cerebrales y corporales.

Por lo tanto, proporcionar un trazador de lactato de PET, marcado con  $^{18}\text{F}$ , es de gran interés ya que el marcaje y la detección de  $^{18}\text{F}$  se realizan comúnmente en clínicas, y los entornos clínicos ya presentes en el hospital pueden adaptarse fácilmente. La vida media radiactiva del  $^{18}\text{F}$  es de 110 minutos.

Un trazador de lactato marcado con  $^{18}\text{F}$  adecuado debe cumplir las siguientes especificaciones:

- el trazador  $^{18}\text{F}$  debe ser químicamente estable, antes de la administración, pero también después de la administración;
- el marcaje del lactato con  $^{18}\text{F}$  no debe afectar la captación;
- el marcaje del lactato con  $^{18}\text{F}$  debe mantener la funcionalidad del lactato, es decir, su transporte por transportadores de lactato y su transformación en piruvato y metabolitos corriente abajo del piruvato en células, para permitir su acumulación dentro de las células;
- el trazador  $^{18}\text{F}$  debe ser selectivo para transportadores de lactato;
- el trazador  $^{18}\text{F}$  no debe inhibir transportadores de lactato;
- el trazador  $^{18}\text{F}$  debe liberar la menor cantidad posible de  $^{18}\text{F}$ .

Con base en las estructuras químicas de sustratos conocidos de MCT, es decir, lactato y bromopiruvato (ver esquema 1), se investigó el ácido  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxi-3-oxopropiónico como un posible trazador de lactato marcado con  $^{18}\text{F}$ . Esta metodología implica el reemplazo bioisostérico de un átomo de H en la posición 3 del lactato con un flúor.



Esquema 1. Estructuras de ácido (+)-láctico, ácido 3-bromopirúvico y ácido  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxi-3-oxopropiónico.

Aunque generalmente se reporta que el reemplazo de un átomo de hidrógeno por un flúor produce compuestos bioisostéricos, su introducción, en el presente caso, en la posición 3 del lactato fue muy desafiante porque:

(i) según el conocimiento del solicitante, incluso si ya se había divulgado 3-fluoro-2-hidroxi-3-oxopropionato (documentos WO2010/088564, FR2290417, Goncalves et al., Tetrahedron Assym., 1996, 7(5), 1237-1240), el compuesto marcado con  $^{18}\text{F}$  nunca se reportó antes, y en la técnica anterior que divulga 3-fluoro-2-hidroxi-3-oxopropionato no radiactivo, no se divulga síntesis química; y

(ii) debido a su alta electronegatividad, el átomo de flúor podría afectar el entorno electrónico de la molécula, afectando así su reconocimiento adecuado por los MCT, especialmente MCT1, y el metabolismo por lactato deshidrogenasas (LDH).

Para la introducción de  $^{18}\text{F}$ , se previó una abertura de epóxido con flúor. Sin embargo, la preparación del compuesto marcado con  $^{18}\text{F}$  a través de esta ruta fue muy desafiante porque la apertura del epóxido con flúor, que se sabe favorece al carbono menos sustituido en presencia de un grupo donador de electrones en la posición  $\alpha$  del epóxido (Schirmacher et al., *Tetrahedron Letters*, 52(16), 1973-1976; Park et al., *Bull Korean Chem Soc*, 2007, 28(10), 1834-1836), nunca se ha investigado previamente en presencia de un grupo atrayente de electrones en esta posición  $\alpha$ , y, en el presente caso, se encuentra un carboxilato en esa posición.

Sorprendentemente, aquí se demuestra por primera vez la síntesis de  $(\pm)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  con un buen rendimiento radioquímico y con una excelente regioselectividad, es decir, a favor de la  $(\pm)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  diana frente al regioisómero  $(\pm)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{-2-fluoro-3-hidroxi}propionato$ .

Con respecto al impacto potencial del átomo de flúor sobre el metabolismo del trazador por lactato deshidrogenasas (LDH) y, por tanto, sobre su acumulación en células, era necesario realizar un ensayo preliminar de conversión por LDH. Sin embargo, en el momento de este estudio, el 3-fluoro-2-hidroxipropionato no radiactivo no estaba disponible comercialmente y el solicitante no pudo sintetizarlo con éxito. Por lo tanto, el solicitante verificó en cambio que el 3-fluoropiruvato disponible podría convertirse en 3-fluoro-2-hidroxipropionato por LDH, que es una enzima bidireccional. Los datos obtenidos (véase la parte experimental II.1) respaldaron la posibilidad de que  $(\pm)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  pudiera ser metabolizado a  $[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoropiruvato}$  por LDH, es decir, a lo largo de la vía oxidativa de lactato en células cancerosas oxidativas.

El solicitante también proporciona aquí la validación preclínica de  $(\pm)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  como un trazador de la captación de lactato para tomografía por emisión de positrones (PET). Se generó  $(\pm)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  en entornos clínicos y se evaluó en el mismo modelo de cáncer que sirvió para el descubrimiento de la simbiosis metabólica de los cánceres. Además, se validó preclínicamente en otro modelo diferente de cáncer.

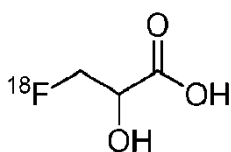
Como se evidencia en la parte experimental (partes II.2, II.3 y II.4), el  $(\pm)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  cumple las especificaciones requeridas de un trazador de PET. Especialmente, el  $(\pm)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  es captado y retenido activamente por células cancerosas oxidativas que consumen lactato in vitro, y se acumula en tumores y tejidos que se sabe que consumen lactato in vivo, lo que se previene eficazmente por una inhibición farmacológica del transportador de lactato interno MCT1. Los inhibidores farmacológicos usados de MCT1 fueron AR-C155858 y AZD3965, ya mencionados anteriormente.

Se puede usar  $[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  como un trazador para PET de captación de lactato. En oncología, el  $[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  podría usarse como una herramienta para predecir y documentar una respuesta a agentes y tratamientos farmacológicos destinados a interrumpir el uso y consumo de lactato por parte de tumores, permitiendo así adaptar el tratamiento a una escala individual. Para predecir una respuesta a agentes farmacológicos y tratamientos dirigidos a interrumpir el uso y consumo de lactato por parte de tumores, se puede administrar  $[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  a pacientes con tumores, y si se acumula en el tumor, proporcionando así una señal positiva en barridos PET, el trazador indicaría que el tumor capta lactato y que el paciente se beneficiaría de recibir agentes farmacológicos y tratamientos destinados a interrumpir el uso y consumo de lactato por parte de tumores. Para documentar una respuesta biológica a agentes farmacológicos y tratamientos destinados a interrumpir el uso y consumo de lactato por parte de tumores, se puede administrar  $[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  antes y después de dicho tratamiento, y se observaría una disminución en la captación del trazador por una señal de PET reducida, indicaría que el tumor del paciente está respondiendo a agentes farmacológicos y tratamientos destinados a interrumpir el uso y consumo de lactato por parte de tumores.

En otras patologías, el  $[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propionato$  podría usarse como una herramienta de diagnóstico para evidenciar un metabolismo del lactato alterado. Estas patologías incluyen, por ejemplo, síndromes de fatiga, intolerancia críptica al ejercicio, hiperinsulinemia inducida por el ejercicio, severo retraso psicomotor ligado al cromosoma X, enfermedades inmunes, deterioro cognitivo relacionado con la edad, amnesia, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, diabetes, hipoglucemia y obesidad (Halestrap, *Mol Aspects Med*, 2013, 34, 337-349; Tsai et al., *Front Aging Neurosci* 2016, 8, 57; Perez-Escuredo et al., *BBA Mol Cell Res*, 2016, 1863, 2481-2497; Brinkmann et al. *J Diabetes Complications*, 2015, 27, 965-969; Carneiro et al., *Obes Rev* 2015, 16 Suppl 1, 55-66).

## Resumen

Por tanto, esta invención se relaciona con un compuesto que es ácido  $[^{18}\text{F}]\text{-3-fluoro-2-hidroxi}propiónico$ :



o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

De acuerdo con una realización, la sal es sal sódica de [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropionato.

La invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención también se relaciona con un medicamento que comprende el compuesto de la invención.

La invención se relaciona además con el uso del compuesto de la invención, para la formación de imágenes por tomografía por emisión de positrones. También se refiere al uso del compuesto de la invención para la formación de imágenes por tomografía por emisión de positrones de captación de lactato por células.

La invención también se relaciona con un compuesto de la invención para uso en la determinación de células o poblaciones de células de un individuo que capta lactato y/o que tiene alteraciones en la captación de lactato.

La invención también se relaciona con un compuesto de la invención para uso en la predicción y/o seguimiento si un tumor de un individuo muestra una respuesta terapéutica a tratamientos que modulan la captación de lactato y/o el metabolismo del lactato. De acuerdo con una realización, el tratamiento que modula la captación de lactato se selecciona de fármacos que inhiben MCT, preferiblemente fármacos que inhiben MCT1. De acuerdo con una realización, el tratamiento que modula el metabolismo del lactato se selecciona de fármacos que inhiben LDH, preferiblemente fármacos que inhiben LDHB, MPC o ALT.

La invención también se relaciona con un método para la detección in vitro de captación de lactato en un tejido, comprendiendo dicho método

- (1) poner en contacto dicho tejido con una cantidad del compuesto de la invención, suficiente para ser detectado por PET;
- (2) formar al menos una imagen PET; y
- (3) determinar la captación de lactato observando la imagen.

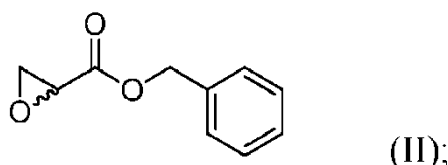
La invención también se relaciona con un compuesto de la invención para uso en un método de formación de imágenes de enfermedades, comprendiendo dicho método

- (1) administrar a un individuo una cantidad del compuesto de la invención suficiente para ser detectado por PET; y
  - (2) formar al menos una imagen PET que muestre la distribución del compuesto de la invención, dentro del individuo.
- La invención también se relaciona con un compuesto de la invención para uso en un método de monitorización de la terapia de una enfermedad en un individuo, comprendiendo dicho método

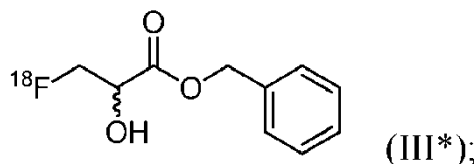
- (1) administrar a dicho individuo una cantidad del compuesto de la invención, suficiente para lograr la formación de imágenes; y
- (2) realizar imágenes usando PET detectando una señal del compuesto de la invención, dentro del individuo, para seguir la respuesta del individuo a la terapia.

La invención se relaciona además con un proceso de fabricación de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropiónico o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende las siguientes etapas:

- a) una reacción de apertura de anillo epóxido en oxirano-2-carboxilato de bencilo (II)



en presencia de [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro, para producir 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de [ $^{18}\text{F}$ ]-bencilo (III\*)



e

- b) hidrólisis de 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de [ $^{18}\text{F}$ ]-bencilo (III\*) para producir ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropiónico o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

De acuerdo con una realización, el proceso comprende por consiguiente una etapa preliminar de síntesis de oxirano-2-carboxilato de bencilo (II) por epoxidación de acrilato de bencilo (I).

## Definiciones

En la presente invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"Aproximadamente", que precede a una cifra, significa más o menos el 10 % del valor de dicha cifra.

5 Un "individuo" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que recibe el compuesto de la invención.

Por "formación de imágenes de la captación de lactato" se hace referencia a la cuantificación relativa o absoluta de la captación de lactato por células.

Por "alteraciones en la captación de lactato" se hace referencia a cualquier cambio en la captación de lactato por células.

10 Por "respuesta terapéutica a tratamientos que modulan la captación de lactato" se hace referencia a cualquier cambio en la captación de lactato por células inducida por un tratamiento.

Por "respuesta terapéutica a tratamientos que modulan el metabolismo del lactato" se hace referencia a cualquier cambio en el metabolismo del lactato inducido por un tratamiento.

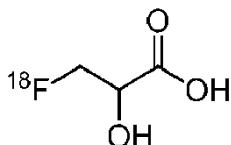
15 "Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que no produce una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administra a un animal, preferiblemente un ser humano. Incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. Para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por las oficinas reguladoras, como, por ejemplo, la Oficina de la FDA o EMA.

20 "Solvato" se usa aquí para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol o agua. Cuando el disolvente es agua, el solvato también se denomina "hidrato".

## Descripción detallada

[<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropionato

25 Esta invención se relaciona con un compuesto que es ácido [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico:



o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

El [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropionato también se denomina [<sup>18</sup>F]-3-fluorolactato o [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropanoato.

30 El [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropionato es quiral y existe bajo dos formas ópticas isoméricas. De acuerdo con una realización, la invención se relaciona con (+)-[<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropionato. En otra realización, la invención se relaciona con (-)-[<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropionato. En una realización adicional, la invención se relaciona con el racemato, (±)-[<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropionato. En la presente invención, el uso del término "[<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxipropionato" abarca la referencia a cada uno de los enantiómeros así como a sus mezclas en cualquier proporción.

35 El compuesto de la invención puede estar en forma de una sal, preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales básicas de las mismas. Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen amonio, aluminio, arginina, benzatina, calcio, cloroprocaína, colina, dietilamina, dietanolamina, 2-(dietilamino)etanol, diolamina, etanolamina, etilendiamina, glicina, litio, lisina, magnesio, meglumina, N-metil-glutamina, morfina, olamina, ornitina, piperazina, potasio, procaína, sodio, tris(hidroximetil)aminometano, trometamina, 4-(2-hidroxietil)morfina, N-bencilfenetilamina y sales de zinc. También se pueden formar hemisales de bases, por ejemplo, sales de hemisulfato y hemicalcio.

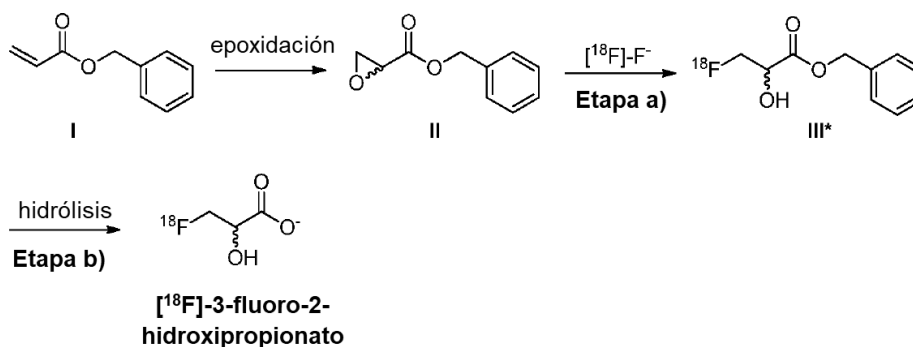
45 Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar (i) haciendo reaccionar el compuesto de la invención con la base deseada; y/o (ii) convirtiendo una sal del compuesto de la invención en otra por reacción con una base apropiada o por medio de una columna de intercambio iónico adecuada. Estas reacciones se llevan a cabo típicamente en solución. La sal se puede precipitar de la solución y recolectarse por filtración o puede recuperarse

por evaporación del solvente. El grado de ionización de la sal puede variar desde completamente ionizado hasta casi no ionizado.

El compuesto de la invención puede estar en forma de solvato, preferiblemente un solvato farmacéuticamente aceptable. Los solvatos farmacéuticamente aceptables se refieren a complejos moleculares que comprenden el compuesto de la invención y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol o agua.

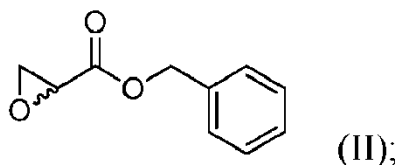
#### Proceso de fabricación

La presente invención también se relaciona con un proceso para fabricar [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato y sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo. La ruta de síntesis de la invención se resume en el siguiente esquema:

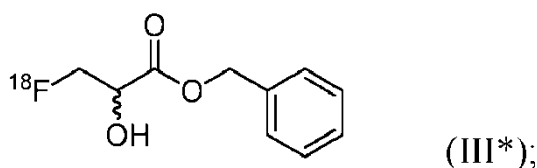


De acuerdo con una realización, el proceso de la invención comprende las siguientes etapas:

a) una reacción de apertura de anillo epóxido en oxirano-2-carboxilato de bencilo (II)



en presencia de [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro, para producir 3-fluoro-2-hidroxipropionato de [ $^{18}\text{F}$ ]-bencilo (III\*)



e

b) hidrólisis de 3-fluoro-2-hidroxipropionato de [ $^{18}\text{F}$ ]-bencilo (III\*) para producir ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el proceso de la invención se realiza en un aparato de síntesis controlado a distancia.

#### Etapa a)

En una realización, el [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro se genera en un ciclotrón, preferiblemente un ciclotrón de isótopos médicos, a partir de la reacción nuclear  $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ . De acuerdo con una realización, el [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro se aísla del agua de irradiación en un cartucho aniónico, como por ejemplo Chromafix 30-PS- $\text{HCO}_3^-$ . A continuación, se recupera el [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro del cartucho mediante intercambio iónico y elución en una solución básica. En una realización, la solución básica se selecciona de una solución de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH), carbonato de tetrabutilamonio ( $\text{TBAHCO}_3$ ), metasulfonato de potasio, una mezcla de  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4/2.2.2$  criptand (en donde 2.2.2 criptand es preferiblemente Kryptofix 2.2.2, que corresponde a 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-(8.8.8)-hexacosano) o una mezcla de los mismos. También se pueden utilizar contraiones alternativos al potasio. En una realización, el disolvente de la solución básica es acetonitrilo, agua, metanol o una mezcla de los mismos. En una realización específica, el [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro se recupera del cartucho mediante elución con una solución acuosa de  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4/\text{kryptofix 2.2.2}$  (con una proporción molar de 1/2) diluida en metanol.

De acuerdo con una realización, el [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro usado en la etapa a) se selecciona de [ $^{18}\text{F}$ ]-KF y [ $^{18}\text{F}$ ]-TBAF (fluoruro de tetrabutilamonio).

De acuerdo con una realización, el [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro usado en la etapa a) es anhidro. Puede obtenerse [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro anhidro mediante destilación azeotrópica de la solución eluida del cartucho, preferiblemente mediante destilación azeotrópica con acetonitrilo a 95 ° C. Preferiblemente, la destilación azeotrópica se realiza bajo atmósfera inerte, como por ejemplo bajo una corriente de helio.

De acuerdo con una realización, el proceso de la invención se realiza a un pH que varía de 6 a 7.4, más preferiblemente a un pH que varía de 6.9 a 7.1. Estos intervalos de pH corresponden a cantidades de base utilizadas para recuperar [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro del cartucho al recipiente de reacción, que son menores en comparación con lo que se emplea habitualmente para la recuperación de [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro, es decir, aproximadamente diez veces menos base se utiliza en el proceso de la invención. Se observó ventajosamente que realizar la reacción en tales condiciones permite mejorar el rendimiento del proceso, especialmente al favorecer la apertura del anillo epóxido y al mejorar la estabilidad del intermedio (III\*) y del producto final [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropionato.

De acuerdo con una realización, la etapa a) se realiza en un disolvente seleccionado entre dimetilsulfóxido (DMSO) y 2-metil-2-butanol. Preferiblemente, el disolvente es anhidro. De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida, la etapa a) se realiza en 2-metil-2-butanol anhidro como disolvente. El uso de 2-metil-2-butanol, que es un disolvente prótico, tiene el efecto de mejorar la regioselectividad de la formación de 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de [ $^{18}\text{F}$ ]-bencilo (III\*) sobre 2-fluoro-3-hidroxiopropionato de [ $^{18}\text{F}$ ]-bencilo (IV\*).

De acuerdo con una realización, la etapa a) se realiza a una temperatura que varía de 90 ° C a 150 ° C, preferiblemente de 100 ° C a 125 ° C, más preferiblemente de 100 ° C a 110 ° C.

De acuerdo con una realización, la etapa a) se realiza durante una duración que varía de 5 minutos a 30 minutos, preferiblemente que varía de 5 minutos a 15 minutos, más preferiblemente durante aproximadamente 10 minutos.

De acuerdo con una realización específica, la etapa a) se realiza en 2-metil-2-butanol anhidro como disolvente, a una temperatura de 105 ° C durante 10 minutos.

De acuerdo con una realización, la mezcla de reacción se pasa a través de un cartucho de alúmina para eliminar el [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro que no ha reaccionado.

En una realización, el 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de [ $^{18}\text{F}$ ]-bencilo (III\*) se aísla mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Etapa b)

De acuerdo con una realización, la hidrólisis de la etapa b) se realiza en condiciones básicas. En una realización, la hidrólisis se realiza usando un método de extracción en fase sólida, preferiblemente usando un cartucho C18 Sep-Pak y una solución de NaOH.

De acuerdo con una realización, la etapa b) se realiza durante una duración que varía de 1 minuto a 20 minutos, preferiblemente que varía de 2 minutos a 10 minutos, más preferiblemente durante aproximadamente 5 minutos.

De acuerdo con una realización alternativa, la hidrólisis de la etapa b) se realiza mediante hidrólisis enzimática.

Etapa preliminar

De acuerdo con una realización, el oxirano-2-carboxilato de bencilo (II) se obtiene por epoxidación de acrilato de bencilo (I). De acuerdo con una realización, la epoxidación se realiza en presencia de un peroxiácido, como por ejemplo ácido 3-cloroperoxibenzoico (m-CPBA).

Composiciones farmacéuticas y de formación de imágenes

La presente invención se relaciona además con una composición farmacéutica que comprende ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropiónico o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se relaciona con una composición de formación de imágenes que comprende ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropiónico o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la invención pueden comprender antioxidantes, reguladores, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica.

El compuesto de la presente invención puede administrarse por vía oral, parenteral (por ejemplo, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, ICV, inyección o infusión intracisternal, inyección subcutánea o implante), por inhalación



por aspersión, nasal, vaginal, rectal, sublingual o vías de administración tópicas y pueden formularse, solas o juntas, en formulaciones de unidades de dosificación adecuadas que contienen excipientes, adyuvantes y portadores convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables y apropiados para cada vía de administración. Preferiblemente, el compuesto de la presente invención se administra por vías de administración oral o parenteral.

5 Las composiciones para la administración del compuesto de esta invención pueden presentarse convenientemente en forma de unidad de dosificación y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia, teniendo en cuenta la corta vida media radiactiva de  $^{18}\text{F}$  que es de 110 minutos. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con el excipiente que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones farmacéuticas y de formación de imágenes se preparan  
10 asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con un excipiente líquido o un excipiente sólido finamente dividido o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto en la formulación deseada. En las composiciones farmacéuticas y de formación de imágenes, el compuesto activo se incluye en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado.

15 Las composiciones que contienen el ingrediente activo pueden estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o emulsiones dispersables. Las composiciones destinadas para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas o de formación de imágenes y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y apetitosas. Las  
20 suspensiones acuosas contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxietanol, o  
25 productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilensorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzato de etilo o n-propilo, uno o  
30 más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina. Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes como los expuestos anteriormente y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral agradable. Estas composiciones pueden conservarse  
35 mediante la adición de un antioxidante como el ácido ascórbico.

Las composiciones farmacéuticas y de formación de imágenes pueden estar en forma de suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados que se han mencionado  
40 anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio.

45 La composición puede comprender adicionalmente un estabilizador. Los estabilizadores químicos son útiles para reducir la probabilidad de descomposición inducida por radiólisis del compuesto marcado con  $^{18}\text{F}$  a altas concentraciones de radiactividad. Los estabilizadores adecuados incluyen antioxidantes tales como azúcar alcohol o azúcar lactona, en donde el azúcar alcohol es por ejemplo eritritol xilitol, sorbitol o manitol y en donde el azúcar lactona es por ejemplo ácido ascórbico o glucono-o-lactona.

50 La captación de lactato por imágenes implicará generalmente una dosis que varía de 1 MBq/kg de peso corporal a 530 MBq de las composiciones de la invención. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular puede variar y dependerá de una variedad de factores que incluyen la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, rata de excreción, combinación de fármacos, gravedad de la afección particular y el huésped que se somete a la terapia.

55 La invención también se relaciona con un kit que comprende un vial sellado que contiene una cantidad predeterminada de ácido  $^{18}\text{F}$ -3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

#### Uso farmacéutico

La presente invención también se relaciona con un medicamento que comprende ácido  $^{18}\text{F}$ -3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, la invención se

relaciona con ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para uso como un medicamento. En una realización, la invención se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento.

- 5 La presente invención también se relaciona con ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para uso como agente de formación de imágenes. En una realización, la invención se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un agente de formación de imágenes.

- 10 En una realización, el agente de formación de imágenes es un agente de formación de imágenes para tomografía por emisión de positrones (PET).

La invención también se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la formación de imágenes por PET.

- 15 La invención también se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la obtención de imágenes por PET de captación de lactato por células, preferiblemente para la formación de imágenes por PET de captación de lactato en células o tejidos vivos, más preferiblemente en células o tejidos vivos en mamíferos.

La invención también se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para determinar qué tejidos o células de un individuo captan lactato.

- 20 La invención también se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para determinar los efectos fisiopatológicos de captación y/o metabolismo del lactato.

La invención también se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para determinar órganos o tejidos de un individuo con alteraciones en captación y/o metabolismo de lactato. Tal determinación puede usarse para investigación clínica o para diagnóstico.

- 25 La invención también se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para determinar qué tumores de un individuo determinado captan lactato.

- 30 La invención también se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para predecir si un tumor de un individuo dado puede mostrar una respuesta terapéutica a tratamientos que modulan captación y/o metabolismo de lactato. Este uso permite predecir una respuesta terapéutica. Para predecir una respuesta a agentes farmacológicos y tratamientos dirigidos a interrumpir el uso y consumo de lactato por parte de tumores, se puede administrar [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato a pacientes con tumores, y si se acumula en el tumor, proporcionando así una señal positiva en PET, el trazador indicaría que el tumor capta lactato y que el paciente se beneficiaría de recibir agentes farmacológicos y tratamientos destinados a interrumpir el uso y consumo de lactato por parte de tumores.

- 35 La invención también se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para determinar si un tumor de un individuo dado muestra una respuesta terapéutica a tratamientos modulando la captación y/o el metabolismo de lactato. Este uso permite una respuesta terapéutica con formación de imágenes y cuantificación. Para documentar una respuesta biológica a agentes farmacológicos y tratamientos destinados a interrumpir el uso y consumo de lactato por parte de tumores, se puede administrar [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato antes y después de dicho tratamiento, y se podría reducir la captación del marcador después del tratamiento visto por una señal PET reducida e indicaría que el tumor del paciente está respondiendo a agentes y tratamientos farmacológicos destinados a interrumpir el uso y consumo de lactato por parte de tumores.

- 45 La invención también se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, como una herramienta de diagnóstico de patologías que implican alteraciones del metabolismo del lactato como por ejemplo síndromes de fatiga, intolerancia críptica al ejercicio, hiperinsulinemia inducida por ejercicio, retraso severo psicomotor ligado al cromosoma X, enfermedades inmunes, deterioro cognitivo relacionado con la edad, amnesia, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, diabetes, hipoglucemia u obesidad.

- 50 La invención también se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para determinar la eficacia in vitro y/o in vivo de tratamientos dirigidos a modular captación y/o metabolismo de lactato por células y tejidos. En una realización, la invención se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para determinar la eficacia in vitro de tratamientos dirigidos a modular la captación de lactato y/o metabolismo de las células cancerosas. En una realización, la invención se relaciona con el uso de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-

hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para determinar la eficacia in vivo de tratamientos dirigidos a modular la absorción de lactato y/o metabolismo por tumores.

En una realización, el tratamiento que modula captación de lactato es un tratamiento que inhibe captación de lactato. En una realización, el tratamiento que inhibe captación de lactato es un fármaco que inhibe MCT, preferiblemente un fármaco que inhibe MCT1. En una realización, el tratamiento que inhibe la captación de lactato es un fármaco que inhibe otros transportadores de lactato como SMCT. En una realización, el tratamiento que inhibe la captación de lactato es un fármaco que inhibe la vía oxidativa del lactato. En otra realización, el tratamiento que inhibe la vía oxidativa del lactato es un inhibidor de LDH. En otra realización más, el tratamiento que inhibe la vía oxidativa del lactato es un inhibidor del portador de piruvato mitocondrial (MPC). En otra realización más, el tratamiento que inhibe la vía oxidativa del lactato es un inhibidor de alanina transaminasa (ALT).

La invención también se relaciona con ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico para uso en un método para detectar la captación de lactato en una célula o una población de células, comprendiendo dicho método

(1) administrar a una célula o población de células una cantidad de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, suficiente para ser detectado por PET; (2) formar al menos una imagen PET que muestra la distribución del ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, dentro de la célula o la población de células; y (3) determinar la captación de lactato observando la imagen.

En una realización, la población de células es un tejido o un órgano, preferiblemente un tejido o un órgano de un mamífero.

En una realización, el ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se usa para obtener imágenes de una amplia variedad de órganos y/o tejidos, incluyendo próstata, sangre, linfa, ovario, cuello uterino, vejiga, mama, hígado, riñón, corazón y cerebro.

En una realización, en el método para detectar la captación de lactato, la célula o población de células está en un mamífero vivo y el método se realiza in vivo. En otra realización, el método para detectar la captación de lactato se realiza in vitro.

En una realización, cuando el método para detectar la captación de lactato se realiza in vivo, la administración se realiza inyectando una composición farmacéutica como se describe anteriormente, en un vaso sanguíneo del mamífero. En otra realización, la administración se realiza por vía oral, usando una composición farmacéutica como se describe anteriormente.

En una realización, el método permite detectar la captación de lactato en células cancerosas. En una realización, el método permite detectar un tumor. En una realización, el método permite predecir si un tumor puede mostrar una respuesta terapéutica a un tratamiento que modula la captación de lactato, especialmente un inhibidor de MCT, preferiblemente un inhibidor de MCT1. En una realización, el método permite determinar si un tumor muestra una respuesta terapéutica a un tratamiento que modula la captación de lactato.

En una realización, en el método para detectar la captación de lactato, la cantidad eficaz de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o su sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable, varía de 1 MBq/kg de peso corporal a 530 MBq.

En una realización, la invención se relaciona con un método para la detección in vitro de captación de lactato en un tejido, comprendiendo dicho método

(1) poner en contacto dicho tejido con una cantidad de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, suficiente para ser detectado por PET; (2) formar al menos una imagen PET; y (3) determinar la captación de lactato observando la imagen.

En una realización, la invención se relaciona con ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico para uso en un método para obtener imágenes de enfermedades, comprendiendo dicho método

(1) administrar a un individuo una cantidad de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, suficiente para ser detectado por PET; y (2) formar al menos una imagen PET que muestra la distribución del ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, dentro del individuo.

En una realización, la invención se relaciona con ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico para uso en un método de diagnóstico por imagen o monitorización de un individuo, comprendiendo dicho método

(1) administrar a dicho individuo una cantidad de ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, suficiente para lograr la formación de imágenes de diagnóstico; y (2) realizar imágenes de diagnóstico usando PET detectando una señal del ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, dentro del individuo.

En una realización, la invención se relaciona con ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropiónico para uso en un método de monitorización de la terapia de una enfermedad en un individuo, comprendiendo dicho método

(1) administrar a dicho individuo una cantidad de ácido  $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxiopropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, suficiente para lograr la formación de imágenes; y

(2) realizar formación de imágenes usando PET detectando una señal del ácido  $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxiopropiónico, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, dentro del individuo, para seguir la respuesta del individuo a la terapia.

En una realización, la terapia de la enfermedad es una terapia contra el cáncer, preferiblemente una terapia que usa un inhibidor de MCT, más preferiblemente un inhibidor de MCT1.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. A, Espectros de coelución de 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -bencilo (III\*) y 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de bencilo (III) no radiactivo, y  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -2-fluoro-3-hidroxibencilacrilato (IV\*) y 2-fluoro-3-hidroxibencilacrilato (IV) no radiactivo en una columna de HPLC Supelco Discovery C18 equipada con detectores de rayos UV (A1) y rayos  $\gamma$  de NaI (A2). B, Espectro de elución de  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxiopropionato (V\*) en una columna de HPLC piramidal Nucleosil C18 equipada con un detector de rayos  $\gamma$  de NaI.

Figura 2. Espectro de elución de 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -bencilo (III\*) y  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -2-fluoro-3-hidroxibencilacrilato (IV\*) en una columna de HPLC Supelco Discovery C18 equipada con un detector de rayos  $\gamma$  de NaI, que muestra la proporción de regioisómeros cuando se utilizó alcohol tert-amílico como disolvente de fluoración (Método II).

Figura 3. La lactato deshidrogenasa (LDH) puede reducir el 3-fluoropiruvato a 3-fluoralacato. A, Esquema de la reacción utilizada para la reducción de 3-fluoropiruvato. B, detección de 3-fluoropiruvato y 3-fluoralacato mediante espectrometría de masas después de la reacción esquematizada en A (n = 3; N = 1).

Figura 4. Trampa de células cancerosas humanas oxidativas  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxiopropionato (V\*). A, Inmunoprecipitación Western representativos que muestran la expresión de MCT1 en células cancerosas humanas SiHa, HeLa y SQD9. B, La rata de consumo de oxígeno (OCR) de las células SiHa, HeLa y SQD9 en un bioanalizador Seahorse. Las células recibieron glucosa (25 mM) + L-lactato (10 mM) o solo L-lactato (10 mM) como combustibles oxidativos en DMEM que contenía 10 % de FBS dializado (n = 8, \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.005). C, las células cancerosas (o pozos vacíos; blancos) se incubaron durante 6 minutos en presencia de  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxiopropionato (V\*) (45  $\mu\text{Ci/ml}$ ), se lavaron y la actividad de  $^{18}\text{F}$  intracelular se midió usando un contador  $\gamma$  Wiper Gold (n = 12-14, N = 2, \*\*\*P < 0.001).

Figura 5. El inhibidor de MCT1 AR-C155858 bloquea la captación in vivo de  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxiopropionato (V\*) por tumores SiHa en ratones. Los ratones portaban 2 tumores SiHa que expresaban un ARNsh de control (shCTR) o un ARNsh contra MCT1 (shMCT1). A, Imágenes representativas de ratones pretratados con vehículo que muestran la distribución fisiológica de  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxiopropionato (V\*) 10, 30 y 60 minutos después de la inyección en la vena de la cola (215  $\mu\text{Ci}$  en 100  $\mu\text{L}$ ). La escala de colores está normalizada para la dosis inyectada y el peso del animal. B, Inmunoprecipitación Western que muestra la expresión de MCT1, MCT4,  $\beta$ -actina y Hsp90 en células SiHa infectadas con shCTR o shMCT1 (Representativo de n = 3). C, Igual que en A, excepto que los ratones fueron pretratados con AR-C155858 (5 mg/kg IV 10 minutos antes de la inyección del trazador). La imagen representativa muestra exactamente el mismo ratón que en A (imagen del trazador de 30 minutos), evaluado el día después. La vejiga está indicada. D, cuantificación de A y C (n = 6-7; N = 2, \*\*\*P < 0.001).

Figura 6.  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxiopropionato permite documentar una respuesta temprana del cáncer de cabeza y cuello SQD9 a los inhibidores de MCT1 AR-C155858 y AZD3965. Los inhibidores de MCT1 AR-C155858 o AZD3965 se inyectaron por vía intravenosa a una dosis de 5 mg/kg. Se inyectó  $(\pm)$ - $[^{18}\text{F}]$ -3-fluoro-2-hidroxiopropionato (250  $\mu\text{Ci}$ ) por vía intravenosa 10 minutos después de la inyección. Las imágenes se adquirieron 30 minutos después de la inyección del trazador. Las flechas indican la localización del tumor SQD9 (n = 6). \*\*\*P < 0.005 en comparación con el vehículo, utilizando la prueba t de Student.

#### Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

##### I. Ejemplos químicos

##### I.1. material y métodos

Productos químicos.  $[^{18}\text{O}]\text{-H}_2\text{O}$  era de Rotem. El acrilato de bencilo era de Alpha Aesar; DMSO y bicarbonato de tetrabutilamonio ( $\text{TBAHCO}_3$ ) de ABX;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  de Riedel-de Haën; Kryptofix 2.2.2. de Merck;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y acetónitrilo HPLC de VWR; y  $\text{CDCl}_3$  y TMS de Euristop. Todos los demás reactivos fueron de Sigma-Aldrich.

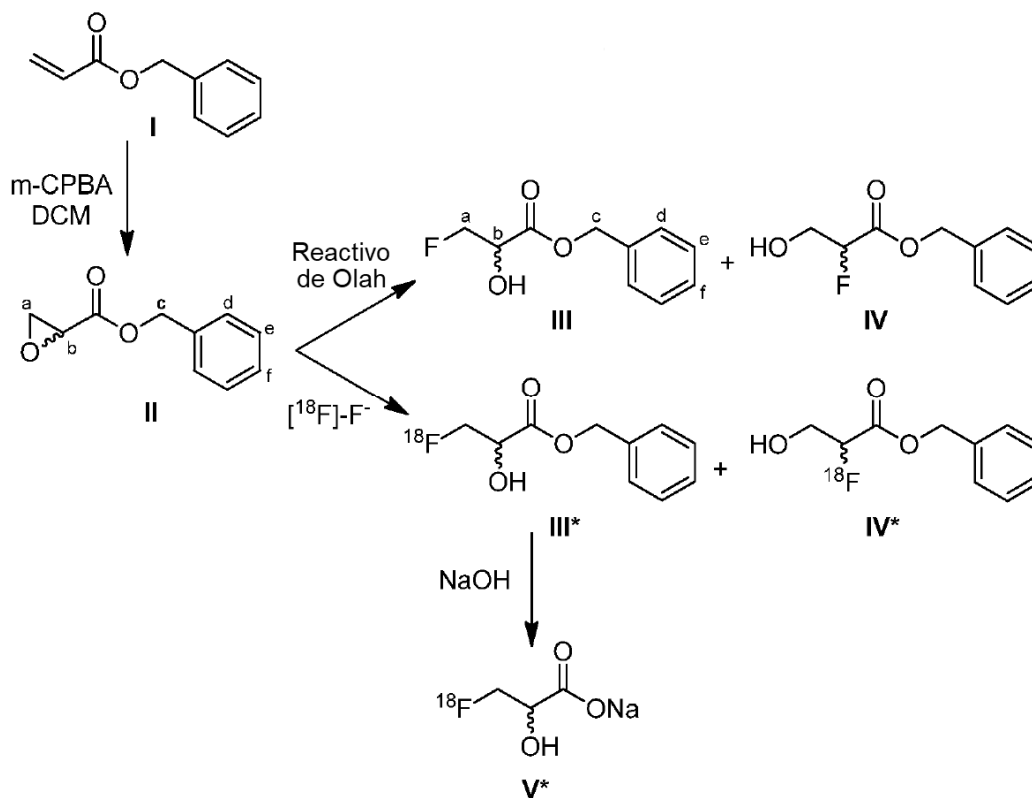
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La HPLC se realizó en equipos Gilson (bombas 305 y 302) equipados con detectores UV/VIS-151 y rayos  $\gamma$  de NaI conectados en serie y monitorizados por un módulo de interfaz GABI Star (Raytest). Las columnas fueron para HPLC semipreparativa: Dionex Supelco Discovery C18, 5

$\mu\text{m}$ , 250x10 mm; para HPLC analítica: MN, 150/4.6 Nucleosil 100-5 C18, 150 mm, ID: 4.6 mm y IonPac AS15, Dionex.

Producción de  $^{18}\text{F}$ -fluoruro. Se produjo  $^{18}\text{F}$ -fluoruro en un ciclotrón de isótopos médicos (IBA Cyclone 18/9) usando una diana líquida  $^{18}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$ . Después de la irradiación, el agua diana se pasó a través de un cartucho de luz Chromafix 30-PS- $\text{HCO}_3$  (Macherey-Nagel) o Accel Plus QMA Sep Pak (Waters) para atrapar el  $^{18}\text{F}$ -fluoruro.

5

### Esquema general de la síntesis:



### 1.2. Síntesis de oxirano-2-carboxilato de bencilo (II)

Se añadió ácido 3-cloroperoxibenzoico (14.04 g) a una solución de acrilato de bencilo (I) (23.04 mmol en 90 ml de diclorometano seco (DCM)). La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo y se agitó durante 7 días. Luego se añadió DCM (100 ml) a la solución y se lavó dos veces con una solución acuosa saturada de carbonato de sodio. La fracción de DCM restante se concentró a 30 ml (vacío en rotavapor) y se añadió acetato de etilo (150 ml). Esta solución se lavó de nuevo dos veces con una solución acuosa saturada de carbonato de sodio y las capas orgánicas recombinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad bajo presión reducida. El crudo se purificó finalmente mediante cromatografía en gel de sílice usando ciclohexano/acetato de etilo (95/5, 100 ml; y 10/90, 800 ml) y los volátiles restantes se eliminaron bajo vacío para producir el compuesto deseado (II). Rendimiento: 53 %,  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  con TMS al 0.03 % v/v, 400 MHz):  $\delta$  7.38 (5.29H, m, Hd, He y Hf), 5.18-5.27 (2.7H, q, He), 3.47-3.49 (1H, dd, Hb), 2.94-3.01 (2.18H, qd, Ha).

10

15

### 1.3. Síntesis de $(\pm)$ - $^{18}\text{F}$ -3-fluoro-2-hidroxipropionato ( $\text{V}^*$ )

Método I. Un cartucho Chromafix 30-PS- $\text{HCO}_3$  cargado con  $^{18}\text{F}$ -fluoruro se eluyó en orden inverso a un recipiente de reacción utilizando una solución de 0.075 M de bicarbonato de tetrabutilamonio ( $\text{TBAHCO}_3$ , 80  $\mu\text{L}$ , 6  $\mu\text{mol}$ ) en acetonitrilo (0.9 ml). Se obtuvo  $^{18}\text{F}$ -fluoruro anhidro mediante destilación azeotrópica con acetonitrilo a 95 ° C bajo una corriente de helio. La recuperación de  $^{18}\text{F}$ -fluoruro fue de más del 80 %. Se añadió oxirano-2-carboxilato de bencilo (II) (10  $\mu\text{l}$ ) disuelto en DMSO anhidro (1 ml) al  $^{18}\text{F}$ -fluoruro y se hizo reaccionar durante 10 minutos a 120 ° C. Después de enfriar, la mezcla de reacción se diluyó con 3.5 ml de agua y se pasó a través de un cartucho de alúmina neutra (Waters) para descartar el  $^{18}\text{F}$ -fluoruro sin reaccionar. Produce 2 regioisómeros: 3-fluoro-2-hidroxipropionato de  $(\pm)$ - $^{18}\text{F}$ -bencilo (III\*) y 2-fluoro-3-hidroxipropionato de  $(\pm)$ - $^{18}\text{F}$ -bencilo (IV\*). Aproximadamente el 90 % de la radiactividad  $^{18}\text{F}$  incorporada en moléculas orgánicas estaba relacionada con ambos regioisómeros (III\*) y (IV\*), con una proporción de aproximadamente 1/1 (Figura 1A2).

20

25

Los compuestos (III\*) y (IV\*) (detector de NaI) coeluidos con 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de bencilo (III) no radiactivo y 2-fluoro-3-hidroxiopropionato de bencilo (IV) (detector UV), respectivamente (Figura 1A2 y 1A1).

El 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-bencilo (III\*) se aisló mediante HPLC semipreparativa ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM/ $\text{CH}_3\text{CN}$  70/30, 3 ml/minuto, tiempo de retención = 21 minutos), se diluyó con agua (1.5 x vol) y se cargó en un cartucho C18 Sep-Pak acondicionado (Waters). El cartucho se enjuagó con 10 ml de agua y luego se cargó con NaOH 0.5 N. Después de 5 minutos, se eluyó ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropionato (III\*) con 1 ml de agua y se ajustó el pH a 7.0 mediante la adición de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . El ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropionato (V\*) se caracterizó por HPLC analítica (IonPac AS 15, Dionex, 14 mM de NaOH como eluyente), con un tiempo de retención de 5.25 min (Figura 1B).

Método II. Se eluyó un cartucho Chromafix 30-PS- $\text{HCO}_3$  cargado con [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro en orden inverso a un recipiente de reacción usando una solución acuosa de 30  $\mu\text{l}$  de 0.55 mg de  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (3.0  $\mu\text{mol}$ )/2.25 mg de Kryptofix 2.2.2. (6.0  $\mu\text{mol}$ ) diluido en 1 ml de metanol "Trace Select". Se obtuvo [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro anhidro mediante destilación azeotrópica con acetonitrilo a 95 ° C bajo una corriente de helio. Se añadió oxirano-2-carboxilato de bencilo (II) (10  $\mu\text{l}$ ) disuelto en 2-metil-2-butanol anhidro (1 ml) al [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro. El vial se selló y se calentó a 105 ° C durante 10 minutos. A continuación, se evaporó el disolvente hasta sequedad a 100 ° C bajo una corriente de helio. Después de enfriar, la mezcla de reacción se diluyó con 4.5 ml de una solución de acetonitrilo/agua 1/2 y se pasó a través de un cartucho de alúmina neutra para descartar el [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro sin reaccionar. A continuación, se preparó ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropionato (V\*) como en el Método I.

En el método II, al realizar la reacción de radiofluoración en 2-metil-2-butanol, un disolvente prótico, la regioselectividad de la apertura del epóxido mejoró hasta más del 80 % para ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-bencil 3-fluoro-2-hidroxiopropionato (III\*) (Figura 2), y el rendimiento de fluoración global aumentó ligeramente (15-20 %).

#### 1.4. Síntesis del compuesto de referencia 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de bencilo (III)

A una solución de oxirano-2-carboxilato de bencilo (II) (1.12 g) en DCM seco (7.5 ml) enfriado a 0 ° C se añadió reactivo de Olah (fluoruro de hidrógeno piridina: piridina ~30 %, fluoruro de hidrógeno ~70 %, 3.4 ml) gota a gota. Después de alcanzar la temperatura ambiente, la mezcla se agitó durante 35 horas. La solución bifásica se añadió a una suspensión de sílice en DCM (100 ml), luego se filtró y se lavó con 50 ml de DCM. El 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de bencilo (III) deseado se purificó adicionalmente mediante cromatografía en gel de sílice. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  con TMS al 0.03 % v/v, 400 MHz):  $\delta$  7.35-7.39 (5.29 H, m, Hd, He y Hf), 5.28 (1.85 H, s, He), 4.59-4.76 (1.94 H, dqd, Ha), 4.35-4.44 (0.92H, dqint, Hb). El regioisómero no deseado 2-fluoro-3-hidroxiopropionato de bencilo (IV) se obtuvo en forma de trazas (Figura 1A1).

## II. Ejemplos biológicos

Estadísticas. Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 6.04 para Windows. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. N se refiere al número de experimentos independientes y n al número total de repeticiones por condición de tratamiento. Las barras de error a veces son más pequeñas que los símbolos. Cuando fue apropiado, se utilizó la prueba t de Student y ANOVA de una vía.  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

### II.1. Ensayo de lactato deshidrogenasa

Se midió in vitro una reducción potencial de 3-fluoropiruvato a 3-fluoro-2-hidroxiopropionato por lactato deshidrogenasa (LDH) utilizando un protocolo previamente reportado (Goncalves et al., Tetrahedron: Asymmetry, 1996, 7, 1237-1240).

En resumen, se disolvieron 14.6 mg de 3-fluoropiruvato no radiactivo en 4 ml de agua bidestilada que contenía 10 IU de LDH de músculo de conejo (Sigma) y 5.3 IU de formiato deshidrogenasa (Sigma). La reacción se inició añadiendo NADH a una concentración final de 0.2 mM y formiato de sodio a una concentración final de 40 mM. El volumen final se ajustó a 5 ml con agua bidestilada. La reacción se llevó a cabo a 37 ° C durante 24 horas bajo agitación suave y constante a 120 rpm. Luego, se centrifugó la solución a través de un filtro de 10 kDa para eliminar las enzimas, y se detectó 3-fluoro-2-hidroxiopropionato por HPLC-MS usando un Accela U (HPLC) equipado con una columna Luna Phenomenex 250\*4.60 HPLC y un ThermoScientific LTQ - ORBITRAP - XL con una fuente de ionización por electroaspiración que funciona en modo negativo.

Los datos de la Figura 3 apoyan la posibilidad de que ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluorolactato podría metabolizarse a [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoropiruvato por LDH, es decir, a lo largo de la ruta oxidativa del lactato en células cancerosas oxidativas.

### II.2. Las células de cáncer oxidativo captan y atrapan ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropionato in vitro

Silenciamiento de células y genes. El carcinoma de células escamosas de cuello uterino humano HeLa y SiHa y el carcinoma de células escamosas de laringe humano SDQ9 eran de ATCC. Las células se cultivaron de forma rutinaria en DMEM (Thermo Fischer) que contenía glucosa (4.5 g/L), Glutamax y FBS al 10 %. Se produjeron células SiHa deficientes de MCT1 y de control como se describió anteriormente (De Saedeleer et al., Oncogene, 2014, 33,

4060-4068), utilizando los siguientes vectores de Open Biosystems: TRCN0000038340 (shMCT1-1) y TRCN0000038339 (shMCT1-2). El ARNsh de control (shCTR) fue el plásmido Addgene 1864.

Inmunoprecipitación Western. La inmunoprecipitación Western se realizó como se describió anteriormente (Van Hée et al., *Front Pharmacol*, 2015, 6, 228). Los anticuerpos primarios fueron policlonales de conejos contra MCT1 (Merck Millipore # AB3538P) y MCT4 (Corbet C et al., *Cancer Res*, 2014, 74, 5507-5519); y monoclonales de ratón contra Hsp90 (BD Bioscience # 610419), CD147 (BD Bioscience # 555961) y  $\beta$ -actina (Sigma # A5441).

Oximetría. Las ratas de consumo de oxígeno basal se determinaron en un analizador bioenergético Seahorse XF96 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se sembraron veinte mil células por pozo 18 horas antes del experimento en DMEM sin glucosa y glutamina, que contenía FBS dializado al 10 % y L-lactato (10 mM),  $\pm$  D-glucosa (25 mM). Los datos se normalizan al número de células al final del experimento.

Ensayo de captación de trazador in vitro. Se utilizó una versión modificada del ensayo de captación de  $^{14}\text{C}$ -lactato descrito por Draoui et al., (Draoui et al., *Bioorg Med Chem*, 2013, 21, 7107-7117). En resumen, se sembraron 250,000 células en placas de 24 pozos de fondo plano ( $t = 0$ ). Cuando las células se unieron ( $t = 6$  h), el medio se reemplazó por DMEM sin glucosa y glutamina, que contenía FBS dializado al 10 % y L-lactato 10 mM, pH 7.0. A continuación, las células se incubaron durante la noche a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 5 %. El día del experimento, ( $t = 24$  h), se retiró el medio celular y las células se lavaron brevemente dos veces con una solución KREBS modificada sin glucosa (25 mM de HEPES, 120 mM de NaCl, 4.8 mM de KCl, 1.2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 2 mM de  $\text{CaCl}_2$ ). Donde se indica, las células se trataron durante 12 minutos con  $\alpha$ -ciano-4-hidroxycinnamato (CHC, 30  $\mu\text{M}$ ), AR-C155858 (10  $\mu\text{M}$ ) o vehículo en KREBS que contenía 10 mM de L-lactato. Después de la incubación, la solución se reemplazó por la solución de KREBS que contenía 10 mM de L-lactato, agentes farmacológicos o vehículo y [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato (45  $\mu\text{Ci/ml}$ ). Las células se incubaron durante 10 minutos para ( $\pm$ )- [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato, después de lo cual se eliminó la solución y las células se lavaron 3 veces con una solución de KREBS helada que contenía L-lactato (10 mM). Las células se lisaron con 0.1 N de NaOH y se midió la actividad de  $^{18}\text{F}$  en el lisado celular usando un contador y Wiper Gold (Laboratory Technologies). La actividad se expresa como % de la dosis inicial. Para la determinación de fondo, los pozos sin células se trataron exactamente de la misma manera.

Resultados. Para evaluar el ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato como un trazador potencial de la captación de lactato por las células cancerosas oxidativas, se seleccionaron células SiHa, HeLa y SQD9 para ensayos in vitro. De hecho, las 3 líneas celulares expresaron MCT1 (Figura 4A), y oximetría en un bioanalizador Seahorse confirmó que HeLa y SQD9 eran al menos tan oxidativas como las células SiHa in vitro (Figura 4B). Como se reportó anteriormente para SiHa (Sonveaux et al., *J Clin Invest*, 2008, 118, 3930-3942), las células podrían usar lactato como combustible oxidativo en ausencia de glucosa (Figura 4B). In vitro, captaron y atraparon ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato 6 minutos después de la administración de 45  $\mu\text{Ci/ml}$  del trazador (Figura 4C). En este momento, las dosis intracelulares oscilaron entre  $\sim 0.1$  % para SiHa y HeLa a 0.3 % de la dosis inicial para SQD9. Por tanto, se consideró que el ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato puede calificar como un trazador de la captación de lactato por las células cancerosas oxidativas.

### II.3. Validación de ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato como trazador de la captación de lactato por tumores in vivo

Ensayo de captación de trazador in vivo. Todos los experimentos in vivo se realizaron con la aprobación del Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale de la UCL (ID de aprobación 2014/UCL/MD/014) de acuerdo con las normativas nacionales y europeas sobre el cuidado de los animales. Para evitar la variabilidad entre sujetos, se inyectaron 500,000 células SiHa-shCTR y SiHa-shMCT1 en una solución HBSS:Matrigel 1:1, respectivamente, en el flanco izquierdo y derecho de los mismos ratones inmunodeprimidos NMRI macho de 6.5 semanas de edad. En otro modelo, se inyectaron 1,000,000 de células SQD9 en una solución HBSS:Matrigel 1:1 en el lomo de los mismos ratones inmunodeprimidos NMRI macho de 6.5 semanas de edad. Se realizaron experimentos en tumores de  $\sim 10$  mm de diámetro, es decir, aproximadamente 3 semanas de inoculación de células tumorales. Para inyección intravenosa, el inhibidor de MCT1 AR-C155858 (Tocris) se disolvió en NaCl al 0.9 % con (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina al 10 % a una concentración de 2.5 mg/ml (Vijay et al., *Pharm Res*, 2015, 32, 1894-1906). Para inyección intravenosa, el inhibidor de MCT1 AZD3965 (Selleckchem) se disolvió primero en etanol puro a una concentración de 100 mg/ml, luego se diluyó en NaCl al 0.9 % con (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina al 10 % a una concentración final de 2.5 mg/ml. Se inyectó ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato (150-250  $\mu\text{Ci}$ ) en la vena de la cola de los animales 10 minutos después de la administración de AR-C155858 (5 mg/kg), AZD3965 (5 mg/Kg) o vehículo (70  $\mu\text{L}$ ). En los momentos indicados, una tomografía PET estática de 10 minutos de cuerpo entero (sistema de escaneo PET Mosaic de animales pequeños, Philips Medical Systems) seguida directamente de una tomografía computarizada de transmisión de 10 minutos (NanoSPECT/CT Small Animal Imager, Bioscan; fuente: 370 MBq  $^{137}\text{Cs}$ ; Voltaje del tubo de rayos X: 55 kVp; número de proyecciones: 180; tiempo de exposición 1000 ms) se realizaron en ratones anestesiados con isoflurano mantenidos a  $35^\circ\text{C}$ . Las imágenes de PET se corrigieron en busca de atenuación y se reconstruyeron utilizando un algoritmo iterativo 3D-RAMLA en una matriz de  $128 \times 128 \times 120$ , con un tamaño de vóxel de  $1 \text{ mm}^3$ . Las imágenes de CT se reconstruyeron con un tamaño de vóxel de  $0.221 \times 0.221 \times 0.221 \text{ mm}^3$ . Las regiones 2D de interés (ROI) se delinearon manualmente en imágenes PET utilizando la versión 3.5 del software PMOD (PMOD technologies Ltd). La localización del tumor se determinó en imágenes fusionadas PET/CT. La caja torácica y la piel se utilizaron como límites internos y externos, respectivamente. La

captación del trazador se expresa como valor de captación estándar (SUV) calculado sobre el valor medio de vóxeles dentro del volumen 3D de interés definido manualmente (VOI).

Resultados. Para validar ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato como un trazador de la captación de lactato por los tumores, se utilizaron ratones con 2 tumores SiHa que expresaban shCTR o shMCT1. Este modelo es el modelo original en el que se demostró la simbiosis metabólica con base en el intercambio de lactato (Sonveaux et al., J Clin Invest, 2008, 118, 3930-3942). Se administró por vía intravenosa ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato a una dosis de 150-250  $\mu\text{Ci}$ . Las imágenes de PET/CT revelaron que la distribución del trazador dependía del tiempo, con el mejor contraste tumoral 30 minutos después de la inyección del marcador (Figura 5A). También se marcaron otros órganos que se sabe que expresan MCT y que captan lactato, como el intestino y el hígado. En este momento, no había marcaje óseo detectable que pudiera haber indicado defluoración. Es de destacar que 60 minutos después de la inyección del trazador, se detectó un marcaje en la columna y las articulaciones, lo que indica que se había producido algo de defluoración (Figura 5A). A los 30 min, no hubo discriminación aparente de SiHa-shCTR y SiHa-shMCT1 por el trazador. Esta falta de diferencia se explica por una sobreexpresión compensatoria de MCT4 tras el silenciamiento de MCT1, que se detectó mediante inmunoprecipitación Western (Figura 5B).

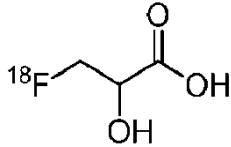
Por lo tanto, se decidió evaluar la capacidad del ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato para detectar una inhibición farmacológica de MCT1, recapitulando así en el mejor de los casos un tratamiento clínico. Un día después de la determinación inicial de la biodistribución del trazador, el mismo grupo de ratones se trató con inhibidor de MCT1 AR-C155858 (5 mg/kg) administrado por vía intravenosa 10 minutos antes de una segunda exploración PET/CT. Las imágenes adquiridas 30 minutos después de la administración de ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato revelaron que la inhibición de MCT1 por AR-C155858 inducía una disminución muy significativa en la captación del trazador en los tumores, hígado e intestino (Figura 5C y D). La vejiga, que ya era evidente en las imágenes pretratamiento (Figura 5A, 30 minutos), se marcó mucho más positivamente después de la inhibición sistémica de MCT1 (Figura 5C), lo que indica que la orina es la ruta preferida para depuración de ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato. En consecuencia, los riñones, que expresan preferentemente MCT2 para la depuración de lactato, se marcaron después del tratamiento. Tenga en cuenta que, a modo de comparación, las exploraciones PET/CT del mismo ratón se muestran en la Figura 5A y C en el tiempo de adquisición de 30 minutos, con una escala de colores normalizada para la dosis inyectada.

Para confirmar la capacidad de ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato para detectar una inhibición farmacológica de MCT1, se repitió el experimento usando células de carcinoma de células escamosas laríngeas humanas SQD9 en ratones. Se administró por vía intravenosa ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato a una dosis de 250  $\mu\text{Ci}$  a los ratones portadores de tumores, y se adquirieron imágenes de PET-CT que mostraban que los tumores capturaron y acumularon el trazador. Al día siguiente, utilizando los mismos ratones, se administró el inhibidor de MCT1 AR-C155858 (5 mg/kg) o AZD3965 (5 mg/kg) por vía intravenosa 10 minutos antes de una segunda exploración PET/CT. Las imágenes adquiridas 30 minutos después de la administración de ( $\pm$ )-[ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxipropionato revelaron que la inhibición de MCT1 por AR-C155858 o, alternativamente, AZD3965 indujo una disminución muy significativa en la captación del trazador en los tumores y el hígado (Figura 6).



# REIVINDICACIONES

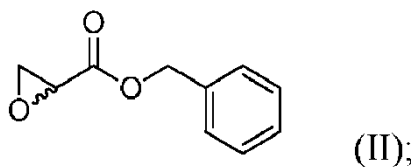
1. Un compuesto que es ácido [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxi-3-oxopropiónico:



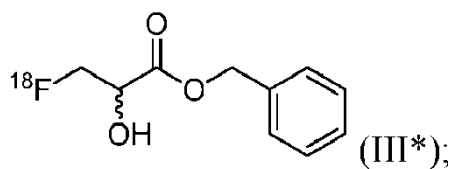
o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal es sal sódica de [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxi-3-oxopropionato.
3. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
4. Un medicamento que comprende el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2.
- 10 5. Uso del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, para la formación de imágenes por tomografía por emisión de positrones.
6. Uso del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, para la formación de imágenes por tomografía por emisión de positrones de la captación de lactato por las células.
- 15 7. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, para uso en la determinación de células o poblaciones de células de un individuo que capta lactato y/o que tiene alteraciones en la captación de lactato.
8. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 para uso en la predicción y/o monitorización si un tumor de un individuo muestra una respuesta terapéutica a tratamientos que modulan la captación y/o el metabolismo del lactato.
- 20 9. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el tratamiento que modula la captación de lactato se selecciona de fármacos que inhiben MCT, preferiblemente fármacos que inhiben MCT1.
10. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el tratamiento que modula el metabolismo del lactato se selecciona entre fármacos que inhiben la LDH, preferiblemente fármacos que inhiben la LDHB, MPC o ALT.
11. Un método para la detección in vitro de la captación de lactato en un tejido, comprendiendo dicho método
- 25 (1) poner en contacto dicho tejido con una cantidad del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, suficiente para ser detectado por PET;
- (2) formar al menos una imagen PET; y
- (3) determinar la captación de lactato observando la imagen.
12. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en un método de formación de imágenes de enfermedades, comprendiendo dicho método
- 30 (1) administrar a un individuo una cantidad del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 suficiente para ser detectado por PET; y
- (2) formar al menos una imagen por PET que muestre la distribución del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, dentro del individuo.
13. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 para uso en un método de monitorización de la terapia de una enfermedad en un individuo, comprendiendo dicho método
- 35 (1) administrar a dicho individuo una cantidad del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, suficiente para lograr la formación de imágenes; y
- (2) realizar la formación de imágenes usando PET detectando una señal del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, dentro del individuo, para seguir la respuesta del individuo a la terapia.
- 40 14. Un proceso de fabricación de ácido [<sup>18</sup>F]-3-fluoro-2-hidroxi-3-oxopropiónico o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende las siguientes etapas:

a) una reacción de apertura de anillo epóxido en oxirano-2-carboxilato de bencilo (II)



en presencia de [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruro, para producir 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de [ $^{18}\text{F}$ ]-bencilo (III\*)



5 y

b) hidrólisis de 3-fluoro-2-hidroxiopropionato de [ $^{18}\text{F}$ ]-bencilo (III\*) para producir ácido [ $^{18}\text{F}$ ]-3-fluoro-2-hidroxiopropiónico o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende una etapa preliminar de síntesis de oxirano-2-carboxilato de bencilo (II) por epoxidación de acrilato de bencilo (I).

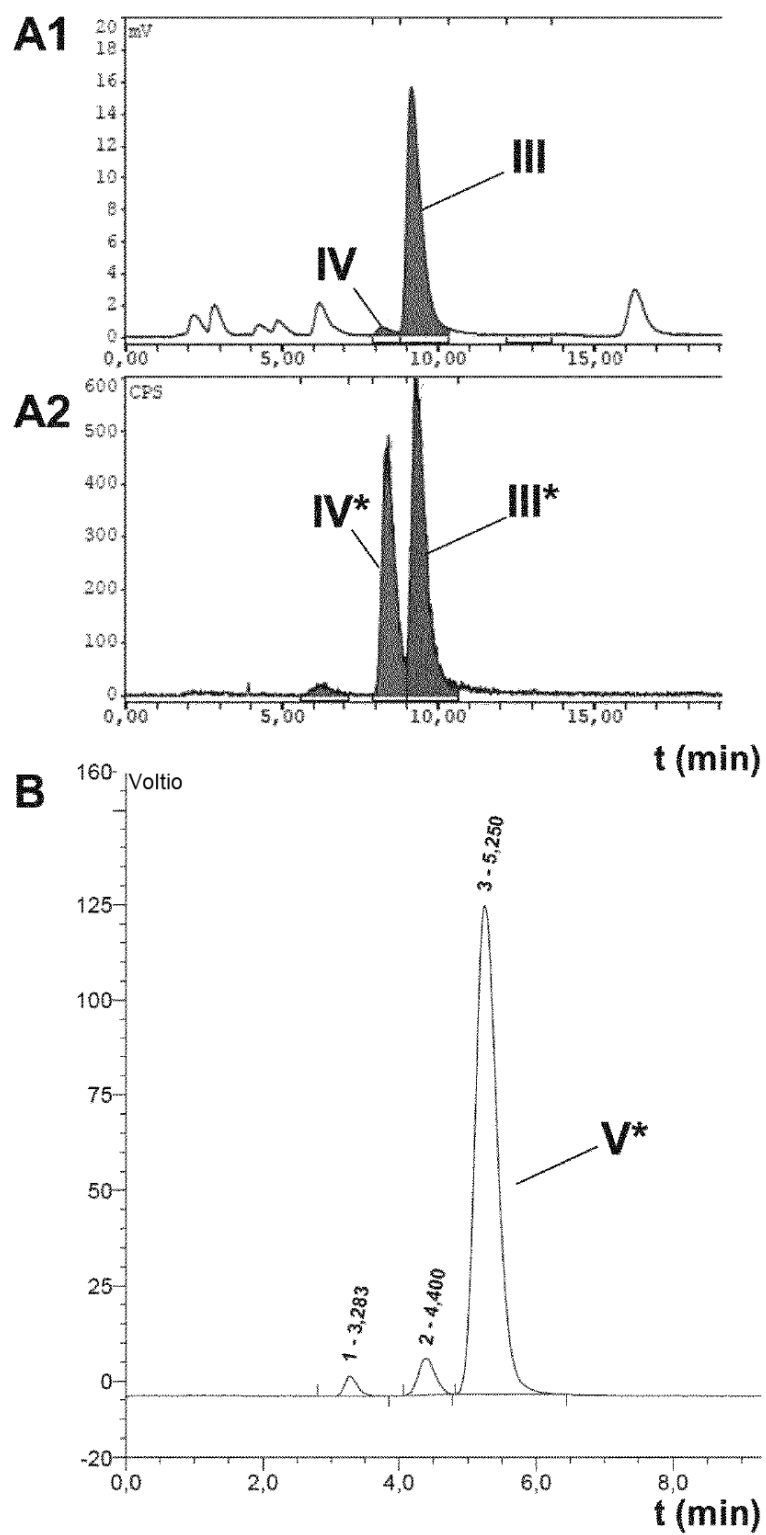


FIG. 1

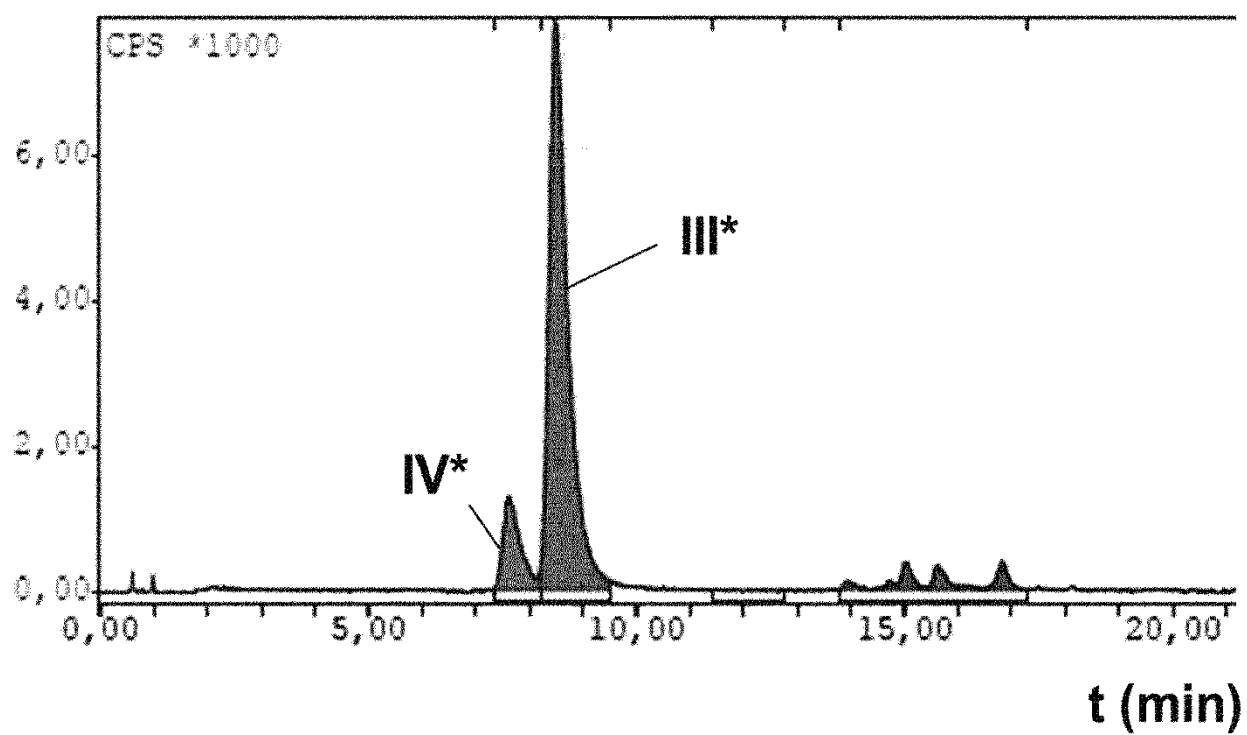


FIG. 2

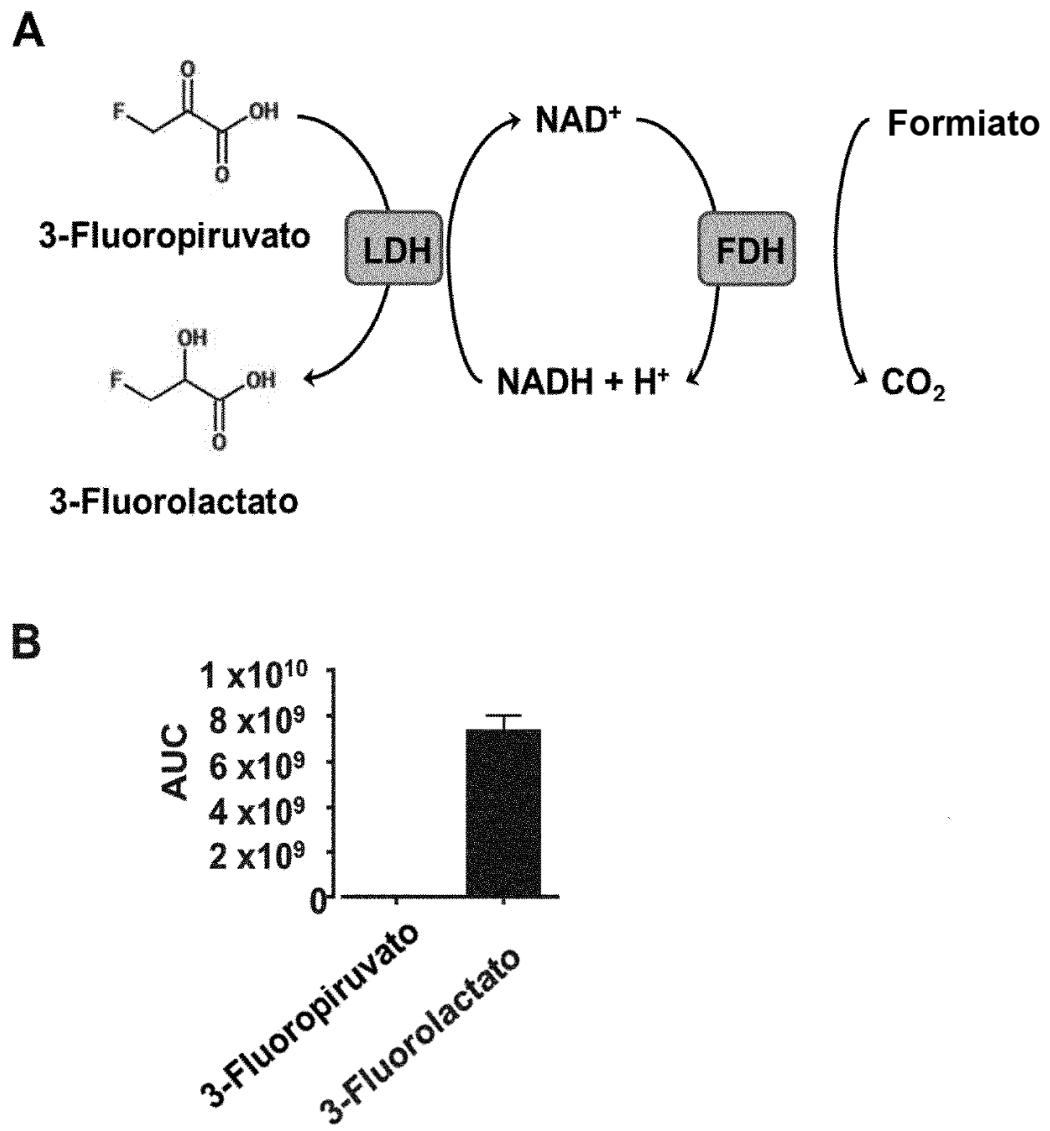


FIG. 3

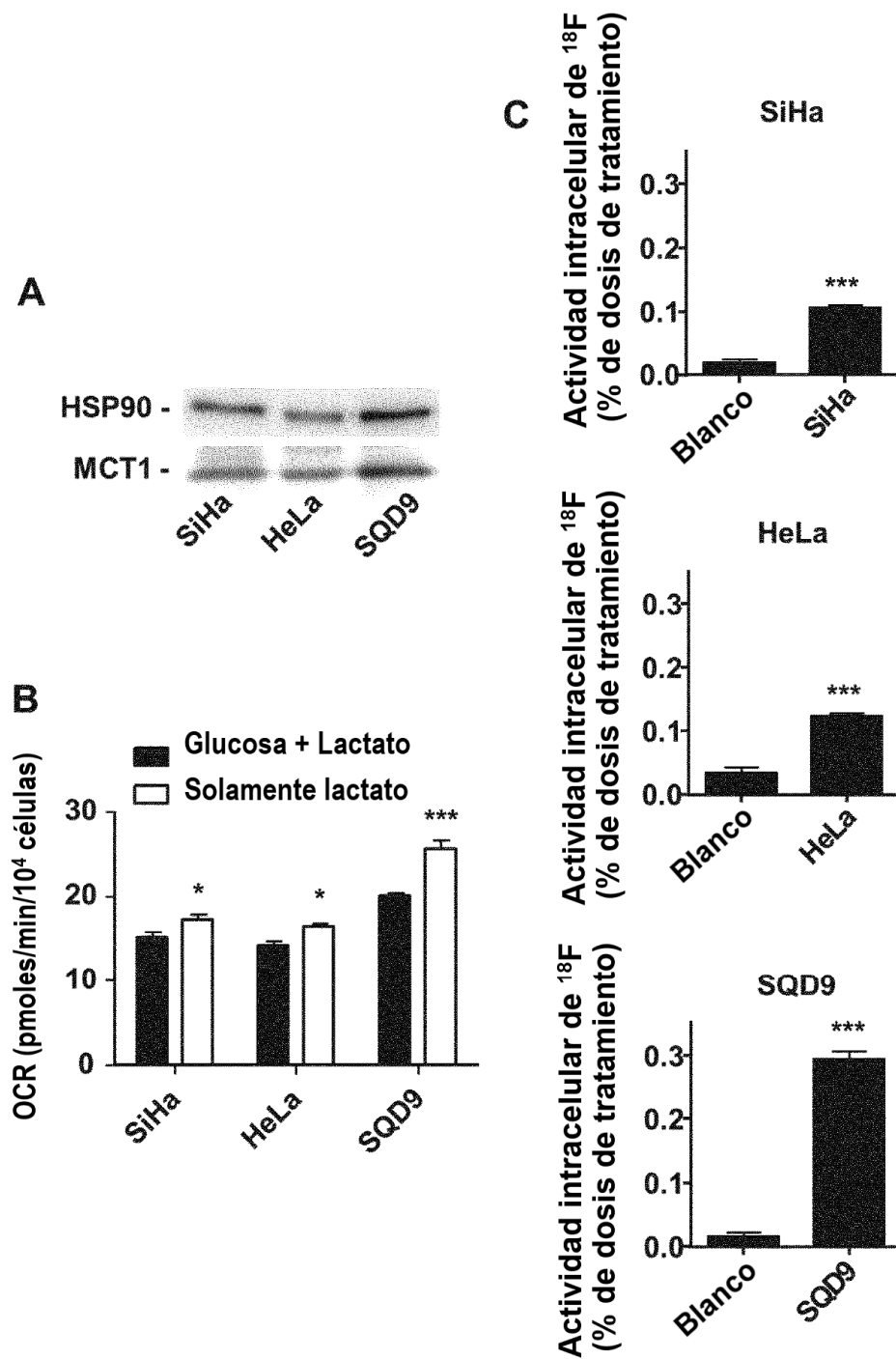


FIG. 4

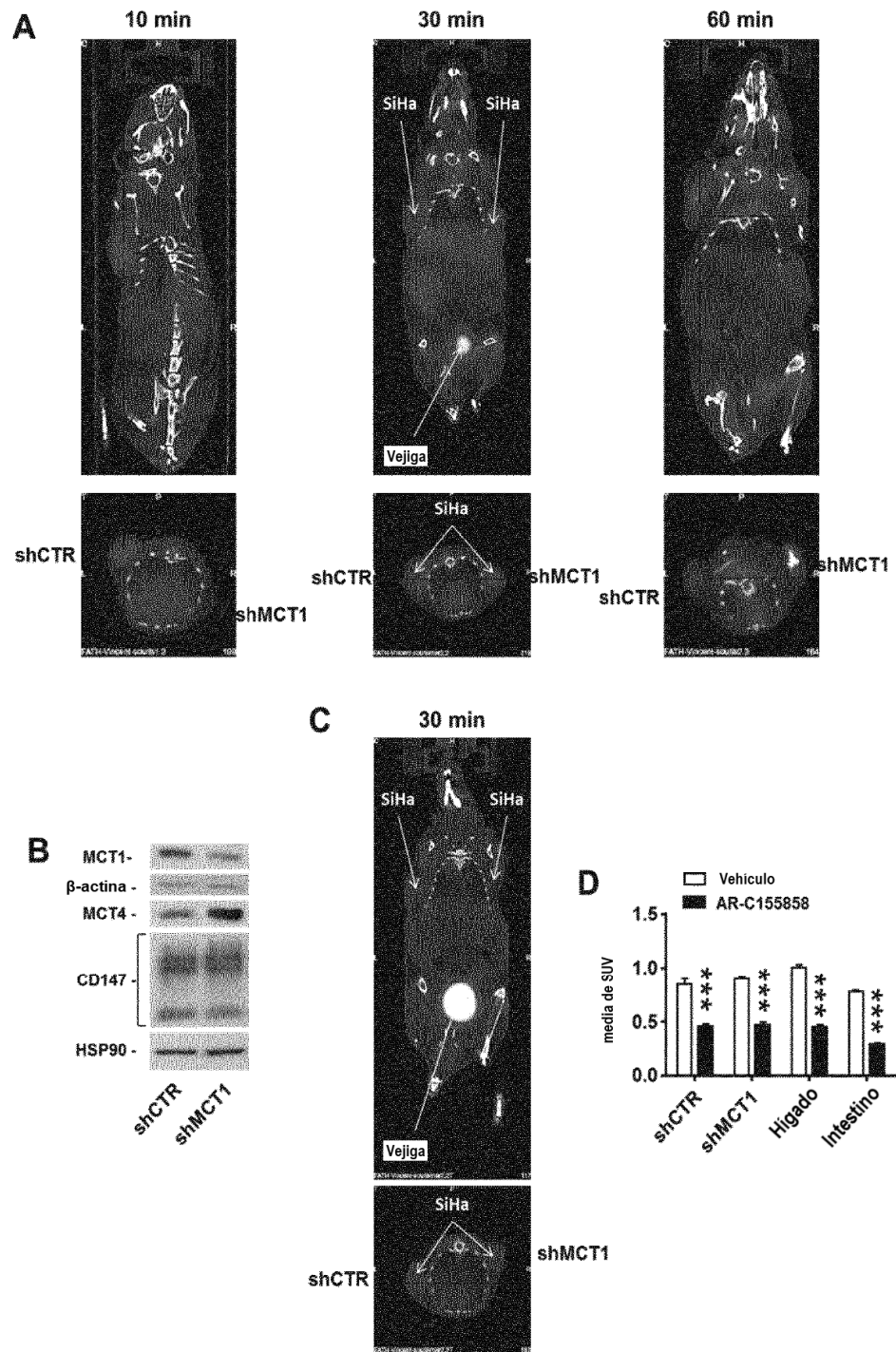


FIG. 5

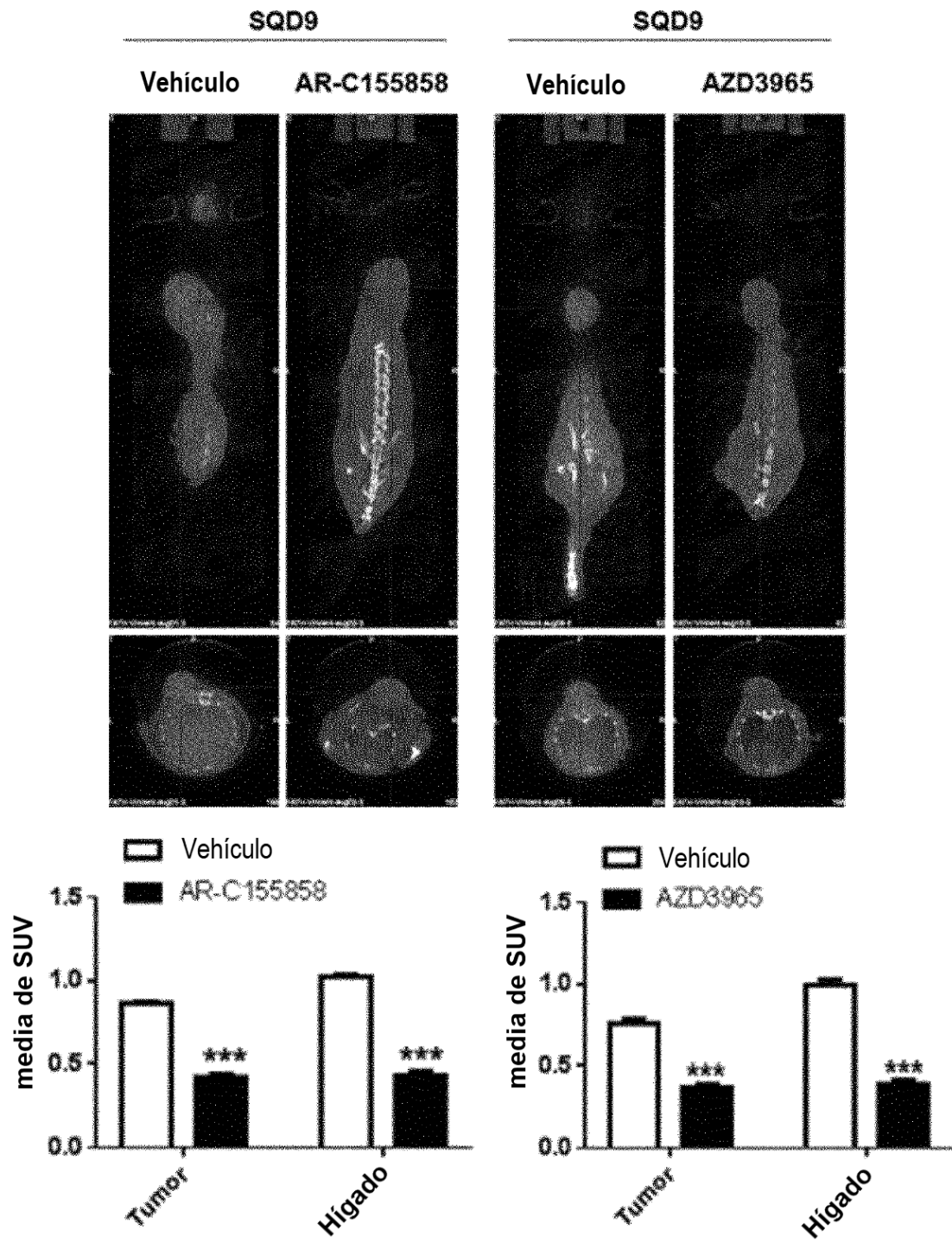


FIG. 6