

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 974**

51 Int. Cl.:

C07D 475/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2012** **PCT/EP2012/065702**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013** **WO13024035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2012** **E 12746091 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024** **EP 2766364**

54 Título: **Conjugados de folato de entidades fijadoras de albúmina**

30 Prioridad:

17.08.2011 EP 11177732

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SCHIBLI, ROGER;
MOSER, RUDOLF;
MÜLLER, CRISTINA MAGDALENA;
STRUTHERS, HARRIET;
GROEHN, VIOLA;
AMETAMEY, SIMON MENSAH y
FISCHER, CINDY RAMONA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 990 974 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

Conjugados de folato de entidades fijadoras de albúmina

5 Campo de la invención

La presente invención está dirigida a nuevos folato-conjugados trifuncionales que comprenden un folato, un aglutinante de albúmina y un fragmento diagnóstico o terapéutica basada en radionucleidos, así como a composiciones farmacéuticas de los mismos, a su método de producción y a su uso en aplicaciones médicas diagnósticas y terapéuticas, tal como el diagnóstico por imagen nuclear y la terapia con radionucleidos.

Antecedentes

El direccionamiento específico en células para la administración de agentes diagnósticos o terapéuticos es un campo ampliamente investigado y ha conducido al desarrollo de aplicaciones médicas diagnósticas y/o terapéuticas no invasivas. En particular, en el campo de los procedimientos y tratamientos de medicina nuclear, que emplean radioisótopos caracterizados por la emisión de rayos gamma o partículas beta o alfa o electrones Auger, se requiere la localización selectiva de estos compuestos radiactivos en células o tejidos diana para lograr una alta intensidad de señal y especificidad para la visualización (radiación gamma o positrónica) de tejidos específicos, la evaluación de una enfermedad y/o el seguimiento de los efectos de tratamientos terapéuticos, o bien para lograr una alta dosis de radiación mediante radiación de partículas (radiación beta o alfa), para la administración de dosis adecuadas de radiación ionizante a un lugar enfermo específico, evitando al mismo tiempo daños a los tejidos sanos.

El receptor de folato (FR) es una proteína de alta afinidad asociada a la membrana, que presenta una expresión limitada en las células sanas, pero con frecuencia se sobreexpresa en una amplia variedad de tipos celulares específicos, tal como las células tumorales epiteliales (por ejemplo, ováricas, endometriales, mamarias, colorrectales, renales, pulmonares, nasofaríngeas) y los macrófagos activados (pero no en reposo), que intervienen en la inflamación y las enfermedades autoinmunitarias. Esto condujo al uso del ácido fólico y sus derivados como agente diana para la administración de agentes terapéuticos y/o de diagnóstico a estas poblaciones celulares específicas para lograr una concentración selectiva de agentes farmacéuticos y/o de diagnóstico en estas células específicas en relación con las células normales. Entre estos conjugados de folato se encuentran los radiofármacos de folato (Leamon and Low, Drug Discov. Today 2001; 6:44-51; Ke et al., Adv Drug Deliv Rev 2004, 1143-1160, Müller and Schibli, J Nucl Med 2011; 52:1-4; Muller, Curr Pharm Design 2012; 18:1058-1083), conjugados de folato de agentes quimioterapéuticos (Leamon and Reddy, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1127-41; Leamon et al, Bioconjugate Chem. 2005; 16:803-11; Vlahov et al. Bioconjug Chem 2012; in press), proteína y toxinas de proteínas (Ward et al., J. Drug Target. 2000; 8:119-23; Leamon et al, J. Biol. Chem. 1993; 268:24847-54; Leamon and Low, J. Drug Target. 1994; 2:101-12), oligonucleótidos antisentido (Li et al, Pharm. Res. 1998; 15:1540-45; Zhao and Lee, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1193-204), liposomas (Lee and Low, Biochim. Biophys. Acta-Biomembr. 1995; 1233:134-44; Gabizon et al, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1177-92), moléculas de hapteno (Paulos et al, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1205-17); agentes de contraste para MRI (Konda et al, Magn. Reson. Mat. Phys. Biol. Med. 2001; 12:104-13) etc.

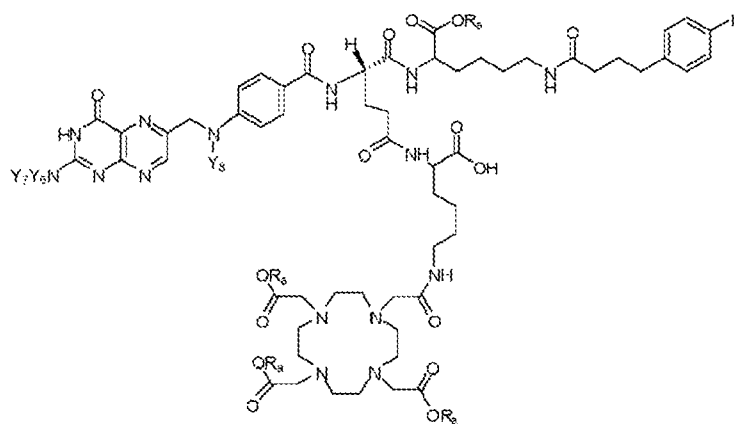
Los radiofármacos de folato conocidos incluyen, por ejemplo, conjugados con histamina marcada con ¹²⁵I (US 4,136,159), con pequeños quelatos metálicos como la deferoxamina (US 5,688,488), poliaminocarboxilatos acíclicos o cíclicos (por ejemplo, DTPA, DTPA-BMA, DOTA y DO3A; US 6,221,334, Fani et al. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2011;38: 108-119; Müller et al. Nucl Med Biol 2011; 38: 715-723), bisaminotiol (US 5,919,934), 6-hidrazinonicotinamido-hidrazido (Shuang Liu, Topics in Current Chemistry, vol 252 (2005), Springer Berlin/Heidelberg), y etilendicisteína (US 7,067,111) y pequeños péptidos (US 7,128,893).

Sin embargo, todavía se necesitan conjugados de radionucleidos alternativos y altamente selectivos, que puedan sintetizarse fácilmente y que presenten una relación óptima entre el tejido diana (es decir, células tumorales, macrófagos activados, etc.) y el tejido no diana, y que se eliminen a través de los riñones, para utilizarlos como agentes de imagen de tumores en procedimientos altamente selectivos y no invasivos que permitan la detección precoz y el tratamiento de células tumorales, macrófagos activados (y otras células diana que presenten una alta expresión de FR, aún no identificadas).

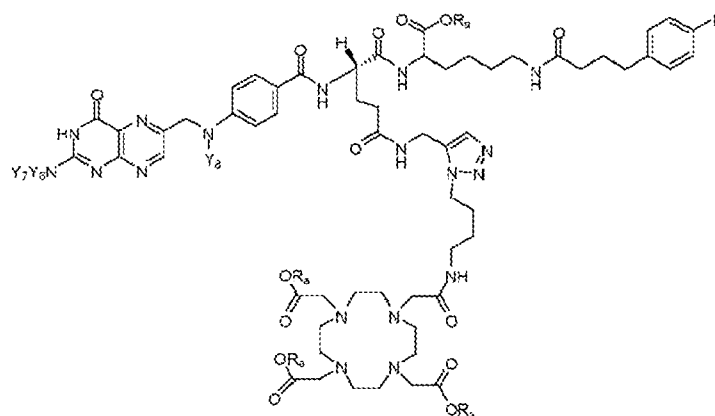
Los solicitantes han encontrado ahora nuevos conjugados de folato trifuncionales capaces de superar los inconvenientes de los conjugados conocidos y satisfacer las necesidades actuales mostrando varias ventajas, tal como la formación de complejos estables, una mejor biodistribución y una mayor captación por el tejido diana. Estos conjugados de folato trifuncionales novedosos comprenden un folato, un aglutinante de albúmina y un fragmento terapéutica o de diagnóstico basada en radionucleidos, por ejemplo, un fragmento adecuada para aplicaciones de diagnóstico por imagen o radioterapéuticas.

Resumen de la invención

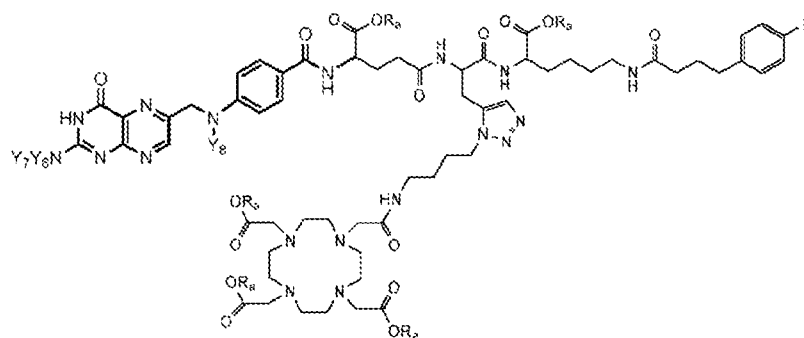
La presente invención está dirigida en un primer aspecto a nuevos folato-conjugados trifuncionales que comprenden un folato, un aglutinante de albúmina y un fragmento terapéutica o de diagnóstico basada en radionucleidos que tiene la siguiente fórmula



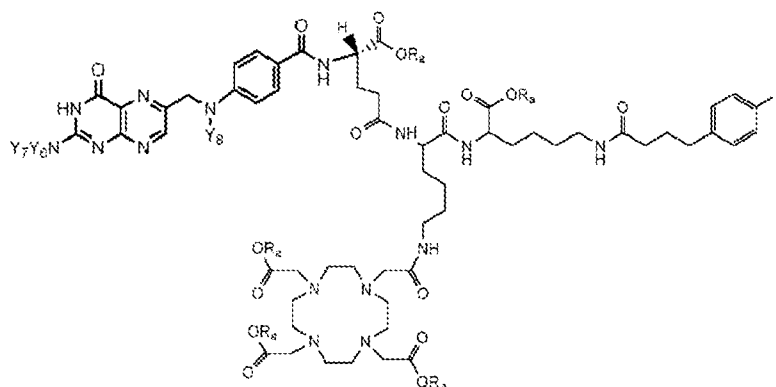
o



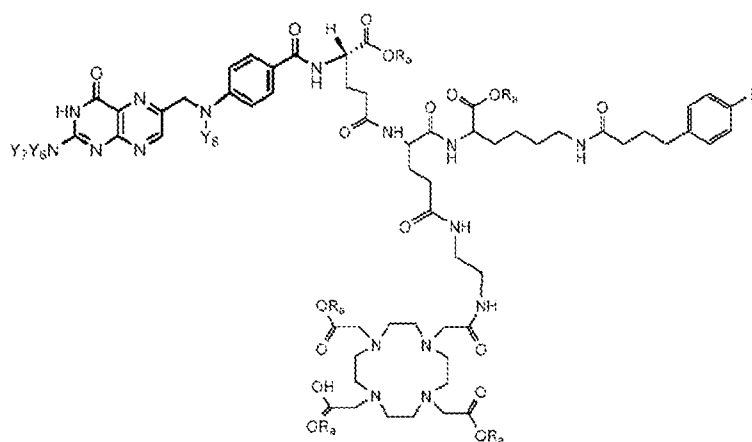
o



o



o



5

en donde

10 Y_6, Y_7 se seleccionan independientemente entre sí de H, halo, alquilo C(1-12), alquénilo C(2-12), alquinilo C(2-12), -OR', -COR', -COOR' y -NHR', en donde R' es H o alquilo C(1-8),

Y_8 se selecciona entre H, nitroso, alquilo C(1-12), -OR', -COR' y -COR' halosustituido, en donde R' es H o alquilo C(1-12),

15 R_a es H o C(1-8) (en lo sucesivo también denominados compuestos de la invención).

En algunas realizaciones, el fragmento terapéutico o de diagnóstico basada en radionucleidos de los compuestos de la invención es un radionucleido metálico quelado que comprende un radionucleido metálico y el quelante metálico.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para sintetizar los compuestos de la invención.

En otro aspecto más, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad de imagen diagnóstica o una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable para el mismo.

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona usos de compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración conveniente y eficaz a un sujeto que necesite diagnóstico por imagen o terapia con radionúclidos. El sujeto de los métodos de la presente invención es preferentemente un mamífero, tal como un animal o un ser humano, preferentemente un ser humano.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit de uno o varios viales o varios compartimentos que contiene todos los componentes necesarios para preparar los compuestos de esta invención.

35 Otras características y ventajas de la invención se desprenderán de la siguiente descripción detallada de la misma y de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Estabilidad in vitro de conjugados de folato radiomarcados con ^{177}Lu en PBS y plasma humano (-■- representa folato DOTA ^{177}Lu en PBS, -▲- representa folato DOTA ^{177}Lu en plasma, -●- representa folato DOTA-AB ^{177}Lu en PBS, -◆- representa folato DOTA-AB ^{177}Lu en plasma).

Figura 2: Captación celular e internalización de folato DOTA ^{177}Lu y folato DOTA-AB ^{177}Lu en células positivas a KB a FR a las 2 h y 4 h (las barras rayadas verticalmente representan folato DOTA ^{177}Lu a las 2 h, las barras rayadas horizontalmente representan folato DOTA-AB ^{177}Lu a las 2 h, las barras rayadas diagonalmente representan folato DOTA ^{177}Lu a las 4 h, las barras rellenas representan folato DOTA-AB ^{177}Lu a las 4 h).

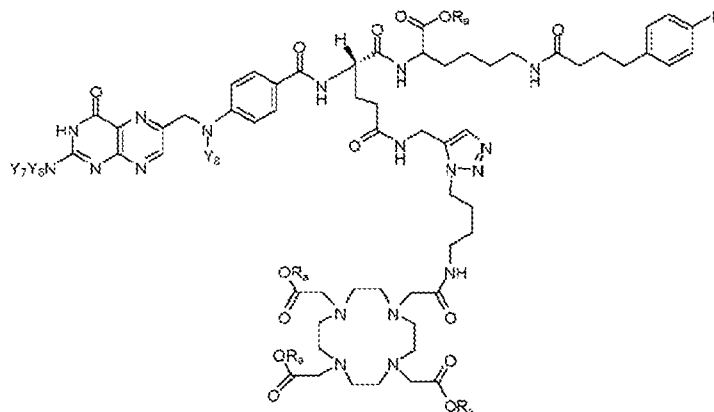
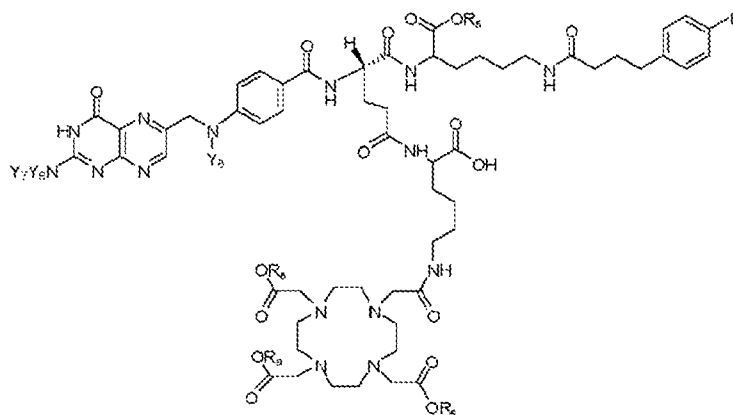
Figura 3: Estudio de biodistribución en ratones portadores de tumores KB 4 h y 24 h después de la inyección de folato DOTA-AB ^{177}Lu y el compuesto de control folato DOTA ^{177}Lu (las barras punteadas representan folato DOTA ^{177}Lu a las 4 h p.i., las barras rayadas representan folato DOTA ^{177}Lu a las 24 h p.i., las barras vacías representan folato DOTA-AB ^{177}Lu a las 4 h p.i., las barras rellenas representan folato DOTA-AB ^{177}Lu a las 24 h p.i.).

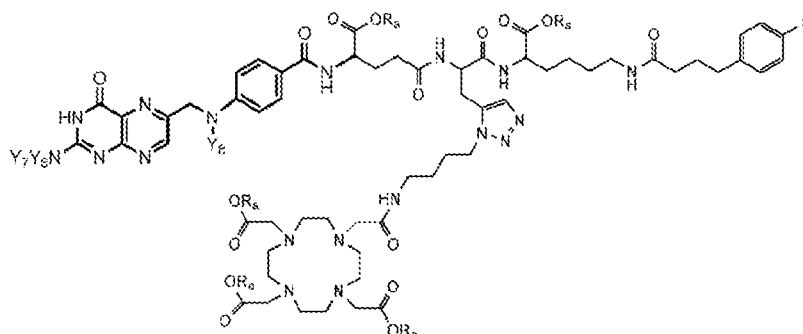
Figura 4(A), (B): Imágenes SPECT/CT de ratones portadores de tumores: Captación de un folato DOTA-AB ^{177}Lu (A) y radiomarcado con ^{161}Tb (B) en un xenoinjerto tumoral KB (T) y en los riñones (K) a las 4 h p.i. (izquierda) y 24 h p.i. (derecha).

Figura 5(A), (B) : Efecto del folato DOTA-AB-16 radiomarcado con ^{177}Lu (grupo A) o el folato DOTA-folato radiomarcado con ^{177}Lu de control (grupo B) 15 en ratones desnudos portadores de tumores KB a lo largo del tiempo, es decir, 19 días (-1- representa el grupo A, -◆- representa el grupo B).

Descripción detallada de la invención

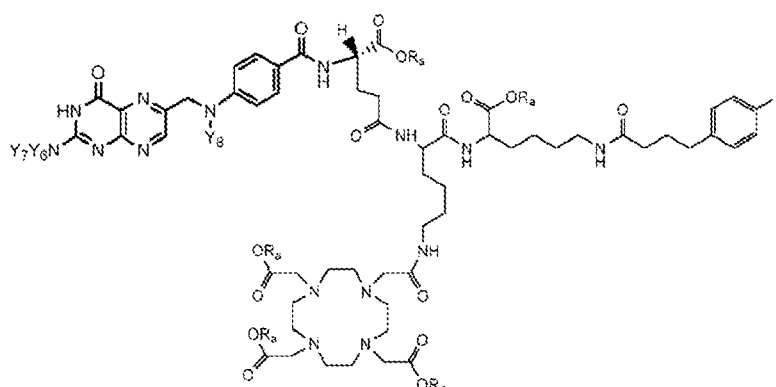
La presente invención está dirigida en un primer aspecto a nuevos folato-conjugados trifuncionales que comprenden un folato, un aglutinante de albúmina y un fragmento terapéutica o de diagnóstico basada en radionucleidos que tiene la siguiente fórmula



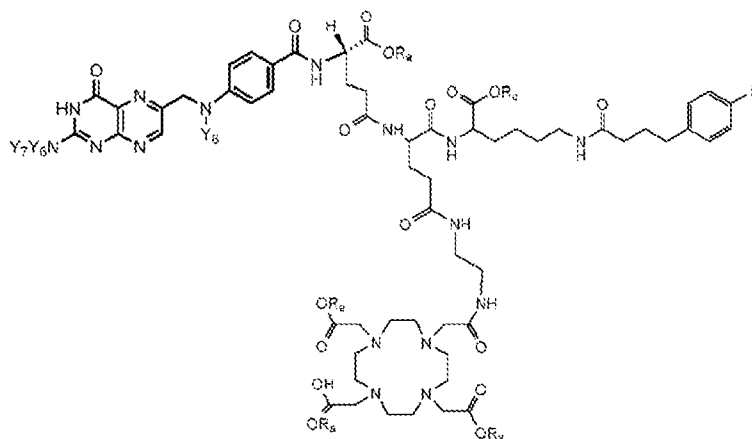


o

5



o



10

en donde

15 Y_6, Y_7 se seleccionan independientemente entre sí de H, halo, alquilo C(1-12), alqueno C(2-12), alquino C(2-12), $-OR'$, $-COR'$, $-COOR'$ y $-NHR'$, en donde R' es H o alquilo C(1-8),

Y_8 se selecciona entre H, nitroso, alquilo C(1-12), $-OR'$, $-COR'$ y $-COR'$ halosustituido, en donde R' es H o alquilo C(1-12),

20 R_a es H o alquilo C(1-8).

La fracción terapéutica o de diagnóstico basada en radionucleidos (en lo sucesivo también denominada "fracción de radionucleidos") de los compuestos de la invención puede comprender cualquier radionucleido metálico conocido, tal como un ion metálico radiactivo, un ion metálico paramagnético o un emisor beta adecuado para la detección intravascular.

Las moléculas de radionúclidos preferidas para fines de diagnóstico son cualquier molécula conocida para su uso

en la presente invención, que pueda detectarse externamente de forma no invasiva tras su administración in vivo. Las moléculas de radionúclidos preferidas son los radionúclidos metálicos quelados (es decir, los radiometales), es decir, en particular aquellos adecuados para la detección mediante SPECT o PET. El folato, el aglutinante de albúmina y la fracción de radionúclido de los compuestos de la invención tienen una disposición radial, es decir, tanto el aglutinante de albúmina como la fracción de radionúclido están unidos a la porción de aminoácido de la molécula de folato.

Las moléculas de radionúclidos preferidas para fines terapéuticos son cualesquiera moléculas conocidas para su uso en la presente invención, que pueden utilizarse para el tratamiento de cualquier enfermedad que responda al tratamiento con radionúclidos, por ejemplo, el cáncer, tras su administración in vivo. Los radionúclidos preferidos son los radionúclidos metálicos quelados (es decir, los radiometales). El folato, el aglutinante de albúmina y la fracción de radionúclido de los compuestos de la invención tienen una disposición radial, es decir, tanto el aglutinante de albúmina como la fracción de radionúclido están unidos a la porción de aminoácido de la molécula de folato..

El término "alquilo", cuando se utiliza solo o en combinación, se refiere a grupos alquilo de cadena recta o ramificada que contienen el número indicado de átomos de carbono. Así, el término "alquilo C(1-12)" se refiere a un radical hidrocarburo cuya cadena de carbono es recta o ramificada y comprende de 1 a 12 átomos de carbono. Los grupos alquilo preferidos incluyen los grupos alquilo C(1-8) que se refieren a un radical hidrocarburo cuya cadena de carbono es recta o ramificada y comprende de 1 a 8 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, 2,3-dimetilbutano, neohexilo, heptilo, octilo. Los grupos alquilo más preferidos son los grupos alquilo C(1-6) que contienen de uno a seis átomos de C, más preferentemente de uno a cuatro átomos de carbono. Las cadenas alquílicas opcionalmente sustituidas, tal como las designadas por $-(CHR)_x-$, representan una cadena alquílica que tiene grupos $-CH_2-$ del valor indicado x, y en donde cada uno de los grupos $-CH_2-$ puede estar sustituido independientemente del otro con el grupo indicado R. Así, en caso de múltiples grupos R, los grupos R pueden ser iguales o diferentes.

El término "alqueno", solo o en combinación con otros grupos, se refiere a grupos alquilo de cadena recta o ramificada, tal como se definen anteriormente, que tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono. Así, el término "alqueno C(2-12)" se refiere a un radical hidrocarbonado cuya cadena de carbono es recta o ramificada y comprende de 1 a 12 átomos de carbono y uno o más dobles enlaces carbono-carbono. Los grupos alqueno preferidos incluyen grupos alqueno C(2-8), tal como metileno, etileno, propileno, isopropileno, butileno, t-butileno, sec-butileno, isobutileno, amileno, isoamileno, pentileno, isopentileno, hexileno y similares. Los grupos alqueno preferidos contienen de dos a seis, más preferentemente de dos a cuatro átomos de carbono.

El término "alquino", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a grupos alquilo lineales o ramificados, tal como se definen en el presente documento, que tienen uno o más enlaces triples carbono-carbono. Los grupos alquino preferidos contienen de dos a seis, más preferentemente de dos a cuatro átomos de carbono.

Como se ha indicado anteriormente, la definición de "alquilo" se aplica tanto cuando se utiliza solo como en combinación con otros grupos. Así, los grupos alcoxi (o $-O$ -alquilo) se refieren a grupos alquilo como los definidos anteriormente, sustituidos con un oxígeno, tal como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, terc-butoxi y similares. Los grupos alcanoílicos, tal como se utilizan en el presente documento, incluyen los grupos formilo y $-CO$ -alquilo, que se refieren a grupos alquilo, tal como se han definido anteriormente, terminalmente sustituidos con un carbonilo, tal como acetilo, propanoílo, butanoílo, pentoílo y similares. Los grupos alquilamino (o $-NHR$ -alquilo o $-N(R)_2$ -alquilo) se refieren a grupos alquilo como los definidos anteriormente, sustituidos con nitrógeno, incluyendo tanto monoalquilamino como metilamino, etilamino, propilamino, terc-butilamino, y similares, y dialquilamino como dimetilamino, dietilamino, metilpropilamino y similares.

El término "halógeno" o "halo" se refiere a cualquier elemento del Grupo 7 e incluye fluoro, cloro, bromo y yodo.

El término "halosustituido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a grupos alquilo que tienen fracciones halógeno en lugar de al menos un hidrógeno.

El término "ligante de albúmina", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al grupo de los compuestos de la invención, que se une de forma no covalente a la albúmina de suero humano (normalmente con una afinidad de unión inferior a unos 10 μM). Las propiedades de unión de la albúmina pueden medirse mediante resonancia de plasmón superficial, como se describe en J. Biol. Chem. 277(38), 35035-35042, (2002). En algunas realizaciones, el fragmento terapéutico basada en radionúclidos o la fracción de diagnóstico de los compuestos de la invención comprenden un ion metálico de radioimagen. La unión de un compuesto de la invención a un ion/radionúclido puede determinarse midiendo la constante de disociación entre el compuesto de la invención y el ion/radionúclido. A los efectos de la presente invención, la constante de disociación K_D entre el compuesto de la invención y el ion/radionúclido es de aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente $10^{-15} M^{-1}$. Preferentemente, la constante de disociación K_D entre el quelante y el ion/radionúclido es de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente $10^{-15} M^{-1}$.

Los compuestos de la invención pueden o no estar complejados con un ion metálico de radioimagen. Los radionucleidos metálicos típicos para gammagrafía o terapia con radionucleidos incluyen ^{99}Tc , ^{51}Cr , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{47}Sc , ^{51}Cr , ^{167}Tm , ^{141}Ce , ^{211}In , ^{168}Yb , ^{175}Yb , ^{140}La , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{165}Dy , ^{166}Dy , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{203}Pb , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{214}Bi , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{117}mSn , ^{149}Pm , ^{161}Tb , ^{155}Tb , ^{152}Tb , ^{149}Tb , ^{177}Lu , ^{198}Au y ^{199}Au . La elección del metal se determinará con base en de la aplicación terapéutica o diagnóstica deseada. Por ejemplo, para fines de diagnóstico, los radionucleidos pueden incluir ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{111}In , mientras que para fines terapéuticos, los radionucleidos pueden incluir ^{64}Cu , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}In , ^{117}mSn , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{175}Yb , ^{177}Lu , $^{186/188}\text{Re}$ y ^{199}Au . Una persona experta sabrá qué radionucleido elegir para la aplicación prevista.

Se entiende que todos los isómeros, incluidos los enantiómeros, diastereoisómeros, rotámeros, tautómeros y racematos de los compuestos de la invención se contemplan como parte de esta invención. La invención incluye los estereoisómeros en forma ópticamente pura y en mezcla, incluidas las mezclas racémicas. Los isómeros pueden prepararse mediante técnicas convencionales, ya sea haciendo reaccionar materiales de partida ópticamente puros u ópticamente enriquecidos, o separando isómeros de un compuesto de fórmula I. Esto se aplica específicamente a los grupos sacáridos, o cualquier otro grupo, por ejemplo, grupos aminoácidos presentes en un compuesto de fórmula I (y fórmulas posteriores), que pueden estar presentes en la forma L natural o en la forma D no natural, es decir, la porción de ácido glutámico (o sus derivados).

En otro aspecto, la presente invención también proporciona métodos para sintetizar un compuesto de la invención. La síntesis se basa preferentemente en un enfoque modular (utilizando funcionalidades adecuadamente derivatizadas, es decir, grupo folato, grupo aglutinante de albúmina y grupo quelante) y se basa en químicas de acoplamiento estándar conocidas en la técnica, incluyendo la esterificación, la amidación y la reacción clic. Esta última reacción ha demostrado ser especialmente útil y se basa en el acoplamiento de una azida y un grupo alquino en una cicloadición en condiciones térmicas o en presencia de un catalizador para obtener el compuesto final elegido (Kolb and Sharpless, Drug Discovery Today 2003, 8, 1128; Kolb et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 2004; Rostovtsev, V. V. et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41, 2596; US 2005/02222427; WO 06/116629). Estas reacciones se conocen como cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen (condiciones térmicas) y Reacción clic (condiciones catalíticas) y se han descrito en la técnica (Kolb and Sharpless, Drug Discovery Today 2003, 8, 1128; Kolb et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 2004; Rostovtsev et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41, 2596; US 2005/02222427; WO 06/116629). Más específicamente los compuestos de la invención que tienen un triazol se obtienen por cicloadición de una azida $\text{R}_a\text{-N}_3$ con un alquino $\text{R}_b\text{-C}\equiv\text{C-R}_c$.

Será obvio para una persona experta seleccionar las condiciones apropiadas para los diversos pasos de acoplamiento y elegir los grupos protectores PG apropiados (por ejemplo, véase Greene & Wuts, Eds., Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd Ed., 1991, John Wiley & Sons, NY.) y grupos salientes LG (por ejemplo, un halógeno, tosilato, mesilato, triflato, grupo carbonato).

También será obvio para un experto que el último paso en la síntesis de los compuestos de la invención incluye preferentemente la introducción del radionucleido metálico.

Así, la presente invención proporciona además un método de sintetizar un complejo de la invención, que comprende marcar tal compuesto de la invención, que incluye los pasos de obtener primero un compuesto de la invención, y hacer reaccionar el compuesto con un radionucleido como se especifica más arriba, generalmente en presencia de un agente reductor para formar un complejo de quelato metálico entre el compuesto de la invención y el radionucleido. El agente reductor puede ser cualquier agente reductor conocido, pero preferiblemente será un ion ditionito o un ion estañoso.

En un aspecto más, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad de imagen diagnóstica de al menos un compuesto de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable para el mismo. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas contienen al menos un compuesto de la invención complejado con un radionucleido metálico, seleccionado entre ^{177}Lu , ^{161}Tb , ^{213}Bi , o ^{111}In . Tal como se utiliza en el presente documento, un portador farmacéuticamente aceptable, que está presente en una dosis adecuada, incluye disolventes, medios de dispersión, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y similares que son fisiológicamente aceptables. El uso de tales medios y agentes es bien conocido en la técnica.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona usos de compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración conveniente y eficaz a un sujeto que necesite diagnóstico por imagen y/o monitoreo. El sujeto de los métodos de la presente invención es preferentemente un mamífero, tal como un animal o un ser humano, preferentemente un ser humano.

Así, en una realización particular, la presente invención proporciona un método de diagnóstico por imagen de una célula o población de células que expresan un receptor de folato in vitro o in vivo.

En alguna realización, la presente invención proporciona un método de diagnóstico por imagen de una célula o población de células que expresan un receptor de folato in vitro o in vivo, dicho método comprende los pasos de administrar al menos un compuesto o composición de la presente invención en una cantidad de diagnóstico por imagen, y obtener una imagen de diagnóstico de dicha célula o población de células.

En alguna realización, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en un método de diagnóstico por imagen o monitorización de un sujeto que comprende los pasos de (i) administrar al menos un compuesto de la invención en una cantidad de diagnóstico por imagen, y (ii) realizar el diagnóstico por imagen mediante PET detectando una señal de dicho al menos un compuesto. En algunas realizaciones, el compuesto para uso en dicho método de diagnóstico por imagen o monitorización de un sujeto se utiliza en combinación con cualquier otro método de diagnóstico o terapia del cáncer.

En alguna realización, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en un método de monitorización de la terapia del cáncer en un sujeto que comprende los pasos de (i) administrar a un sujeto que lo necesite al menos un compuesto de la invención en una cantidad de diagnóstico por imagen en combinación con un agente terapéuticamente activo, y (ii) realizar el diagnóstico por imagen mediante PET detectando una señal de dicho al menos un compuesto para seguir el curso de la terapia del cáncer. En algunas realizaciones, el compuesto para uso en dicho método de monitorear la terapia del cáncer un sujeto se utiliza en combinación con cualesquier otros métodos de diagnóstico o terapia del cáncer.

En alguna realización, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico simultáneo y la terapia con radionucleidos que comprende los pasos de administrar a un sujeto que lo necesite al menos un compuesto o composición de la presente invención en una cantidad diagnóstica y terapéuticamente eficaz, y tras la localización de dicho al menos un compuesto o composición en los tejidos deseados, someter los tejidos a irradiación, y obtener una imagen diagnóstica de dichos tejidos para seguir el curso del tratamiento.

Una imagen de una célula o tejido que expresa el receptor de folato, es decir, una célula o tejido tumoral, marcado con uno o más de los compuestos o composiciones de la presente invención puede detectarse utilizando un detector de radiación, por ejemplo, un detector de radiación γ . Uno de tales procedimientos es la escintigrafía. También pueden utilizarse procedimientos de imagen tomográfica como la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o la tomografía por emisión de positrones (PET) para mejorar la visualización. La selección y el uso de estos detectores de radiaciones están al alcance de cualquier experto en la materia. Así, una cantidad de diagnóstico por imagen de un compuesto o composición de la presente invención a administrar puede seleccionarse en una cantidad suficiente para producir una imagen diagnóstica de un órgano u otro lugar del sujeto como se ha descrito anteriormente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición de la presente invención a administrar puede seleccionarse en una cantidad suficiente como para producir un efecto radioterapéutico deseado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de al menos uno de los compuestos de la presente invención, que permitirá una localización tumoral suficiente del complejo para detener y/o disminuir el crecimiento o tamaño del tumor. Como se indica en el presente documento, el crecimiento o tamaño del tumor se puede monitorizar utilizando los métodos de la presente invención o cualquier otro procedimiento de diagnóstico por imagen conocido.

Evidentemente, la actividad específica del radionucleido metálico elegido, por ejemplo ^{99m}Tc , $^{186/188}\text{Re}$, $^{111}\text{In}^{+3}$, $^{67/68}\text{Ga}^{+3}$, $^{90}\text{Y}^{+3}$, $^{109}\text{Pd}^{+2}$, $^{105}\text{Rh}^{+3}$, ^{177}Lu , $^{64/67}\text{Cu}$, ^{166}Ho , ^{213}Bi , preferentemente ^{99m}Tc o $^{186/188}\text{Re}$, se tendrá en cuenta a la hora de determinar una dosis para el diagnóstico por imagen o la terapia con radionucleidos.

Generalmente, la dosis unitaria a administrar tiene una radiactividad de aproximadamente 0,01 mCi a aproximadamente 300 mCi, preferiblemente de 10 mCi a aproximadamente 200 mCi. Para una solución inyectable, la dosis unitaria preferida es de 0,01 mL a 10 mL aproximadamente. Tras, por ejemplo, la administración intravenosa, la obtención de imágenes del órgano o tumor in vivo puede tener lugar, si se desea, desde minutos hasta horas o incluso más tiempo, después de que el reactivo radiomarcado se haya administrado a un sujeto. Típicamente, una cantidad suficiente de la dosis administrada se acumulará en el área objetivo para ser visualizada en aproximadamente 1-4 horas.

Los compuestos y/o composiciones de la presente invención pueden administrarse por una vía apropiada, tal como parenteral (por ejemplo, intravenosa), intramuscular o intraperitoneal, o por cualquier otro método adecuado. Por ejemplo, los compuestos y/o composiciones de esta invención pueden administrarse a un sujeto mediante inyección intravenosa en bolo o infusión lenta. Las formas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles de los compuestos y/o composiciones de la presente invención mencionados anteriormente.

Los compuestos o composiciones farmacéuticas son preferiblemente estériles. La esterilización puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica reconocida, incluyendo, pero sin limitarse a, la adición de agentes antibacterianos o antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares.

Los compuestos y/o composiciones de la invención también pueden utilizarse para la detección in vitro de una

célula que exprese el receptor de folato en una biopsia de tejido tomada de un sujeto. Así, en una realización adicional, la presente invención proporciona un método para la detección in vitro de una célula que expresa el receptor de folato, por ejemplo, una célula tumoral, en una muestra de tejido que incluye el contacto de dicha muestra de tejido con un compuesto o composición de la presente invención en cantidades efectivas y durante el tiempo y las condiciones suficientes para permitir que se produzca la unión y la detección de tal unión mediante técnicas de imágenes, tal como por ejemplo, mediante imágenes PET.

Las muestras pueden recogerse por procedimientos conocidos por el experto, por ejemplo, recogiendo una biopsia de tejido o un fluido corporal, aspirando muestras traqueales o pulmonares y similares.

Las muestras de tejido que se analizarán incluyen cualquier tejido sospechoso de contener una célula que exprese un receptor de folato, tal como células tumorales, epiteliales, renales, gastrointestinales o del sistema hepatobiliar, y otras. Las muestras pueden seccionarse, por ejemplo, con un micrótopo, para facilitar el examen microscópico y la observación del complejo ligado. Las muestras también pueden fijarse con un fijador apropiado antes o después de la incubación con uno de los compuestos o composiciones de la presente invención para mejorar la calidad histológica de los tejidos de la muestra.

El tiempo y las condiciones suficientes para la unión de un complejo de la presente invención a un receptor de folato en la célula incluyen condiciones estándar de cultivo de tejidos, es decir, las muestras pueden cultivarse in vitro e incubarse con uno de los compuestos o composiciones de la presente invención en medios fisiológicos. Tales condiciones son bien conocidas por el experto. Alternativamente, las muestras pueden fijarse y luego incubarse con un complejo o composición de la presente invención en un tampón isotónico o fisiológico.

Una cantidad típica de dicho complejo de la presente invención para la detección in vitro de una célula tumoral puede oscilar entre aproximadamente 1 ng/l y aproximadamente 1000 pg/l. Una cantidad preferida es de aproximadamente 1 µg/l a aproximadamente 100 pg/l. Los compuestos preferidos de la invención, en los que la fracción de formación de imágenes es un radionucleido metálico quelado M_1 que se utilizará para el diagnóstico in vitro de una célula tumoral, son los mismos que para las aplicaciones in vivo e incluyen ^{99m}Tc , $^{186/188}\text{Re}$, $^{111}\text{In}^{+3}$, $^{67/68}\text{Ga}^{+3}$, $^{90}\text{Y}^{+3}$, $^{109}\text{Pd}^{+2}$, $^{105}\text{Rh}^{+3}$, ^{177}Lu , $^{64/67}\text{Cu}$, ^{161}Tb , ^{213}Bi , preferentemente ^{177}Lu , ^{161}Tb , ^{213}Bi o ^{111}In .

Para la detección de la unión celular de uno de los presentes compuestos, las muestras pueden incubarse en presencia de un compuesto seleccionado, luego lavarse y contarse en un contador de centelleos estándar. Existen métodos alternativos conocidos por los expertos.

Se entiende que los métodos anteriores de la invención pueden realizarse en combinación con cualquier otro método de diagnóstico o terapia del cáncer, incluidos los métodos que utilizan otros agentes diagnósticos y/o terapéuticos ya desarrollados y que utilizan la tomografía computarizada (CT) por rayos X, la resonancia magnética (MR), la resonancia magnética funcional (fMRI), la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), la imagen óptica y el ultrasonido.

Para aplicaciones de diagnóstico o terapia con radionúclidos puede ser conveniente preparar los compuestos de la presente invención en el lugar donde se van a utilizar, o cerca de él. Así, la presente invención proporciona en un aspecto adicional un kit de uno o varios viales que contiene todos los componentes necesarios para preparar los compuestos o composiciones de esta invención, además del propio ion metálico de radioimagen. Así, un kit preferido de un solo vial de la presente invención comprende un compuesto de la presente invención, y una fuente de un agente reductor farmacéuticamente aceptable tal como una sal estañosa. Además, el kit comprende opcionalmente otros aditivos, por ejemplo, el kit está tamponado con un ácido o base farmacéuticamente aceptable para ajustar el pH a un valor deseado para la formación del complejo. Dicho kit de vial único puede contener opcionalmente ligandos de intercambio, tal como glucoheptonato, gluconato, manitol, maleato, ácido cítrico o tartárico, y también puede contener modificadores de la reacción, tal como ácido dietilentiainopentaacético o ácido etilendiaminotetraacético. Pueden emplearse aditivos adicionales, tal como solubilizantes (por ejemplo, una ciclodextrina), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico) y/o rellenos (por ejemplo, NaCl) para mejorar la pureza radioquímica y la estabilidad del producto final, o para ayudar en la producción del kit. El radionucleido, por ejemplo Lu, Tb, Bi o In, se agregará preferentemente por separado en forma de solución.

Asimismo, un kit multivial preferido de la presente invención comprende, en un vial, los componentes, distintos del propio radionucleido, necesarios para formar un complejo de radionucleido lábil, es decir, un ligando de intercambio y un agente reductor farmacéuticamente aceptable, tal como una sal de estaño. Un compuesto de la presente invención está contenido en un segundo vial, así como aditivos opcionales tales como tampones apropiados para ajustar el pH a su valor óptimo. Opcionalmente, el radionucleido se proporcionará en forma de solución para ser agregado.

Todos los componentes de un kit pueden estar en forma líquida, congelada o seca. En una realización preferida, los componentes del kit se suministran en forma liofilizada.

Todos los compuestos, composiciones y/o métodos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden

fabricarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Será evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a la presente invención sin apartarse del alcance de la misma. Los Ejemplos proporcionados en el presente documento pretenden ser ilustrativos y no exhaustivos; por lo tanto, los Ejemplos ilustrados no deben considerarse como limitativos de la invención en modo alguno.

Ejemplos

Materiales y métodos

Todos los productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich o Fluka, Buchs, Suiza. Todos los productos químicos y disolventes eran de grado reactivo y se utilizaron sin más purificación, a menos que se indique lo contrario. Los aminoácidos protegidos con Boc se adquirieron a Bachem AG, Bubendorf, Suiza. El precursor del ácido pterico fue una amable donación de Merck Eprova AG, Schaffhausen, Suiza, y el DOTA-azida y el DOTA-NHS-éster se recibieron de Macrocyclics, Dallas, EE.UU.. [Na] [$^{99m}\text{TcO}_4$] se eluyó de un generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Mallinckrodt-Tyco, Petten, Países Bajos) con una solución salina al 0,9 %. [Na] [$^{99m}\text{TcO}_4$] se recibió de Mallinckrodt-Tyco, Petten, Países Bajos y $^{177}\text{LuCl}_3$ se recibió de Nuclear Research and Consultancy Group, NRG, Petten, Países Bajos.

Las reacciones se controlaron por HPLC o por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando láminas de aluminio precubiertas de gel de sílice 60 F254 (Merck), y se visualizaron por absorción UV o se tiñeron con una solución de ninhidrina en EtOH (0,2 g en 100 ml). La cromatografía en columna se realizó con gel de sílice 60 (Fluka; tamaño de partícula 0,04-0,063 mm). La HPLC analítica se realizó utilizando un sistema Merck-Hitachi L-7000 equipado con un detector de absorción sintonizable L-7400 y una columna de fase inversa XBridge™ C-18 (5 μm , 4,6 $\times$ 150 mm, Waters). Los disolventes de HPLC fueron agua con 0,1 % de TFA (disolvente A) y MeCN (disolvente B), o 0,1 % de TFA en agua (disolvente A) y MeOH (disolvente B) con un caudal de 1 mL/min. El gradiente fue el siguiente: 0-15 min: gradiente de 95 % A a 20 % A. Las columnas Sep-PakR (Waters) se lavaron con metanol y agua antes de su uso. La radio-HPLC analítica se realizó en un sistema Merck-Hitachi L-2130 equipado con un detector de matriz de diodos L-2450 y un radiodetector Berthold con una columna de fase inversa (Gemini C18, 5 μm , 4,6 $\times$ 250 mm, Phenomenex) utilizando NH_4HCO_3 0,05 M (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) como sistema disolvente con un gradiente de 0 - 15 min 80 % A, 15 - 20 min 80 - 30 % A, 20 - 25 min 30 % A y un caudal de 1 mL/min. La radio-HPLC semipreparativa se realizó en un sistema HPLC equipado con una bomba Smartline 1000, un Smartline Manager 5000, un detector UV Smartline 2500 (Knauer) y un radiodetector GabiStar (Raytest) utilizando una columna semipreparativa de fase inversa (Gemini C18, 5 μm , 250 $\times$ 10 mm, Phenomenex) a un caudal de 4 mL/min con NH_4HCO_3 0,05 M (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) como sistema disolvente y un gradiente como el siguiente: 0 - 20 min 80 % A, 20 - 25 min 80 - 30 % A, 25 - 30 min 30 % A.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se registraron en un espectrómetro Bruker de 400 MHz. Los desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C se indicaron en relación con los picos del disolvente residual o el agua como referencia. Los valores de la constante de acoplamiento J se indicaron en hercios (Hz). Para la descripción de los espectros ^1H -NMR se utilizan las siguientes abreviaturas: singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), multiplete (m). Los desplazamientos químicos de los multipletes complejos se indican como el intervalo de su aparición. Los espectros de masas de baja resolución se registraron con una LC-ESI Quattro micro™ API de Micromass utilizando el modo de ionización negativo o positivo. Los espectros de masas de alta resolución se registraron con un Bruker FTMS 4.7T BioAPEXII.

Cultivo celular: Las células KB (línea celular de carcinoma nasofaríngeo humano) se adquirieron en la American Type Culture Collection (CCL-17). Las células JK24-FBP fueron un amable obsequio del Dr. Patrick Hwu (Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, MD). Las células se cultivaron en monocapa a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO_2 . Es importante destacar que las células se cultivaron en un medio de cultivo celular RPMI especial denominado en el presente documento FFRPMI (medio RPMI 1640 modificado, sin ácido fólico, vitamina B12 ni rojo fenol; Cell Culture Technologies GmbH). El medio FFRPMI se complementó con un 10 % de suero fetal de ternera inactivado por calor (FCS, tal como única fuente de folato), L-glutamina y antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fungizona 0,25 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Entre dieciocho y veinte horas antes de cada experimento, las células se sembraron en placas de 12 pocillos (7 $\times 10^5$ células/2 ml) para formar monocapas confluentes durante la noche.

Estudios de captación e internalización: Los estudios de unión a receptores se realizaron de acuerdo con el siguiente procedimiento general: Las monocapas de células se enjuagaron con PBS pH 7,4. En los pocillos correspondientes se agregó medio FFRPMI puro (sin FCS, L-glutamina ni antibióticos, 975 μl) solamente, medio FFRPMI (475 μl) y una solución de ácido fólico para estudios de bloqueo de receptores (500 μl , 200 μM en medio) o medio FFRPMI con un 4 % de BSA. Las placas de pocillos se preincubaron a 37 °C durante 15 min. Se agregaron a cada pocillo soluciones de los compuestos 16 o 6 (25 μl , 1,5 Mbq/ml) marcados con ^{67}Ga . Las placas se incubaron a 37 °C durante un máximo de 4 h. A continuación, cada pocillo se enjuagó dos veces con tampón PBS pH 7,4 o una vez con PBS pH 7,4 y una vez con un tampón de eliminación ácido (solución acuosa de ácido acético 0,1 M y NaCl 0,15 M), respectivamente, para eliminar el complejo unido de la FR en la superficie celular. Las monocapas se disolvieron en 1 ml de NaOH (1M) y se transfirieron a tubos de 4 ml. Las muestras, así como 4 muestras estándar (25 μl marcadas con ^{67}Ga -16 o ^{67}Ga -6) se contaron para radiactividad utilizando un contador y

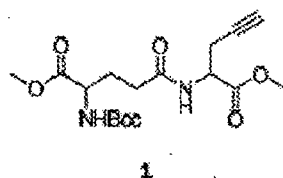
Cobra™ II. La concentración de proteínas se determinó para cada muestra con el fin de normalizar la radiactividad medida de las muestras con respecto al contenido medio de proteínas de la muestra que representaba 0,5 mg o 0,3 mg (según se indica en los resultados) de proteínas por pocillo (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay, Product #23225).

Estudios de unión a la albúmina: Los estudios de unión a albúmina mediante HPLC y una columna de exclusión por tamaño Superose™ 12 se realizaron de acuerdo con el siguiente procedimiento general: Los compuestos 16 y 6 se marcaron radiactivamente según el protocolo descrito anteriormente. Se inyectaron muestras de 1 MBq en la columna, utilizando tweenR 20 al 0,05 % en PBS pH 7,4 como eluyente. Los compuestos radiactivos ⁶⁷Ga-16 y ⁶⁷Ga-6 (12 µl, aproximadamente 1 MBq) se incubaron durante 30 min a 37 °C con solución de HSA al 20 % (100 µl) o plasma humano (100 µl). Se inyectó un volumen de 100 µl de la solución incubada en la columna de exclusión por tamaño Superose™ 12. La elución de las proteínas plasmáticas y del compuesto radiomarcado se controló mediante HPLC en la traza UV (220 nm) y en la traza γ radiactiva, respectivamente. Los estudios de unión a la albúmina mediante dispositivos de ultracentrifugación se realizaron de acuerdo con el siguiente procedimiento general⁸³: Los compuestos 16, 6, FA2, FA4 y 22 radiomarcados y purificados por HPLC (2,5-3,0 66 MBq) se incubaron durante 10 min a 37 °C con 350 µl de plasma humano o 350 µl de 1x PBS, pH 7,4. Las muestras se cargaron en el ultrafiltro (CentrifreeR, Ultracel YMT de Millian, Ginebra) y se centrifugaron durante 35 min a 2000 rpm. Se contó la radiactividad del filtrado (3 × 25 µl) y de la solución incubada inicialmente (3 × 25 µl, - patrón) utilizando un contador γ Cobra™ II. Para la estandarización, se indicó que el filtrado de los compuestos en PBS era del 100 %. Esta fracción al 100 % se comparó con la fracción de compuesto activo encontrada en el filtrado de la muestra de plasma y la actividad de la muestra de plasma se expresó en % de la actividad en el filtrado de PBS.

Autorradiografía in vitro: Los portaobjetos con secciones de tejido de ratón (xenografías de tumores KB y riñones) se preincubaron en tampón Tris-HCl (170 mM, pH 7,6, con MgCl₂ 5 mM) con 0,25 % (p/v) de BSA durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se incubaron con una solución de ⁶⁷Ga-16 y ⁶⁷Ga-6 (0,5 MBq/ml en tampón Tris-HCl con 1 % de BSA) durante 60 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, las secciones se lavaron dos veces durante 5 minutos en tampón Tris-HCl frío (con un 25 % de BSA), después se lavaron durante 5 minutos en tampón Tris-HCl puro y, por último, se lavaron con agua destilada fría. Las secciones se secaron al aire y se expusieron a pantallas de imagen de fósforo.

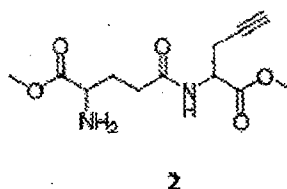
Ejemplo 1: Síntesis del conjugado trifuncional 16

(a)



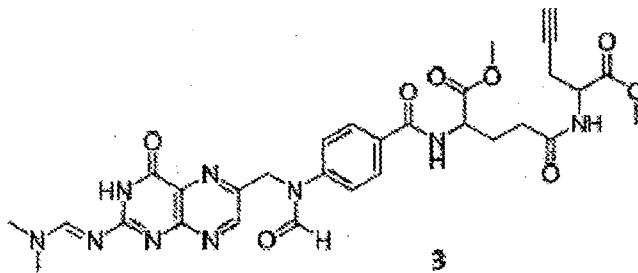
Se disolvió Boc-Glu-OMe (181,5 mg, 0,65 mmol) en DMF (1,5 ml), se agregó HBTU (314,2 mg, 0,83 mmol, 1,2 eq.) y NEt₃ (2 eq.). La solución se agitó a 0 °C durante 1 h. La solución se agregó a H-Pra-OMe-HCl (120,2 mg, 0,74 mmol, 1,06 eq.) en DMF (2 ml) y NEt₃ (4 eq.). La suspensión se agitó durante la noche, 0 °C → RT. Se agregó MeOH para disolver las partículas restantes. La solución se agitó a 0 °C durante 3 h. El producto se extrajo con ácido cítrico (1 M) y acetato de etilo. La fase orgánica se enjuagó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. La purificación se realizó por CC (SiO₂, MeOH/CH₂Cl₂ 1:50) para dar un aceite claro. 233 mg (0,63 mmol, 90 %). LC-MS [M-C₅H₇O₂(Boc)]H⁺ = 270,87 (calc. para C₁₇H₂₆N₂O₇, 370,17). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8,3, 7,17, 4,36-3,31, 3,92-3,87, 3,57, 3,55, 3,24, 2,8, 2,52, 2,15, 1,87-1,79/1,72-1,62, 1,3 ppm.

(b)



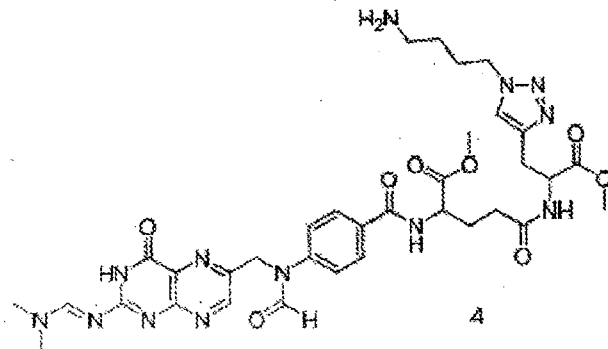
1 (233 mg, 0,63 mmol) se disolvió en TFA (10 % en CH₂Cl₂). La solución se agitó a RT durante 3 h. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se consiguió por CC (SiO₂, MeOH/CH₂Cl₂ 1:30) para dar la sal TFA como sólido claro. 224 mg (0,58 mmol, 92 %). LC-MS [M+H]⁺ = 270,84 (calc. para C₁₂H₁₈N₂O₅, 270,12). ¹H-NMR (MeOH-d₄) δ 7,98, 4,58, 4,10, 3,85, 3,74, 2,82, 2,71, 2,54, 2,19.

(c)



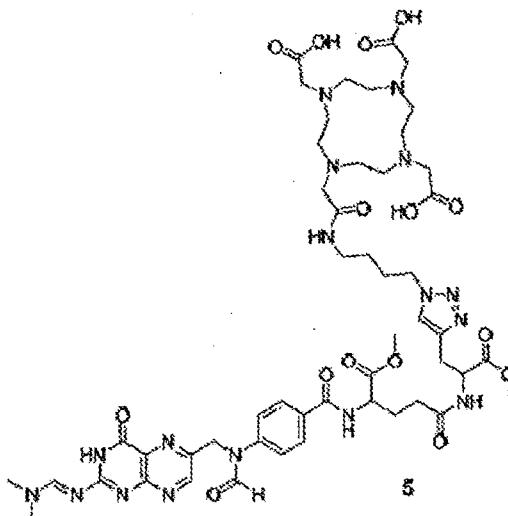
El ácido ptericoico (166,9 mg, 0,41 mmol, 1,04 eq.) se disolvió en DMF (3 ml). Se agregaron HBTU (208,9 mg, 0,55 mmol, 1,4 eq.) y NEt_3 (2 eq.). La solución se agitó a 0 °C durante 1,5 h. La solución se agregó a 2 (105,2 mg, 0,39 mmol, 1 eq.) en DMF (2 ml) y NEt_3 (2 eq.). La solución se agitó a RT a 0° C durante 4 h. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se realizó por CC (SiO_2 , $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:20) para dar un polvo amarillo. 90 mg (0,14 mmol, 36 %). LC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 647,93$ (calc. para $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_9\text{O}_8$, 647,25).

(d)



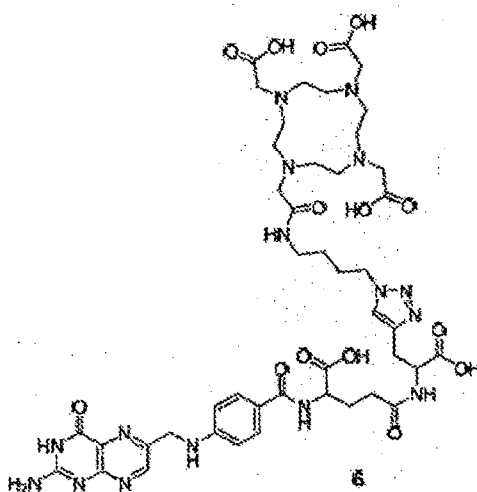
3 (22,88 mg, 35 pmol) y 4-azidobutyl-1-amina-TFA (27,7 mg, 0,12 mmol, 3,4 eq.) se mezclaron en 3:1 $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1,1 ml). Se agregaron gota a gota $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (31 μl , de una solución madre 100 mM, 0,1 eq.) y ascorbato de Na (1,5 mg, de una solución madre 100 mM, 0,2 eq.). La solución se agitó a RT durante varias h. Una parte del disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se logró mediante HPLC semipreparativa utilizando TFA al 0,1 % en H_2O y acetonitrilo como eluyente para dar un polvo amarillo. 8,64 mg (11,3 μmol , 32 %). LC-MS $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$ (grupo protector dimetilformamida)] $^+ = 706,95$ (calc. para $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_{13}\text{O}_8$, 761,34).

(e)



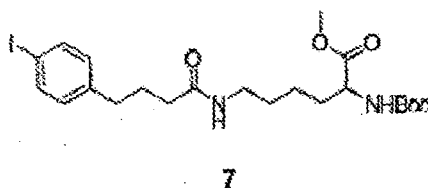
4 (8,64 mg, 11,3 pmol) y NHS-DOTA- PF_6 (8,05 mg, 12,4 μmol , 1,1 eq.) se disolvieron en una mezcla de DMF (0,4 ml), y DIPEA (4 eq.). La reacción se agitó a 40 °C durante varias h. La reacción se forzó hasta su finalización agregando más NHS-DOTA PF_6 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se utilizó sin más purificación. LC-MS $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$ (grupo protector dimetilformamida)] $^+ = 1093,02$ (calc. para $\text{C}_{50}\text{H}_{69}\text{N}_{17}\text{O}_{15}$, 1147,52).

(f)



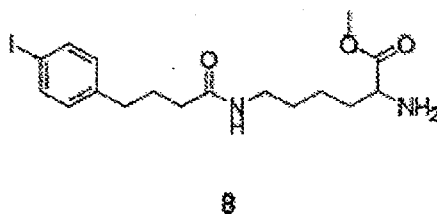
- 5 5 se disolvió en una mezcla 1:1 de MeOH /H₂O y se ajustó a pH 13 utilizando NaOH (1M). La solución se agitó a RT durante 2 h. El disolvente se evaporó a presión reducida. El sólido resultante se redisolvió en H₂O y la solución se neutralizó con HCl (1M). La purificación final se logró mediante extracción en fase sólida utilizando una columna SepPak de fase inversa con H₂O y concentraciones crecientes de MeOH como eluyente. Parte del disolvente se evaporó a presión reducida. El compuesto se liofilizó para dar un polvo amarillo brillante. 4,1 mg (3,95 μmol, 35 %). LC-MS [M+Na]⁺ = 1059,44, (calc. para C₄₄H₆₀N₁₆O₁₄, 1036,45).

(g)



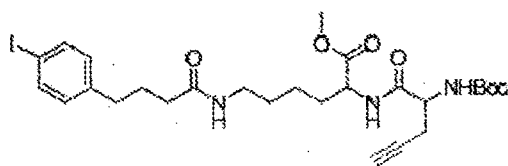
- 15 El ácido 4-p-yodofenil-butírico (502 mg, 1,7 mmol, 1,07 eq.) se disolvió en DMF (1,5 ml) y NEt₃ (2 eq.). Se agregó HBTU (751 mg, 1,98 mmol, 1,23 eq.). La solución se agitó a 0 °C durante 1 h. La solución se agregó gota a gota a Boc-Lys-OMe (428 mg, 1,6 mmol) en DMF (1,5 ml) y NEt₃ (2 eq.). La solución se agitó a 0 °C durante 4 h. El producto se extrajo con ácido cítrico (1 M) y acetato de etilo/n-Hexano (9:1). La fase orgánica se enjuagó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. La purificación se realizó por CC (SiO₂, MeOH/CH₂Cl₂ 1:50) para dar un aceite claro. 653,5 mg (1,23 mmol, 75 %). LC-MS [M+H]⁺ = 532,77 (calc. para C₂₂H₃₃IN₂O₅, 532,14). ¹H-NMR (MeOH-d₄) δ 7,59, 6,98, 4,09, 3,69, 3,15, 2,59, 2,29, 2,18, 1,88, 1,78/1,64, 1,51, 1,42 ppm.

(h)



- 25 7 (568,5 mg, 1,07 mmol) se desprotegió con TFA 10 % en CH₂Cl₂ a RT durante 2 h. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se consiguió por CC (SiO₂, MeOH/CH₂Cl₂ 1:30) para dar la sal TFA como alquitrán ligeramente amarillo. 478,9 mg (0,88 mmol, 82 %). LC-MS [M+H]⁺ = 432,94, (calc. para C₁₇H₂₅IN₂O₃, 432,09). ¹H-NMR (MeOH-d₄) δ 7,60, 6,99, 3,96, 3,80, 3,17, 2,58, 2:19, 1,88, 1,53, 1,4 ppm.

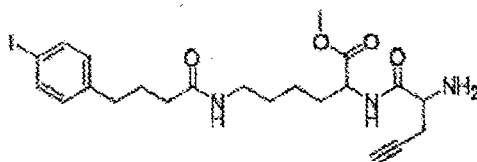
(i)



9

Boc-Pra-OH (50,7 mg, 0,24 mmol, 1,06 eq.) se disolvió en DMF (1 ml) y NEt_3 (1,8 eq.). Se agregó HBTU (101,4 mg, 0,27 mmol, 1,2 eq.). La solución se agitó a 0 °C durante 1 h. La solución se agregó gota a gota a 8 TFA (122,6 mg, 0,224 mmol) en DMF (1,5 ml) y NEt_3 (1,8 eq.). La solución se agitó a RT a 0° C durante 4 h. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se realizó por CC (SiO_2 , primero CH_2Cl_2 , después $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:50) para dar un aceite amarillo. 125 mg (0,2 mmol, 89 %). LC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 627,86$ (calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{IN}_3\text{O}_6$, 627,18). $^1\text{H-NMR}$ (MeOH-d_4) δ 7,98, 6,99, 4,42, 4,25, 3,69, 3,15, 2,68/2,63, 2,58, 2,38, 2,18, 1,87, 1,72, 1,45, 1,45 ppm.

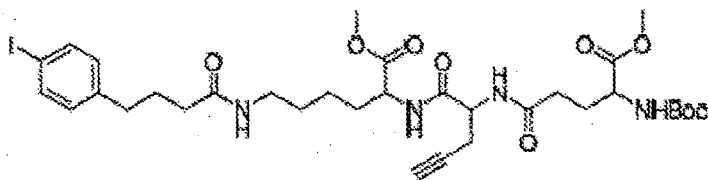
(j)



10

9 (122,2 mg, 0,195 mmol) se desprotegió con TFA al 10 % en CH_2Cl_2 (10 ml). El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se consiguió por CC (SiO_2 , primero $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:30, después $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:20) para dar la sal TFA como un aceite amarillo. 92,5 mg (0,144 mmol, 74 %). LC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 527,87$ (calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{IN}_3\text{O}_4$, 527,13). $^1\text{H-NMR}$ (MeOH-d_4) δ 7,6, 6,99, 4,45, 3,7, 3,59, 3,15, 2,59, 2,44, 1,28, 1,88, 1,76, 1,51, 1,41 ppm.

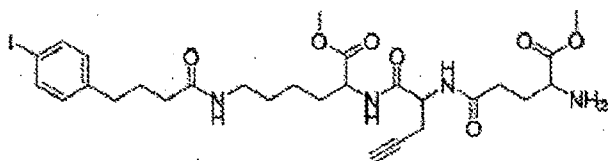
(k)



11

Boc-Glu-OMe (38,9 mg, 0,149 mmol, 1,01 eq.) se disolvió en DMF (1 ml) y NEt_3 (2 eq.). Se agregó HBTU (60,2 mg, 0,159 mmol, 1,08 eq.). La solución se agitó a 0 °C durante 1 h. La solución se agregó a 10 TFA (90 mg, 0,147 mmol) en DMF (1,5 ml) y NEt_3 (2 eq.). La reacción se agitó a 0 °C durante 3 h y se almacenó 48 h a 5 °C. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se realizó por CC (SiO_2 , $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:20) para dar un aceite claro. 53,9 mg (0,07 mmol, 48 %). LC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 771,02$ (calc. para $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{IN}_4\text{O}_9$, 770,24). $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$) δ 7,55, 7,45, 6,92, 4,49, 4,42, 4,17, 3,70, 3,68, 3,12, 2,63, 2,55, 2,14, 1,84, 1,68, 1,45, 1,40, 1,32 ppm.

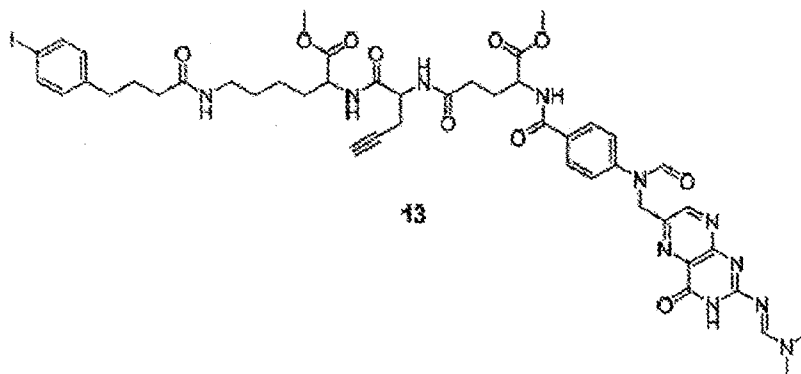
(l)



12

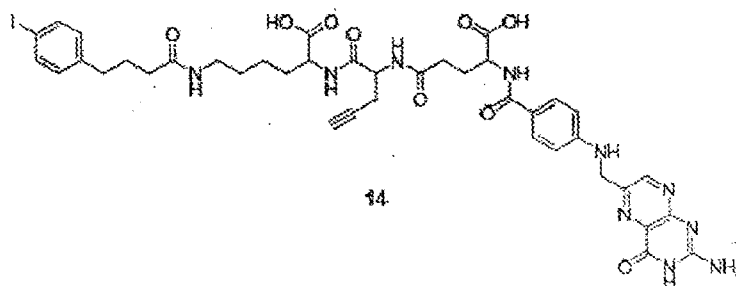
11 (319 mg, 0,414 mmol) se desprotegió con TFA al 10 % en CH_2Cl_2 (10 ml). El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se consiguió por CC (SiO_2 , primero CH_2Cl_2 , después $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:20) para dar la múltiple sal TFA como un aceite claro. 331,5 mg. LC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 670,96$ (calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_7$, 670,19). ^1H -NMR ($\text{MeOH}-d_4$) δ 7,6, 6,99, 4,58-4,50, 4,4, 3,86, 3,79, 3,69, 3,20-3,09, 2,73- 2,62, 2,47, 2,43-2,41, 2,18, 2,14-2,0, 1,93-1,81, 1,76-1,67, 1,53-1,46, 1,43-1,34, 1,33-1,25, 1,18 ppm.

(m)



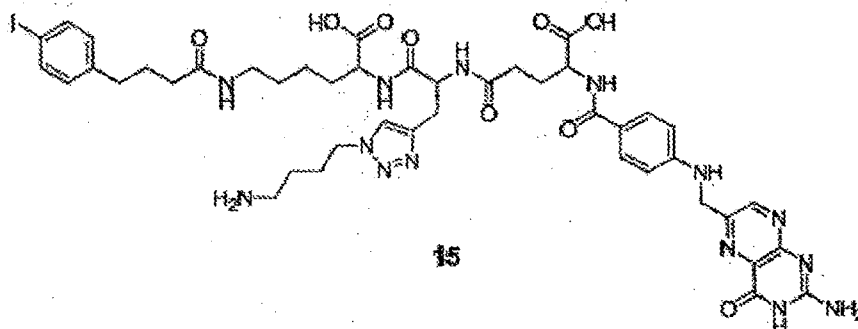
Ácido ptéico (167,6 mg, 0,41 mmol, 1,05 eq.) se disolvió en DMF (1 ml) y NEt_3 (2 eq.). Se agregó HBTU (177,9 mg, 0,47 mmol, 1,2 eq.). La solución se agitó a 0 °C durante 1 h. La solución se agregó a 12 TFA (305,5 mg, 0,39 mmol, 1,0 eq.) en DMF (1,5 ml) y NEt_3 (2 eq.). La reacción se agitó a RT a 0° C durante 4 h. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se realizó por CC (SiO_2 , primero CH_2Cl_2 , después $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:10) para dar un sólido amarillo. 178,4 mg (0,17 mmol, 44 %).

(n)



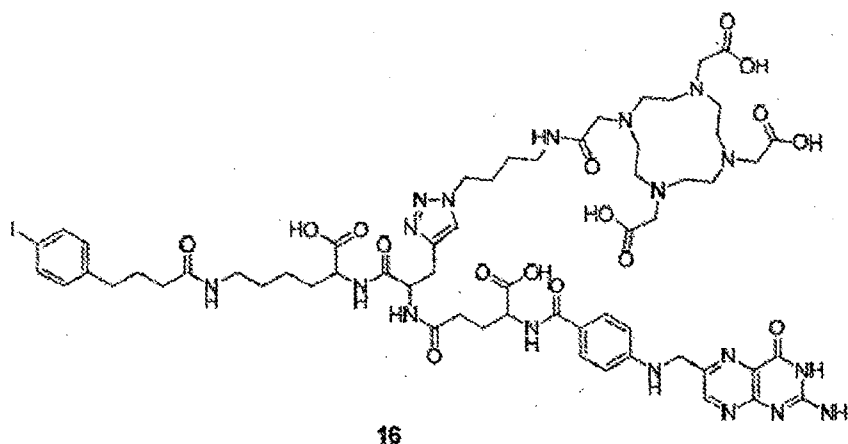
13 (178,4 mg, 0,17 mmol) se desprotegió en MeOH/NaOH (aq.) pH 12,8 (10 ml) durante la noche a RT. La purificación se logró mediante extracción en fase sólida utilizando una columna SepPak de fase inversa, elución con H_2O y cantidades crecientes de MeOH y NaOH (ac.). 211,36 mg (0,23 mmol). LC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 936,93$ (calc. para $\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{N}_{10}\text{O}_9$, 936,24).

(o)

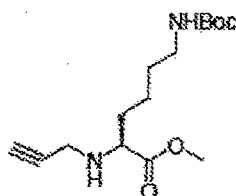


14 (21,9 mg, 23,4 μmol) y 4-azidobutyl-1-amina TFA (5,24 mg, 4,7 μmol , 2 eq.) se mezclaron en 1:1 tBuOH/H₂O (1,2 ml). Se agregaron gota a gota Cu(OAc)₂·H₂O (0,43 mg, de una solución madre 100 mM, 0,1 eq.) y ascorbato de Na (0,93 mg, de una solución madre 100 mM, 0,2 eq.). La solución se agitó durante la noche a RT y a 50 °C durante algunas h. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se logró mediante extracción en fase sólida utilizando una columna SepPak de fase inversa, elución con H₂O, EDTA ligeramente básico y cantidades crecientes de MeOH y NaOH (ac.). 10,58 mg (10,1 μmol , 43 %). LC-MS [M+H]⁺ = 1050,95 (calc. para C₄₄H₅₅IN₁₄O₉, 1050,33).

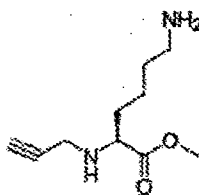
(p)



15 (10,58 mg, 10,1 μmol) y NHS-DOTA-PF₆ (9,7 mg, 15,0 μmol , 1,5 eq.) se disolvieron en DMF (1 ml), y DIPEA (2,03 eq.). La reacción se agitó a 40° C durante varias h. El disolvente se eliminó a presión reducida. El sólido se volvió a disolver en agua básica y precipitó en ácido. El precipitado se centrifugó y se secó al vacío para obtener un polvo amarillo. 6,7 mg (4,7 μmol , 46 %). LC-MS [M+H]⁺ = 1437,76 (calc. para C₆₀H₈₁IN₁₈O₁₆, 1436,51).



H-Lys-(Boc)OMe-HCl (291,9 mg, 0,98 mmol), 3-Bromo-1-propino (80 % en Tolueno, 110,85 μl , 1,16 mmol, 1,2 eq.) y Cs₂CO₃ (643 mg, 2,0 mmol, 2,05 eq.) se agitaron en DMF (4,5 ml) a RT y 60 °C durante varias h. La suspensión se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se realizó por CC (SiO₂, primero CH₂Cl₂ puro, después MeOH/CH₂Cl₂ 1:50) para dar un aceite claro. 164,1 mg (0,55 mmol, 56 %). LC-MS [M+H]⁺ = 298,89 (calc. para C₁₅H₂₆N₂O₄, 298,19). ¹H-NMR (CDCl₃-d) δ 7,97, 3,68, 3,38-3,36, 3,35-3,33, 3,05, 2,17, 1,81, 1,72-1,53, 1,48-1,28, 1,39 ppm.

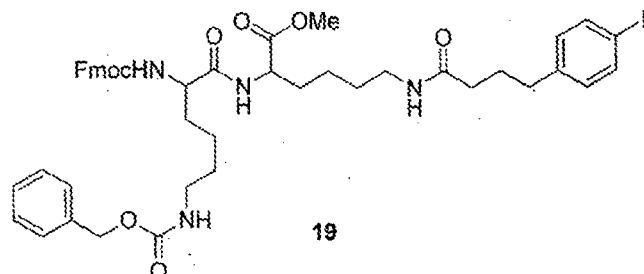


17 (164,1 mg, 0,55 mmol) se desprotegió en TFA al 10 % en CH₂Cl₂ a RT durante 3 h. La purificación se consiguió mediante extracción en fase sólida utilizando una columna SepPak de fase inversa con H₂O como eluyente para dar un aceite claro. 144 mg (0,46 mmol, 84 %). LC-MS [M+H]⁺ = 198,92 (calc. para C₁₀H₁₈N₂O₂, 198,14).

Ejemplo 2: Síntesis del conjugado trifuncional DOTA-Lys 26

(a)

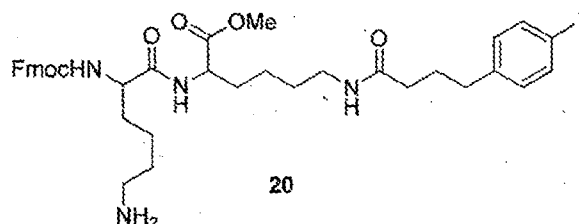
5



10 A 5 g de Fmoc-Lys(Z)-OH (Z = benzoiloxycarbonilo) en 50 ml de DMF abs. se agregaron 2,2 ml de trietilamina y 4,1 g de HBTU (N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)-uronio-hexafluorofosfato). La mezcla se agitó durante 15 min. a 25 °C. A continuación se agregó una mezcla de 4,9 g del compuesto 8 y 2,2 ml de trietilamina en 50 ml de DMF. Tras agitar durante 20 horas, el disolvente se eliminó al vacío y el residuo se disolvió en 50 ml de cloruro de metileno. La solución de cloruro de metileno se lavó dos veces con 30 ml de solución acuosa de ácido cítrico al 5 %, dos veces con 30 ml de solución acuosa de bicarbonato sódico al 5 % y dos veces con 30 ml de agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó hasta sequedad para dar 8,4 g de un residuo ceroso que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando CH₂Cl₂/MeOH 95:5 como eluyente para dar 7,3 g de 19 puro.

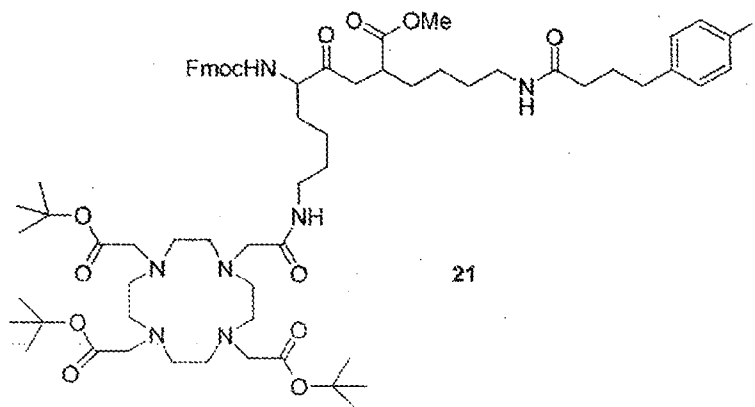
(b)

20



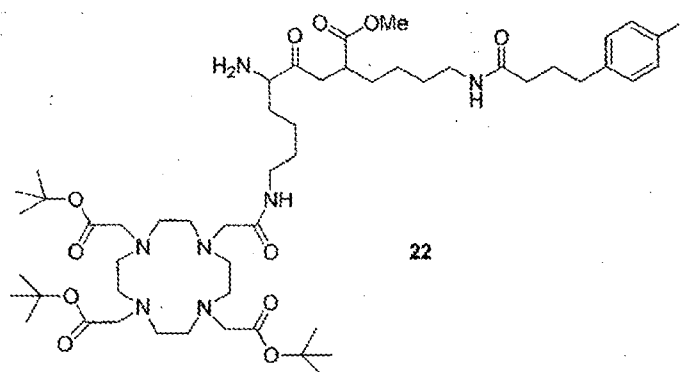
Se disolvieron 5 g del compuesto 19 en 100 ml de metanol y se agregaron 200 mg de Pd/C. La mezcla se hidrogenó a 25 °C utilizando 300 kPa (3 bares) de hidrógeno durante 24 horas. Los sólidos se eliminaron por filtración y el filtrado se evaporó a sequedad para dar el compuesto 20.

25 (c)



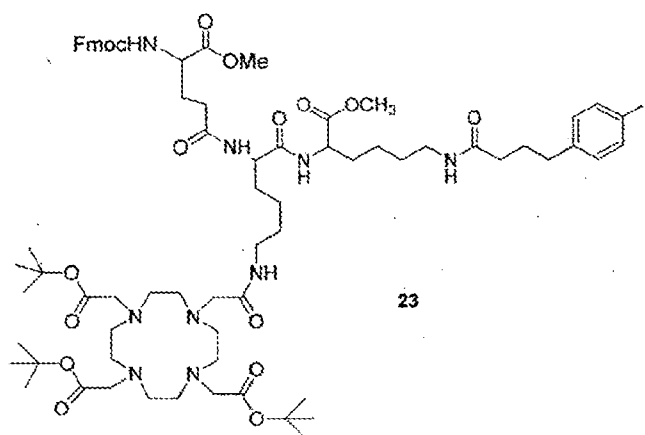
30 El compuesto 20 (1 equivalente) se disolvió en CH₂Cl₂ y se agregó una cantidad equimolar de éster DOTA-NHS (adquirido de Macrocyclics). La mezcla se agitó durante 20 horas a 25 °C. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice para dar 21 puro.

(d)



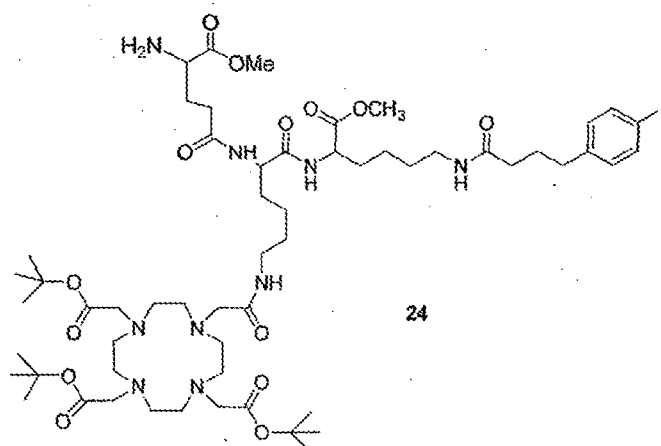
El compuesto 21 (1 equivalente) se disolvió en CH₂Cl₂. Tras agregar 30 equivalentes de dietilamina, la mezcla se agitó durante 20 horas. Tras evaporación a sequedad, el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice para dar 22 puro.

(e)



Fmoc-Glu-OMe (1 equivalente) se disolvió en DMF abs. Después de agregar 2 equivalentes de diisopropiletilamina y 1,1 equivalentes de HBTU (N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)-uronio-hexafluoro-fosfato) la mezcla se agitó durante 15 min. a 25 °C. Después se agregó una solución de 1 equivalente del compuesto 22 en DMF y la mezcla se agitó durante 20 horas. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se disolvió en cloruro de metileno. La solución de cloruro de metileno se lavó dos veces con solución acuosa de ácido cítrico al 5 %, dos veces con solución acuosa de bicarbonato sódico al 5 % y dos veces con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó hasta sequedad para dar un residuo, que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice para dar 23 puro.

(f)

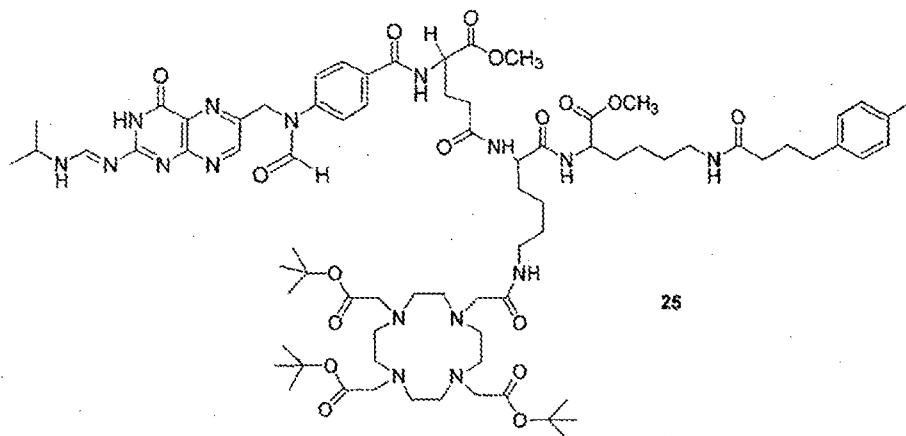


El compuesto 23 (1 equivalente) se disolvió en CH₂Cl₂. Tras agregar 30 equivalentes de dietilamina, la mezcla se

agitó durante 20 horas. Tras evaporación a sequedad, el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice para dar 24 puro.

(g)

5



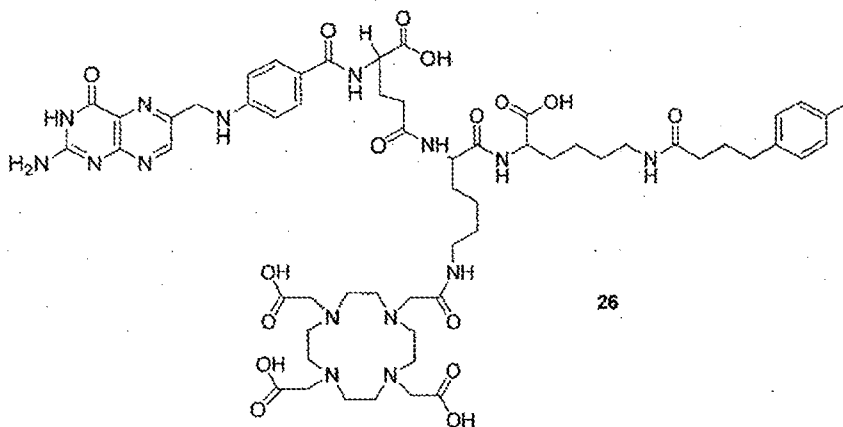
25

El ácido N²-(N,N-dimetilaminometileno)-10-formilpteroico (1 equivalente) se disolvió en DMF abs. Se agregaron 2 equivalentes de trietilamina y 1,2 equivalentes de HBTU (N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)-uronio-hexafluorofosfato) y la mezcla se agitó durante 30 min. A continuación, se agregó una solución del compuesto 24 en abs. Se agregó DMF y la mezcla se agitó durante 20 horas a 25 °C. Tras eliminar el disolvente al vacío, el residuo se disolvió en cloruro de metileno. La solución de cloruro de metileno se lavó dos veces con solución acuosa de ácido cítrico al 5 %, dos veces con solución acuosa de bicarbonato sódico al 5 % y dos veces con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó hasta sequedad para dar un residuo, que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice para dar 25 puro.

10

15

(h)



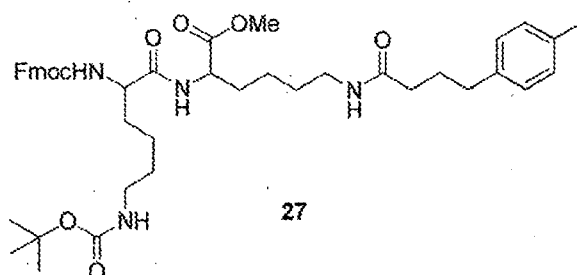
26

El compuesto 25 (1 equivalente) se disolvió en tetrahidrofurano y se agregó una solución acuosa de hidróxido de litio (3 equivalentes) en agua. Tras 4 horas a 25 °C, la mezcla se acidificó a pH=1 mediante la adición de ácido clorhídrico acuoso. Tras calentar a 50 °C durante 2 horas, la mezcla se enfrió a 25 °C y el producto precipitado se aisló por centrifugación.

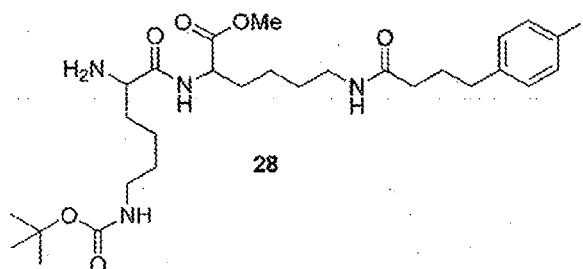
20

25

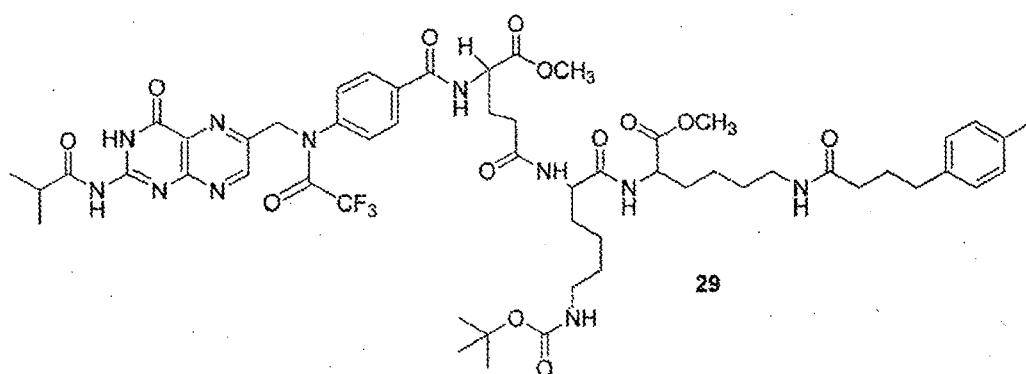
Ejemplo 3: Síntesis alternativa del conjugado trifuncional DOTA-Lys 26



Fmoc-Lys(Boc)-OH (6,4 g, 13,7 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida seca (53 ml). Tras agregar trietilamina (3,75 ml) y HBTU (N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)-uronio-hexafluoro-fosfato, 5,2 g), la solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. Se agregó una mezcla del compuesto 8 (6,4 g, 13,7 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (64 ml) y trietilamina (3,75 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 17 horas a temperatura ambiente. A continuación se extrajeron los sólidos y el filtrado se evaporó al vacío a 40 °C para dar un residuo aceitoso. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (100 ml) y se lavó con ácido cítrico acuoso al 5 % (3 × 50 ml), con hidrogenocarbonato sódico acuoso al 5 % (3 × 50 ml) y con agua (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó a sequedad en vacío a 40 °C para dar el compuesto 27 (7,2 g, rendimiento del 60%) que se utilizó sin más purificación para la síntesis del compuesto 28.

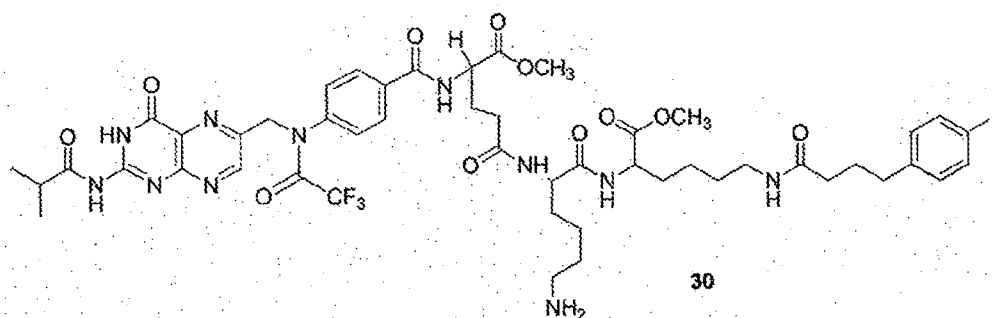


Al compuesto 27 (7,2 g de producto bruto) en cloruro de metileno seco (36 ml) se agregó dietilamina (36 ml). La mezcla se agitó 2 horas a temperatura ambiente y luego se evaporó a sequedad en vacío a 40 °C. A continuación, se agregó al residuo una mezcla de cloruro de metileno/metanol 90:10 (50 ml) y se eliminaron los sólidos. El filtrado se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando SiO₂ (70 g) y cloruro de metileno / metanol 90:10 como eluyente para dar el compuesto 28 (4,1 g, 76 % de rendimiento) como sólido blanco (SiO₂, R_f=0,34 (CH₂Cl₂/MeOH/90:10).

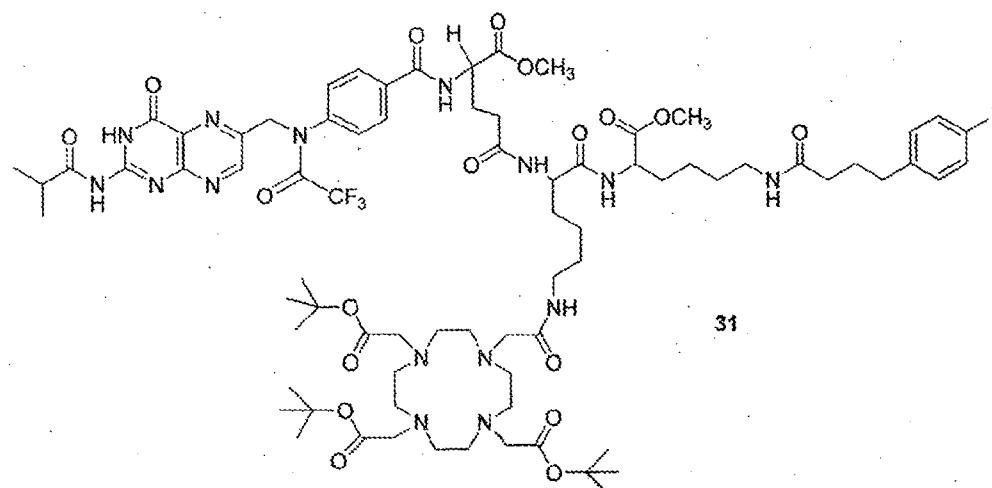


A una solución de N²-isobutiril-10-trifluoroacetil-fólico ácido-α-metiléster (3,4 g, 5,54 mmol, preparada según WO 2009/082606) en N,N-dimetilformamida seca (34 ml) se agregó trietilamina (1,5 ml) y HBTU (N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)-uronio-hexafluoro-fosfato, 2,1 g) y la mezcla se agitó durante 10 min. a temperatura ambiente. A continuación, se agregó una solución del compuesto 28 (3,8 g, 5,8 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (38 ml) y la mezcla se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad en vacío a 40 °C. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (128 ml) y se lavó con ácido cítrico acuoso al 5 % (50 ml), con hidrogenocarbonato sódico acuoso al 5 % (50 ml) y con agua (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó a sequedad en vacío a 40 °C para dar una espuma blanquecina (7,2 g) que se purificó mediante cromatografía en columna usando SiO₂ (210 g) y cloruro de metileno/metanol 93:7 como eluyente para dar una espuma blanquecina, que se purificó una segunda vez mediante cromatografía en columna usando SiO₂ (250 g) y cloruro de metileno/metanol 95:5 como eluyente para dar el compuesto 29 (3,7 g, 53 % de

rendimiento) como una espuma blanquecina, $R_f=0,33$ (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/90:10$).



A una solución del compuesto 29 (3,5 g, mmol) en cloruro de metileno (88 ml) se agregó ácido trifluoroacético (8,8 ml) y triisopropilsilano (0,88 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. y después se evaporó a sequedad en vacío a 40 °C. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando SiO_2 (235 g) y cloruro de metileno/metanol 90:10 como eluyente para dar el compuesto 30 como una espuma blanquecina (2,8 g, 79 % de rendimiento), $R_f=0,16$ (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/90:10$).

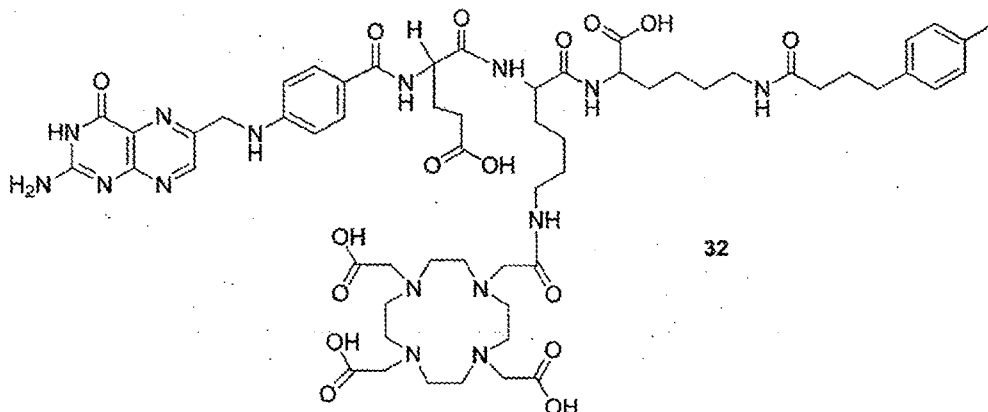


A una solución de DOTA -tris (tBu)éster (224 mg, 0,39 mmol, adquirida a Macrocylics, No. B-260) en N,N-dimetilformamida seca (12,5 ml) se agregó HBTU (N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)-uronio-hexafluorofosfato, 148 mg) y trietilamina (54,2 μl). Tras agitar durante 5 min. a temperatura ambiente, se agregó una solución del compuesto 30 (500 mg, 0,39 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (5 ml) y trietilamina (54,2 μl). La mezcla de reacción se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente y después se evaporó a sequedad en vacío a 40 °C. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (25 ml) y se lavó con ácido cítrico acuoso al 5 % (2x5 ml), con hidrogenocarbonato sódico acuoso al 5 % (2x5 ml) y con agua (2x5 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó a sequedad en vacío a 40 °C para dar una espuma amarilla (0,5 g) que se purificó por cromatografía en columna usando SiO_2 (17 g) y cloruro de metileno/metanol 93:7 como eluyente para dar el compuesto 31 como una espuma blanquecina (0,43 g, 64 % de rendimiento), $R_f=0,45$ (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/90:10$).

El compuesto 26 se obtuvo a partir del compuesto 31 según el procedimiento siguiente: A una solución del compuesto 31 (0,43 g, 0,25 mmol) en cloruro de metileno (20 ml) se agregó ácido trifluoroacético (20 ml) y la solución resultante se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad en vacío a 40 °C y el residuo se disolvió en tetrahidrofurano (20 ml). A continuación se agregó una solución de hidróxido de litio (120 mg) en agua (20 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 horas. El tetrahidrofurano se eliminó a presión reducida a 40 °C y a la solución acuosa residual se agregó ácido clorhídrico 1M acuoso (2,6 ml) hasta pH=3. El producto precipitado se aisló por centrifugación (5000 vueltas por min.) y se lavó con agua (4 x 3 ml). El producto se secó a 40 °C en vacío durante 48 horas para dar el compuesto 26 como un sólido amarillo anaranjado (279 mg, 82 % de rendimiento). HPLC: 97,0 % de área. (5,9 mg de producto se disolvieron en 5 ml de agua y 3 gotas de tampón (4 g de Na_2CO_3 y 4 g de KHCO_3 disueltos en 200 ml de agua), Volumen de inyección: 2 μl , columna: Phenomenex, XB-C18, 75x4,6 mm, 2,6 μm , eluyente A: 0,1 % de ácido trifluoroacético en agua, eluyente B: 0,1 % ácido trifluoroacético acetonitrilo en agua /90:10, flujo: 2,0 ml/min.,

presión: 23000 kPa (230 bar), gradiente: en 20 min. de 0 % de eluyente B a 100 % de eluyente B. Detector UV, longitud de onda 230 nm.). LC-MS: $[M+H]^+ = 1356,8$ (calc. para $C_{57}H_{78}N_{18}O_{16}$, 1355,5)

Ejemplo 4: Síntesis del conjugado trifuncional DOTA-Lys- α 32

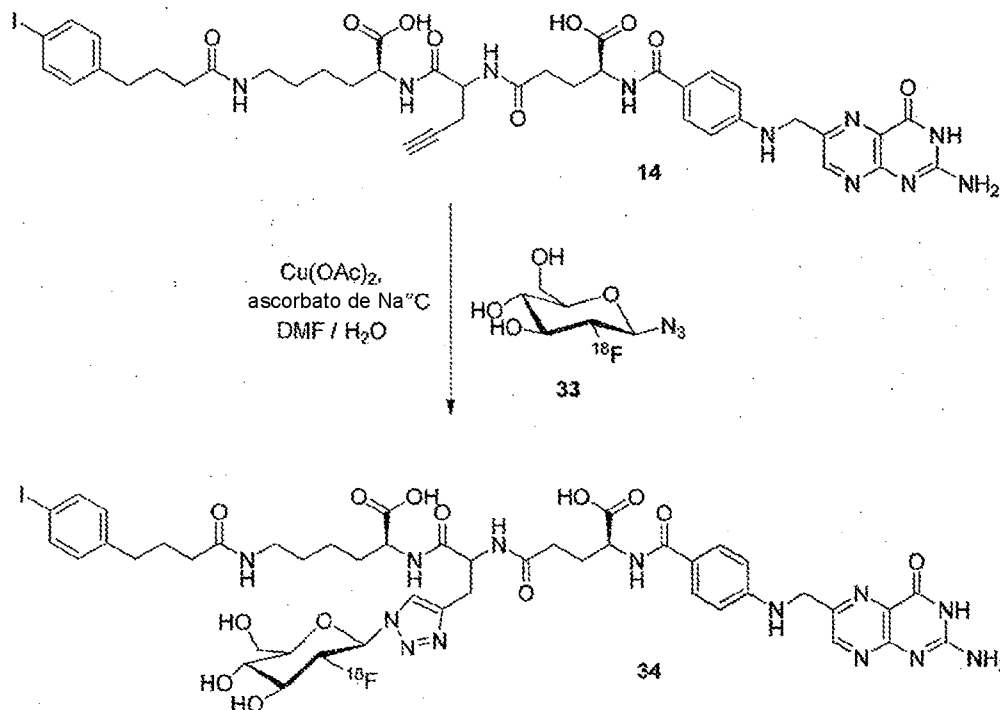


La síntesis se obtuvo en analogía al ejemplo 4 utilizando N²-isobutiril-10-trifluoroacetil-fólico ácido- γ -metiléster en vez de N²-isobutiril-10-trifluoroacetil-fólico ácido- α -metiléster (el N²-isobutiril-10-trifluoroacetil-fólico ácido- γ -metiléster se preparó en analogía al N²-isobutiril-10-trifluoroacetil-fólico ácido- α -metiléster de acuerdo con el documento WO 2009/082606.)

El compuesto 32 se obtuvo como un sólido amarillo anaranjado. HPLC: 95,0 % de área (mismo método que el descrito para el análisis del compuesto 26). LC-MS: $[M+H]^+ = 1356,6$ (calc. para $C_{57}H_{78}N_{18}O_{16}$, 1355,5).

Ejemplo 5: Síntesis del conjugado trifuncional folato [¹⁸F]FDG-AB 34

(a)



El precursor 3,4,6-tri-O-acetil-2-O-trifluorometanosulfonil- β -D-mannopiranosil azida utilizado para el acoplamiento de la glucosa sustituida con ¹⁸F mediante reacción de clic con el folato, se obtuvo de acuerdo con los procedimientos de la literatura (por ejemplo. Maschauer and Prante, Carbohydr. Res. 2009, 753; Takatani et al

Carbohydr. Res. 2003, 1073).

(b) Radiosíntesis de 2-[¹⁸F]fluoroglucopiranosil azida 33

5 Al complejo seco ¹⁸F-fluoruro-criptatose se agregó el precursor, 3,4,6-tri-O-acetil-2-O-trifluorometanosulfonil-β-D-manopiranosil azida (3,0 mg, 6,5 pmol), en 0,30 mL de acetonitrilo anhidro. La mezcla se agitó durante 5 min a 80 °C para obtener una incorporación de ¹⁸F de un máximo del 75 % según el análisis por radio-UPLC. Tras 5 min de enfriamiento y la adición de 8 mL de agua, la mezcla se pasó a través de un cartucho de fase inversa (Sep-Pak C18 Plus; Waters; preconditionado con MeOH y H₂O). El cartucho se lavó con 5 ml de agua. El intermedio protegido marcado con ¹⁸F, 3,4,6-tri-O-acetil-2-deoxi-2-[¹⁸F]fluoroglucopiranosil azida, se eluyó con 2,0 mL de acetónitrilo en otro recipiente de reacción sellado de 10 ml y se secó a presión reducida y con una corriente de nitrógeno a 80 °C. Para la hidrólisis, se agregaron 0,25 ml de solución de hidróxido sódico 60 mM y la mezcla se calentó a 65 °C durante 5 min para completar la desacetilación. Una vez enfriada, la mezcla se neutralizó con 0,25 ml de solución de cloruro de hidrógeno 60 mM y se utilizó directamente para la reacción de clic sin purificación adicional.

(c) Acoplamiento al precursor folato-alquino 14

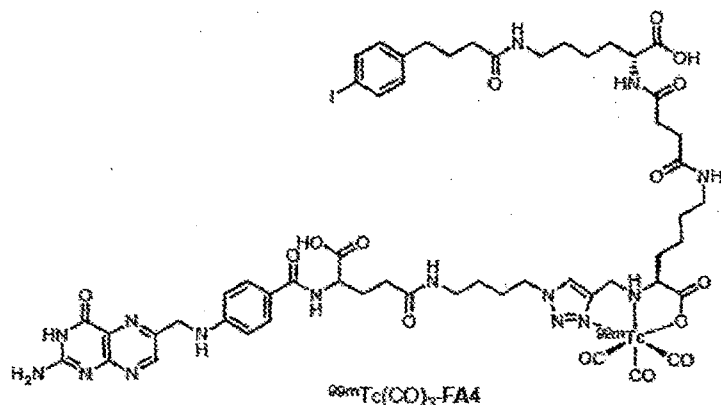
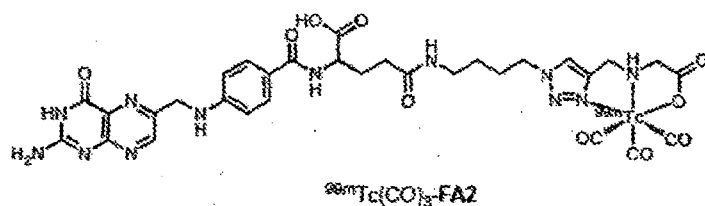
20 La 2-deoxi-2-[¹⁸F]fluoroglucopiranosil azida 33 desprotegida obtenida en el paso (b) se transfirió a otro recipiente de reacción que contenía el folato alquino 14 en 300 µl de DMF, seguido de la adición de 10 µl de solución 0,1 M de Cu(OAc)₂ y 20 µl de solución de ascorbato sódico 0,1 M. La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 15 min. Tras agregar 3 ml de solución de NH₄HCO₃ 0,05 M, la mezcla se sometió al sistema de radio-HPLC semipreparativa. La fracción de producto [¹⁸F]FDG-folato de albúmina (R_T = 19,3 min) se recogió en 20 ml de agua y la mezcla se pasó por un cartucho de fase inversa (Sep-Pak C18 light; Waters; preconditionado con EtOH (5 ml) y H₂O (5 ml)). El cartucho se lavó con 10 ml de agua y el producto marcado con ¹⁸F[¹⁸F]FDG-albuminógeno folato 34 se eluyó con 1,0 ml de etanol en un vial estéril y libre de pirógenos. Tras la evaporación del etanol, la solución final del producto se diluyó con 2 ml de PBS para inyección.

30 El rendimiento global corregido por desintegración del producto aislado alcanzó el 1-2 % tras un tiempo total de síntesis de 3 h, con una pureza radioquímica siempre superior al 95 %. La actividad específica del folato 34[¹⁸F]FDG-albuminógeno fue de unos 40-50 GBq/µmol.

El valor logD_{7,4} del folato [¹⁸F]FDG-albuminógeno resultó ser -3,2 ± 0,4 por el método de matraz agitado.

35 **Ejemplo 6: Radiomarcaje de los compuestos del Ejemplo 1(f) y 1(p) (a) con ⁶⁷Ga y ¹⁷⁷Lu**

Se mezcló un volumen de 15 µl del compuesto 16 y 6 (1 mM) con 250 µl de tampón acetato de Na (0,4 M, pH 5) y solución de ⁶⁷GaCl₃ (40 MBq, 2,7 × 10⁻¹¹ mol) o solución de ¹⁷⁷LuCl₃ (50 MBq, 0,7 × 10⁻¹¹ mol para 30 nmol de compuesto). La mezcla se incubó durante 30 min a 90 °C y se enfrió a RT. Se agregó solución de DTPA (10 µl, 5 mM, pH 5) para la complejación de posibles trazas de ⁶⁷Ga o ¹⁷⁷Lu sin reaccionar, respectivamente. El control de calidad se realizó mediante HPLC. El sistema HPLC estaba compuesto por un sistema Waters con un detector de absorbancia sintonizable y un analizador multicanal Unispec γ-detector y un Waters XTerraR MS C18 (5 µm, 4,6 mm × 150 mm) con un eluyente que consistía en tampón fosfato de trietilamonio acuoso 0,05 M, a pH 2,25 o pH 7,5, y metanol con un gradiente lineal al 80 % de metanol a lo largo de 30 min. Para los experimentos celulares in vitro y el ensayo de unión a albúmina, los compuestos ⁶⁷Ga-16 y ⁶⁷Ga-6o ¹⁷⁷Lu-16 y ¹⁷⁷Lu-6 respectivamente se purificaron por HPLC. Para todos los experimentos in vitro, los compuestos radiactivos se purificaron mediante HPLC. El pico radiactivo se recogió y se diluyó con PBS. El MeOH se eliminó bajo un flujo de N₂.



(b) con $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$

- 5 El $[\text{Na}] [^{99m}\text{TcO}_4]$ eluido en solución salina al 0,9 % (1 ml, 2-10 GBq) se agregó a un Isolink Kit (4,5 mg BC, 2,9 Borax, 7,8 mg $\text{Na}_2(\text{CO})_3$, 9 mg Na-K-Tartrato bajo atmósfera de N_2 . La solución se calentó durante 20 min hasta 100 °C, se enfrió a continuación a RT y se neutralizó utilizando un tampón ácido de HCl/fosfato. Se mezclaron PBS (250 μl de 1 x, pH 7,4), 50 nmol del compuesto FA2, FA4 o 22 y 200 μl de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ (alrededor de 0,8 GBq) en un vial de penicilina y se calentaron durante 45 min a 80 °C. La calidad del radiomarcado se analizó
10 mediante HPLC siguiendo el protocolo mencionado.

Ejemplo 7: Estabilidad in vitro del folato DOTA-AB 16 radiomarcado con ^{177}Lu

- 15 El DOTA-AB-folato 16 radiomarcado con ^{177}Lu mostró una mayor estabilidad en plasma humano y PBS que el compuesto de control (Figura 1, cuadrados rellenos): folato DOTA ^{177}Lu en PBS, triángulos rellenos: folato DOTA ^{177}Lu en plasma, círculos rellenos: folato DOTA-AB ^{177}Lu en PBS, rombos rellenos: folato DOTA-AB ^{177}Lu en plasma). Todavía se desconoce la razón de la degradación relativamente rápida del compuesto de control folato DOTA ^{177}Lu en PBS. Ambos radiofolatos mostraron una unión específica del FR a las células tumorales KB (línea celular de carcinoma cervical humano que sobreexpresa el FR). La absorción fue elevada y comparable para
20 ambos compuestos. Alrededor del 75 % del total del radiotrazador agregado por 0,5 mg de proteína celular se unió en estado estacionario (tras 2 h de incubación a 37 °C), de los cuales alrededor del 30 % fueron internalizados en el caso del folato DOTA-AB ^{177}Lu y el 15 % en el caso del compuesto de control.

Ejemplo 8: Captación celular e internalización de folato DOTA-AB 16 radiomarcado con ^{177}Lu en células KB positivas a FR

- 25 La determinación del coeficiente de distribución octanol/PBS pH 7,4 (valor logD) mostró valores negativos elevados ($-4,04 \pm 0,01$ para folato DOTA-AB 16 ^{177}Lu y $-4,44 \pm 0,29$ para folato DOTA ^{177}Lu). Las pruebas de filtrado realizadas para determinar la fracción de los radiotrazadores unida a la albúmina revelaron una unión de
30 aproximadamente el 90 % del folato DOTA-AB ^{177}Lu , mientras que el compuesto de control no mostró unión a la albúmina (Figura 2 (de izquierda a derecha): columnas 1 (rayada verticalmente) y 3 (rayada diagonalmente): folato DOTA ^{177}Lu a las 2 h y 4 h, respectivamente; columnas 2 (rayada horizontalmente) y 4 (rellena): folato DOTA-AB ^{177}Lu a las 2 h y 4 h respectivamente).

Ejemplo 9: Estudio de biodistribución de folato DOTA-AB 16 radiomarcado con ^{177}Lu en ratones portadores de tumores KB

Los experimentos in vivo se realizaron en ratones desnudos hembra portadores de xenoinjertos tumorales KB. Los

ratones se sometieron a eutanasia en diferentes puntos temporales tras la inyección de folato DOTA-AB 16 radiomarcado con ^{177}Lu del compuesto de control folato DOTA ^{177}Lu , respectivamente. Como era de esperar, encontramos un mayor tiempo de circulación del folato DOTA-AB 16 ^{177}Lu en la sangre ($> 4\%$ ID/g y $> 1\%$ ID/g a las 4 h y 24 h p.i.) en comparación con el compuesto de control ($\sim 0,2\%$ ID/g y $\sim 0,05\%$ ID/g a las 4 h y 24 h p.i.). La captación tumoral de folato DOTA-AB 16 ^{177}Lu fue muy elevada ya 4 h después de la inyección ($18,12 \pm 1,80\%$ ID/g) y se mantuvo a lo largo del tiempo. Esta absorción fue aproximadamente 4 veces superior a la conseguida con el compuesto de control ($4,98 \pm 1,21\%$ ID/g, 4 h p.i.). Por el contrario, la absorción renal de folato DOTA-AB ^{177}Lu a las 4 h y 24 h p.i. fue sólo del 30 % ID/g, en comparación con más del 70 % ID/g del compuesto de control. Gracias a la fracción de unión a la albúmina, la distribución tisular del folato DOTA pudo mejorarse significativamente, ya que la relación tumor-riñón se multiplicó por varias veces (véase la Figura 3): Biodistribución en ratones portadores de tumores KB 4 h y 24 h después de la inyección de folato DOTA-AB ^{177}Lu (blanco y negro, columnas 3 y 4 de izquierda a derecha) y del compuesto de control folato DOTA ^{177}Lu (punteado y rayado, columnas 1 y 2 de izquierda a derecha). La figura 4(A) ilustra la captación en un xenoinjerto de tumor KB (T) y en los riñones (K) de un folato DOTA-AB 16 radiomarcado con ^{177}Lu a las 3 h p.i. (imagen izquierda) y a las 24 h p.i. (imagen derecha) a una dosis de 59 MBq. La figura 4(B) ilustra la captación en un xenoinjerto tumoral KB (T) y en los riñones (K) de un folato DOTA-AB 16 radiomarcado con ^{161}Tb a las 2 h p.i. (imagen izquierda) y a las 48 h p.i. (imagen derecha) a una dosis de 58 MBq.

La figura 5 ilustra la eficacia de la terapia en ratones desnudos portadores de tumores KB a lo largo del tiempo (19 días). Los ratones fueron inoculados con 4,5 Mio de células tumorales KB en cada paletilla 5 días antes de la terapia. El grupo A representa los ratones inyectados a los $t = 0$ días con folato DOTA-AB 16 radiomarcado con ^{177}Lu . El grupo B representa el grupo de control, es decir, ratones inyectados en $t = 0$ con PBS pH 7,4. La figura 5(A) ilustra el tamaño relativo del tumor (eje y) del grupo A (rombos rellenos) y del grupo B (triángulos rellenos) a lo largo del tiempo (eje x). La figura 5(B) muestra los resultados en $t = 17$ días.

Ejemplo 10: Estudio de biodistribución de folato FDG-AB 34 radiomarcado con ^{18}F en ratones portadores de tumores KB

Los experimentos in vivo se realizaron en ratones desnudos hembra portadores de xenoinjertos tumorales KB.

Se inyectó a los animales ~ 3 MBq de folato [^{18}F] FDG-AB-34 a través de una vena lateral de la cola. Los animales fueron sacrificados 2 h después de la inyección del radiotrazador. Se diseccionaron órganos y tejidos y se midieron en el γ -contador (Wizard, PerkinElmer). La radiactividad incorporada se expresó como porcentaje de dosis inyectada (%ID) por gramo de tejido. Los datos de biodistribución se resumen en la Tabla 1.

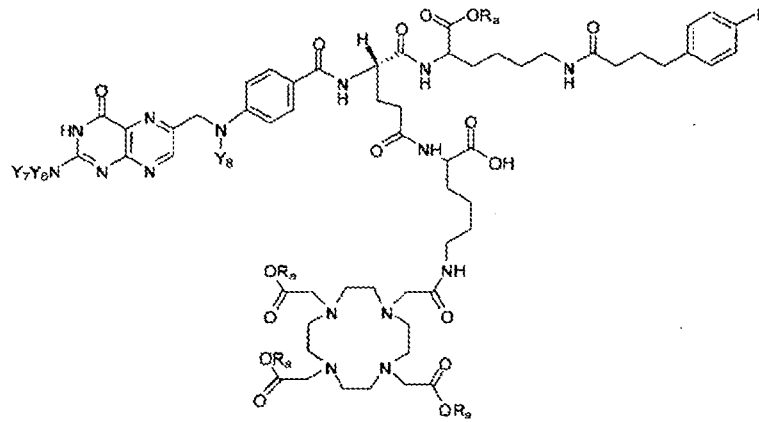
Tabla 1: Estudio de biodistribución *ex vivo* con folato [^{18}F]FDG-AB en ratones desnudos portadores de xenoinjertos tumorales KB 2 h después de la inyección

Órgano o tejido	2 h p.i. ($n = 3$)
%ID/g en:	
Sangre	$2,93 \pm 0,55$
Cerebro	$0,89 \pm 0,17$
Corazón	$3,20 \pm 0,53$
Pulmones	$2,44 \pm 0,58$
Bazo	$0,81 \pm 0,03$
Hígado	$7,14 \pm 0,78$
Vesícula biliar	$83,78 \pm 16,78$
Riñones	$14,98 \pm 1,47$
Estómago	$1,93 \pm 0,51$
Intestino	$8,84 \pm 7,07$
Heces	$53,02 \pm 26,52$
Glándulas salivales	$7,55 \pm 0,08$
Hueso	$1,50 \pm 0,24$
Músculo	$1,62 \pm 0,26$
Tumor	$9,51 \pm 0,08$
Relaciones:	

Órgano o tejido	2 h p.i. (<i>n</i> = 3)
%ID/g en:	
Tumor / Hígado	1,34 ± 0,16
Tumor / Riñones	0,64 ± 0,07
Tumor / Sangre	3,33 ± 0,59

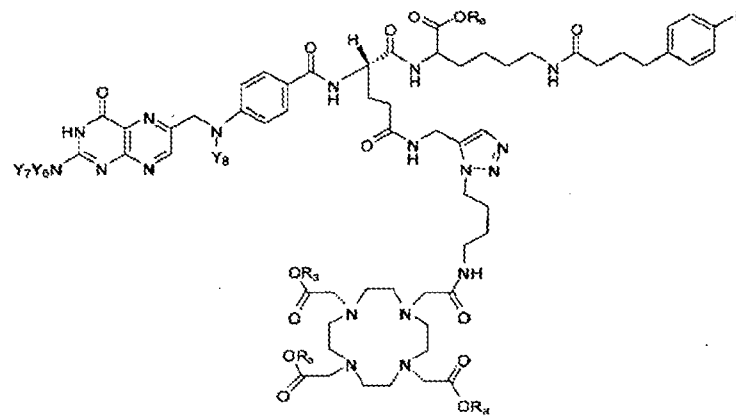
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula siguiente



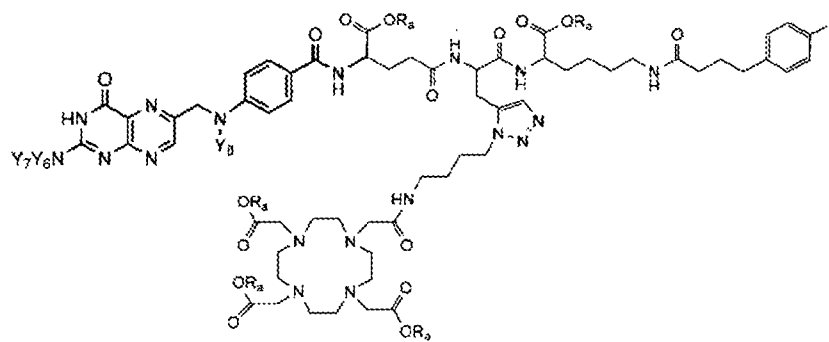
5

o



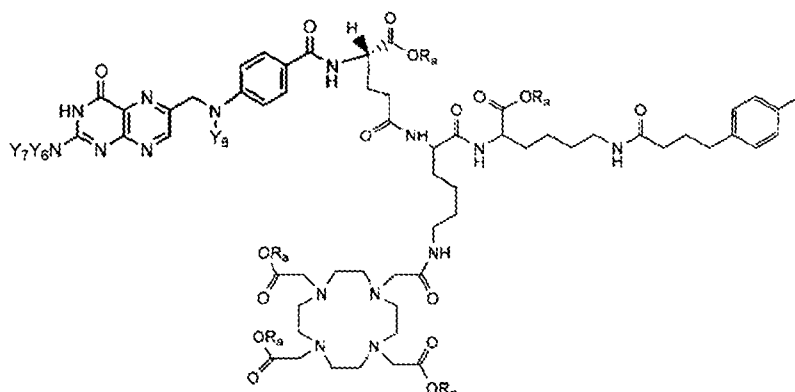
10

o

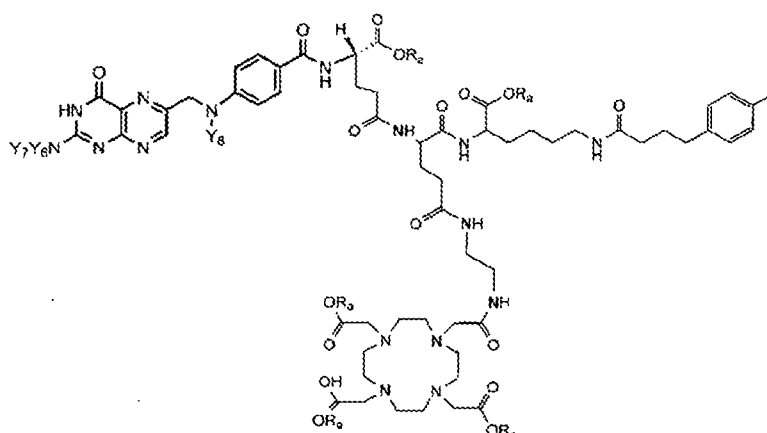


15

o



o



5

en donde

- Y6, Y7 se seleccionan independientemente entre sí de H, halo, alquilo C(1-12), alquenilo C(2-12), alquinilo C(2-12), -OR', -COR', -COOR' y -NHR', en donde R' es H o alquilo C(1-8),
 Y8 se selecciona de H, nitroso, alquilo C(1-12), -OR', -COR' y -COR' halosustituido, en donde R' es H o alquilo C(1-12),
 Ra es H o alquilo C(1-8).

2. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en diagnóstico por imagen de una célula o población de células que expresan un receptor de folato in vitro o in vivo.
4. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la administración conveniente y eficaz a un sujeto en necesidad de diagnóstico por imagen.
5. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un método de diagnóstico por imagen de una célula o población de células que expresan un receptor de folato, dicho método comprende los pasos de administrar al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en una cantidad de diagnóstico por imagen, y obtener una imagen de diagnóstico de dicha célula o población de células.
6. Compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el diagnóstico por imagen se realiza de una célula o población de células que expresan un receptor de folato in vitro o in vivo.
7. Método para la detección in vitro de una célula que expresa el receptor de folato en una muestra de tejido que incluye poner en contacto dicha muestra de tejido con un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en cantidades efectivas y durante el tiempo y las condiciones suficientes para permitir que se produzca la unión y detectar tal unión mediante imágenes PET.
8. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un método de diagnóstico por imagen o monitorización de un sujeto que comprende los pasos de (i) administrar al menos un compuesto de acuerdo con

la reivindicación 1 en una cantidad de diagnóstico por imagen, y (ii) realizar el diagnóstico por imagen mediante PET detectando una señal de dicho al menos un compuesto.

- 5 9. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un método de monitorización de la terapia del cáncer en un sujeto que comprende los pasos de (i) administrar a un sujeto que lo necesite al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en una cantidad de diagnóstico por imagen en combinación con un agente terapéuticamente activo, y (ii) realizar el diagnóstico por imagen mediante PET detectando una señal de dicho al menos un compuesto para seguir el curso de la terapia del cáncer.
- 10 10. Compuesto para uso de las reivindicaciones 8 o 9 utilizado en combinación con cualquier otro método de diagnóstico o terapia del cáncer.

DIBUJOS

Figura 1:

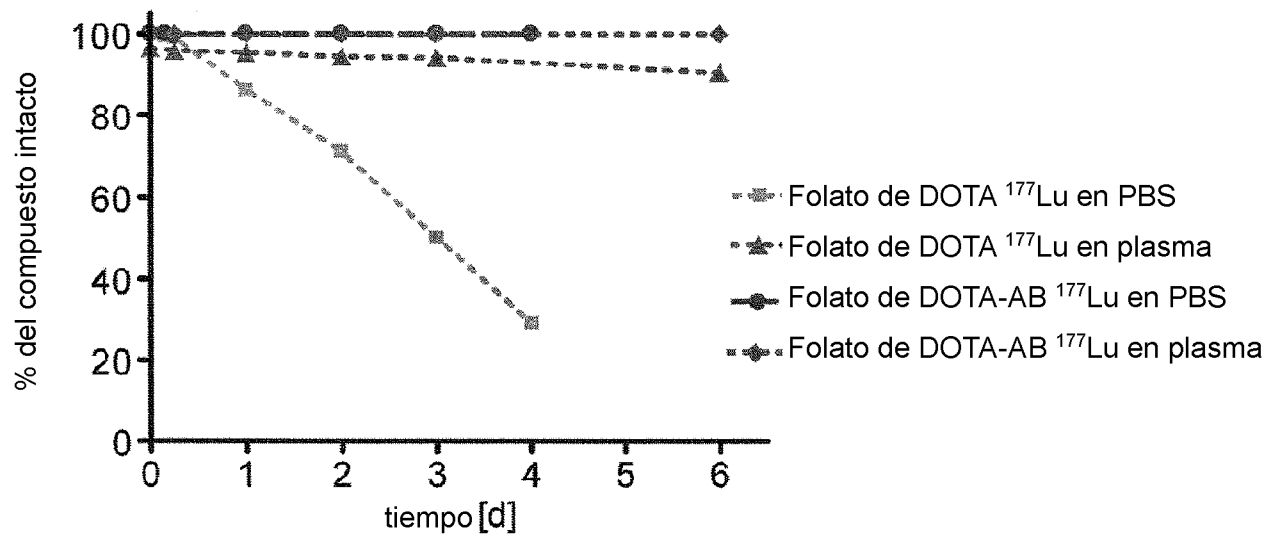


Figura 2

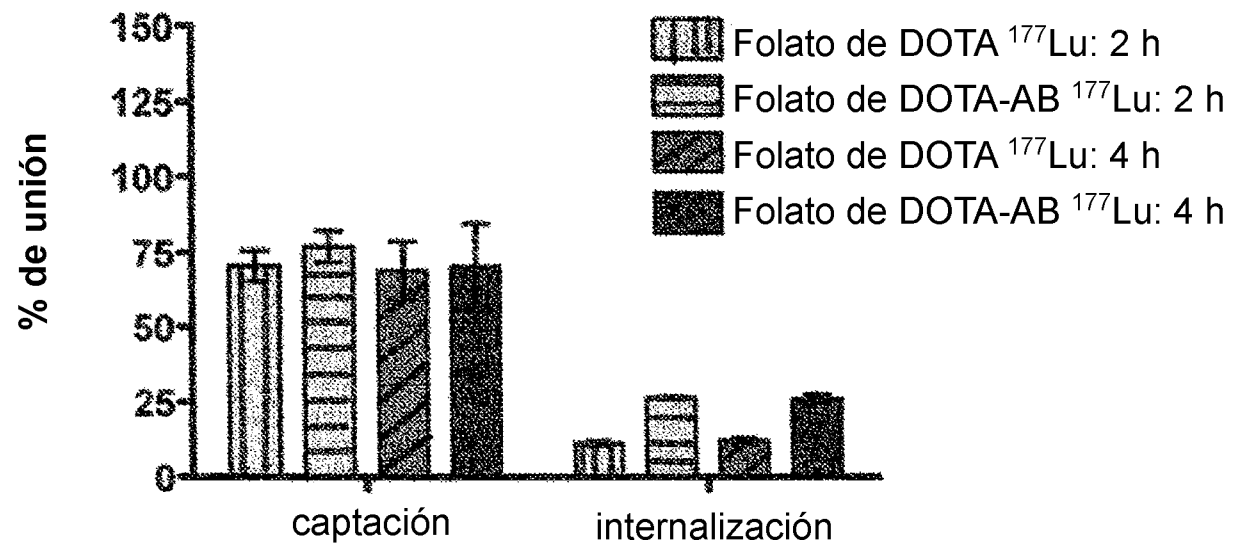


Figura 3

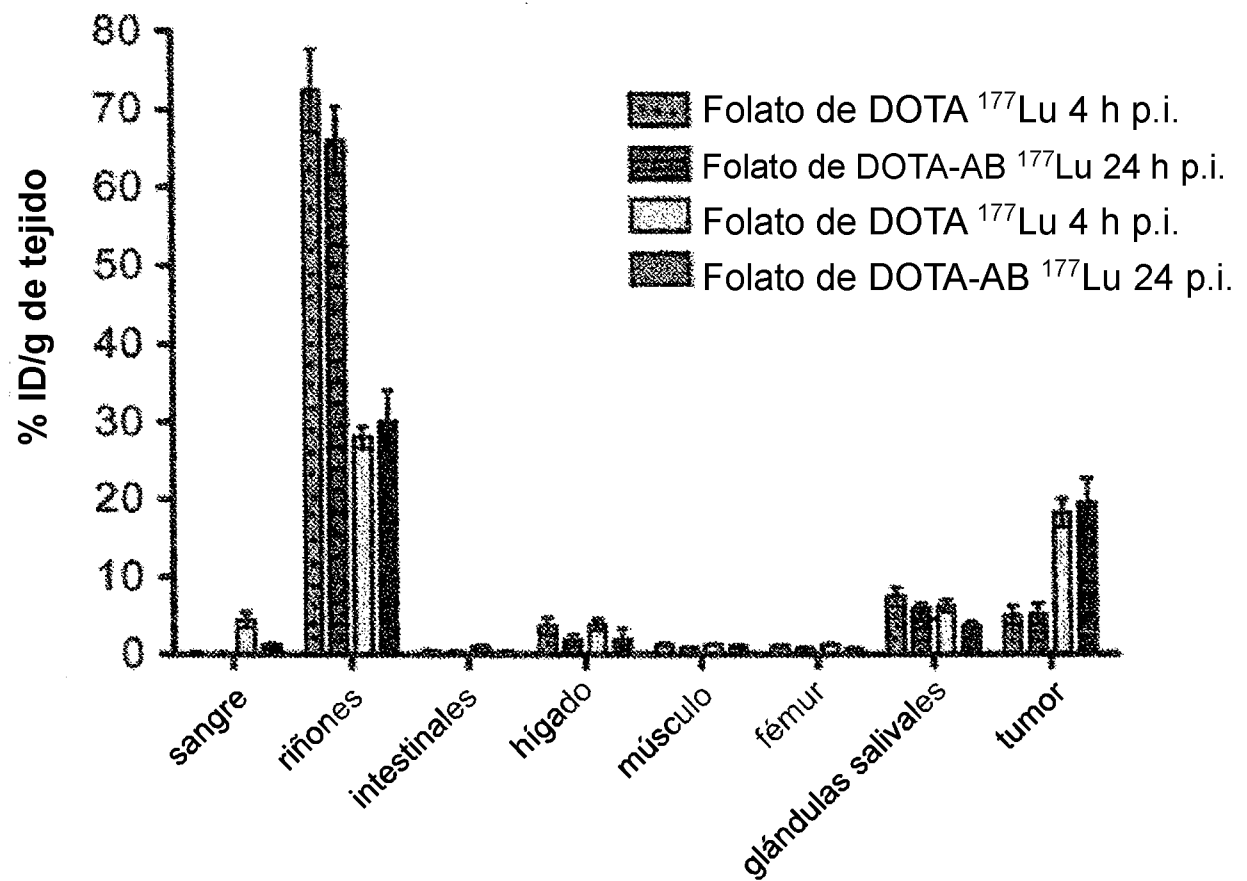
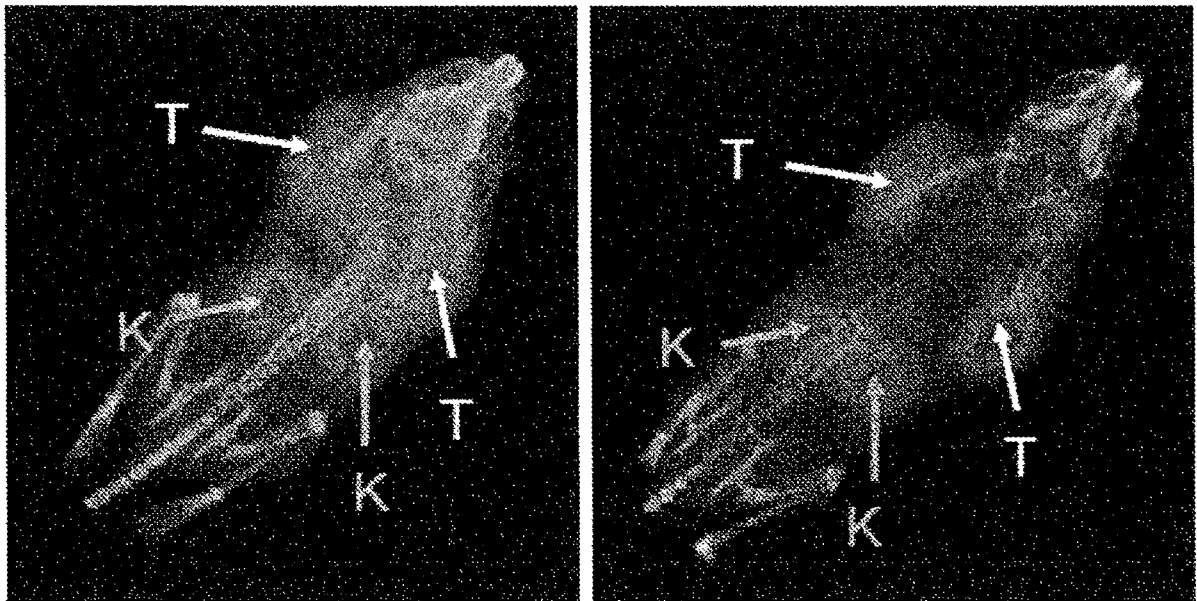


Figura 4

(A)



(B)

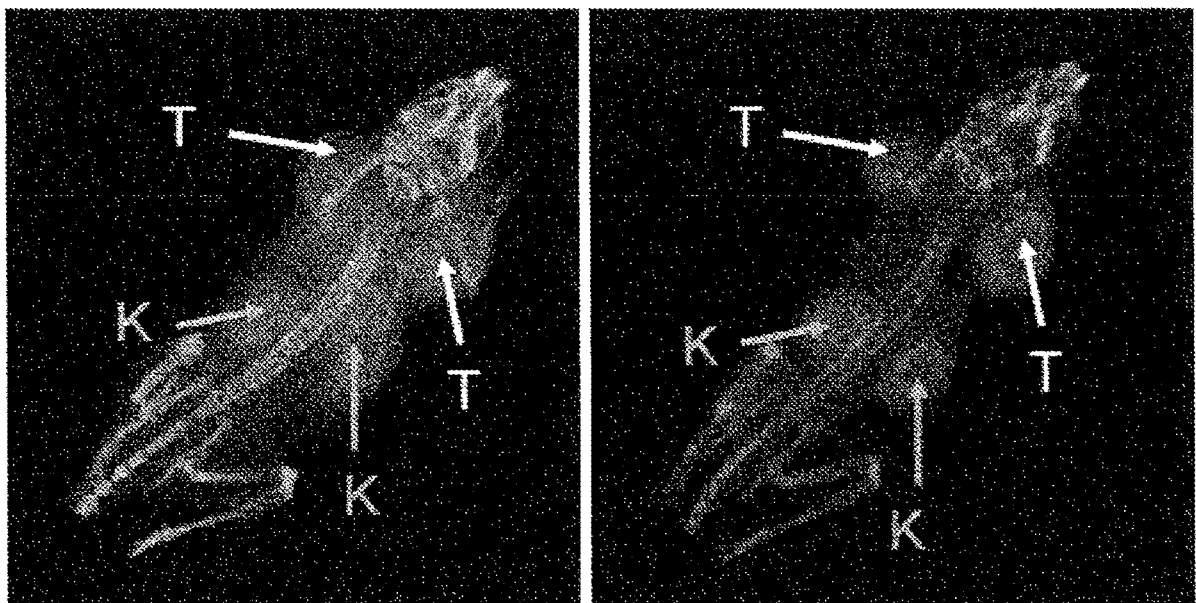
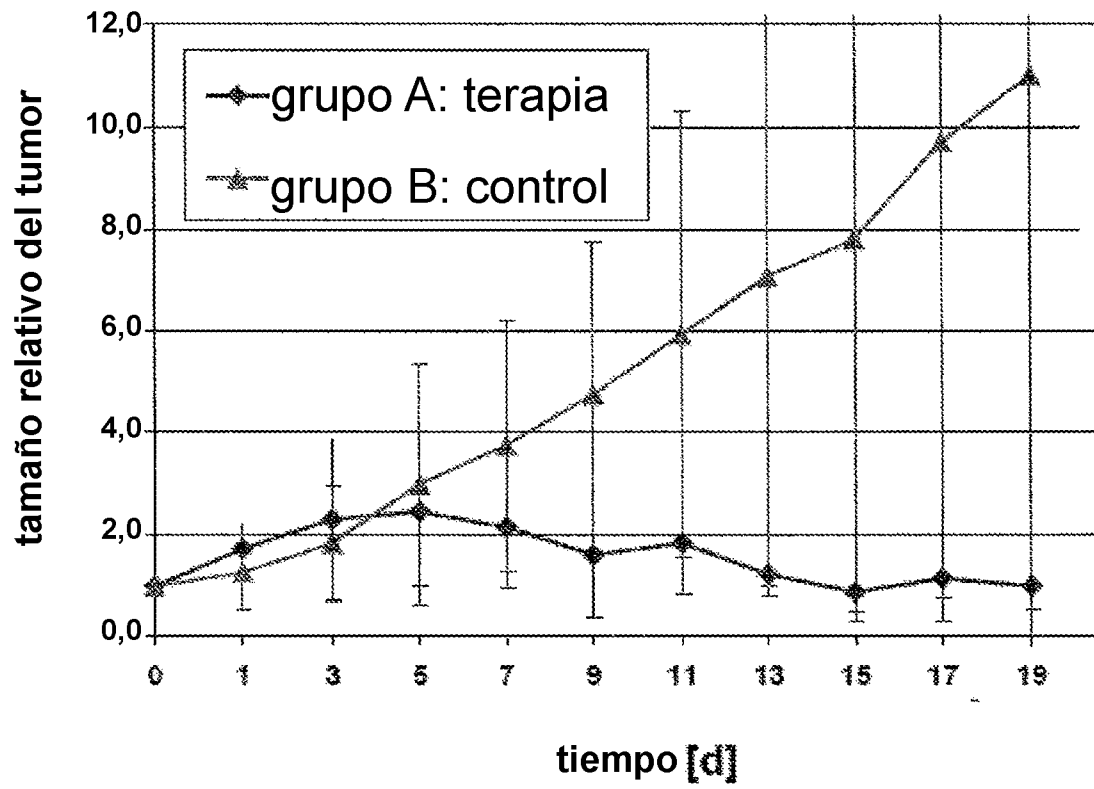


Figura 5

(A)



(B)

