

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 833 959**

(51) Int. Cl.:

A61K 51/04 (2006.01)
C07D 498/08 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)
A61K 101/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2017 PCT/EP2017/054611**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017 WO17148925**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2017 E 17707055 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2020 EP 3423113**

(54) Título: **Inhibidor del EGFR macrocíclico radiomarcado**

(30) Prioridad:

29.02.2016 EP 16157885

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

16.06.2021

(73) Titular/es:

**ONCODESIGN S.A. (100.0%)
20 Rue Jean Mazen B.P. 27 627
21076 Dijon Cedex, FR**

(72) Inventor/es:

**HOFLACK, JAN MARIE CYRIEL JOZEF;
BERTHET, CYRIL;
BLOM, PETRA MARCELLA FRANÇOISE;
VERCOUILIE, JOHNNY;
ROBIC, CAROLINE;
CATOEN, SARAH;
VIOT, GILLES y
DELOYE, JEAN-BERNARD**

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 833 959 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

Inhibidor del EGFR macrocíclico radiomarcado

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de quinazolina macrocíclicos radiomarcados con flúor 18, que son adecuados como trazadores de tomografía por emisión de positrones (PET) para la obtención de imágenes de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y su uso en diagnóstico *in vivo*, formación de imágenes preclínicas y clínicas de tumores, estratificación de pacientes sobre la base del estado mutacional del EGFR y evaluación de la respuesta tumoral a los tratamientos terapéuticos. La presente invención también describe compuestos precursores y métodos para preparar los radiotrazadores. La invención es relevante para cualquier cáncer que esté influenciado o impulsado por EGFR desregulado, tal como, pero no limitado a, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer pancreático, hepatocelular, esofágico, gástrico, colorrectal, de próstata, cervical, renal, de ovario, de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y glioma maligno.

10 Antecedentes de la invención

20 La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica de formación de imágenes de medicina nuclear que produce imágenes de procesos funcionales del cuerpo. Los radiotrazadores se utilizan en PET como herramientas de diagnóstico y para obtener imágenes de la concentración en tejidos de moléculas de interés.

25 El desarrollo de biomarcadores de formación de imágenes moleculares está estrechamente relacionado con el desarrollo de moléculas terapéuticas. Entre los objetivos potenciales, las quinasas ofrecen muchas ventajas y, en particular, (i) desempeñan un papel central en la regulación celular, (ii) existen numerosas bibliotecas de moléculas pequeñas específicas de quinasas en la industria biotecnológica y farmacéutica, (iii) varias terapias dirigidas a quinasas se utilizan en clínica (imatinib, sorafenib, sunitinib...) con aplicación en una variedad de indicaciones terapéuticas.

30 Entre las quinasas, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un objetivo establecido para el tratamiento del cáncer avanzado de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Ya se han aprobado tres inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) del EGFR, gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®) y afatinib (Giotrif®) para el tratamiento del NSCLC, y la tercera generación de moléculas está en desarrollo clínico. Múltiples ensayos controlados aleatorizados han confirmado la asociación entre la presencia de mutaciones activadoras del EGFR (exón 19 del o 35 mutación puntual L858R) y la respuesta objetiva a gefitinib, erlotinib y afatinib, demostrando así su superioridad sobre la quimioterapia basada en platino como tratamiento de primera línea para pacientes con NSCLC con tumores positivos para mutación del EGFR (10 a 15%) (Sebastian et al., 2014, European Respiratory Review, 23 (131): 92-105). Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes desarrollará una resistencia a la TKI a largo plazo (6-12 meses) a pesar de un buen control inicial. Si el mecanismo de resistencia aún no está completamente caracterizado, la mayoría 40 de los pacientes (50%) adquirirán una mutación adicional T790M ubicada en el exón 20 del EGFR (Pao et al., 2005, PLoS Medicine, 2 (3): e73; Yun et al., 2008, PNAS 105 (6): 2070). Otros subgrupos de pacientes mostrarán una resistencia debido a la amplificación del protooncogén MET que es responsable de hasta el 20% de los pacientes con recaída o la inactivación del gen supresor de tumores del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), lo que lleva a la 45 activación de la ruta de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT (Sequist et al., 2011, Science Translational Medicine, 3 (75): 75ra26). La falta de una opción terapéutica establecida para los pacientes con NSCLC que tienen una enfermedad progresiva después del fracaso del EGFR-TKI representa un gran desafío para los médicos en términos de cómo manejar mejor a este creciente grupo de pacientes.

50 La formación de imágenes por PET con TKI radiomarcados (TKI-PET) puede proporcionar una herramienta para determinar y predecir la capacidad de respuesta a los TKI del EGFR *in vivo*. Existe una necesidad clínica de tecnología no invasiva para evaluar temprano la capacidad de respuesta al tratamiento y determinar la adquisición espacial y temporal de la mutación molecular que conduce a la resistencia tumoral. TKI-PET es una potencial herramienta de medicina personalizada que guiará a los médicos a adaptar el tratamiento de sus pacientes, eligiendo el mejor tratamiento o combinación de tratamientos según la evolución espacial y temporal de la resistencia tumoral y su causalidad molecular.

55 La presente invención proporciona un nuevo compuesto radiomarcado (flúor 18) dirigido al EGFR evaluado *in vitro* y en un estudio de formación de imágenes preclínico. Este compuesto podría ser útil para predecir la actividad del EGFR, correlacionada con su estado mutacional, y el seguimiento de esta actividad en tumores tratados con terapias dirigidas al EGFR. La absorción de compuesto radiomarcado en los tumores se puede determinar con PET. Ejemplos de este principio con ¹¹C-erlotinib o ¹⁸F-afatinib fueron publicados respectivamente por Memon et al., British Journal of Cancer, 2011, 1850-1855 y Slobbe et al., en Nuclear Medicine and Biology 41 (2014) 749-757. El documento WO2017118197 también describe compuestos de quinazolina marcados con ¹⁸F para la formación de imágenes de tumores con EGFR. Ya se han descrito derivados de quinazolina macrocíclicos como agentes antiproliferativos adecuados (documento WO2004105765), sin embargo, ahora se ha descubierto sorprendentemente que los compuestos particulares de la invención son trazadores de PET muy adecuados.

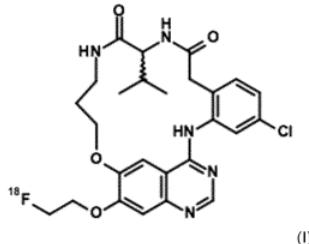
La presente invención tiene como objetivo proporcionar radioligandos selectivos para EGFR (erbB1) como trazador de PET para diagnóstico *in vivo*, formación de imágenes preclínicas y clínicas de tumores, estratificación de pacientes con base en el estado mutacional del EGFR y respuesta tumoral a tratamientos terapéuticos.

5

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) marcado con flúor 18, o cualquier sal, polimorfo, solvato, hidrato, estereoisómero, radioisótopo o tautómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

10



15 En una realización particular, la presente invención proporciona un compuesto marcado con flúor 18 de acuerdo con esta invención y que tiene la estereoisoquímica S como se representa en la fórmula (II), o la estereoisoquímica R como se representa en la fórmula (III) o cualquier sal, polimorfo, solvato, hidrato, estereoisómero, radioisótopo o tautómero farmacéuticamente aceptable del mismo; en particular, la estereoisoquímica R representada en la fórmula (III)

Chemical structures of (II) and (III) are shown. Structure (II) is a 2'-deoxy-2'-fluorocytidine derivative with an ¹⁸F-labeled ethyl ester side chain at the 2' position. Structure (III) is its enantiomer, with the chiral center having an (R) configuration. Both structures feature a purine ring system with a 4-chlorophenyl group at the 6-position.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado según cualquiera de fórmula (I), (II) o (III), que opcionalmente comprende además uno o más vehículos y/o diluyente inertes. En una realización preferida, la presente invención proporciona una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con la fórmula (II), que opcionalmente comprende además uno o más vehículos y/o diluyente inertes.

25

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de la fórmula (I), (II) o (III), o una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de la fórmula (I), (II) o (III) para uso como agente de diagnóstico en medicina humana.

30 La presente invención proporciona además el uso de un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III), o una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III), en formación de imágenes de tumores.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III), o una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III) para uso en diagnóstico *in vivo* o formación de imágenes de tumores.

40 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para la formación de imágenes de diagnóstico de un tumor asociado a EGFR en un ser humano, que comprende administrar a un ser humano que necesita dicha formación de imágenes de diagnóstico una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de la fórmula (I), (II) o (III), o una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III); y obtener una imagen útil para cuantificar al EGFR en el tumor de dicho ser humano mediante tomografía por emisión de positrones.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la cuantificación del EGFR en tejido humano, que comprende poner en contacto dicho tejido humano en el que se desea la cuantificación con una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de la fórmula (I), (II) o (III), o una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado según cualquiera de fórmula (I), (II) o (III); y detectar o cuantificar el EGFR usando tomografía por emisión de positrones.

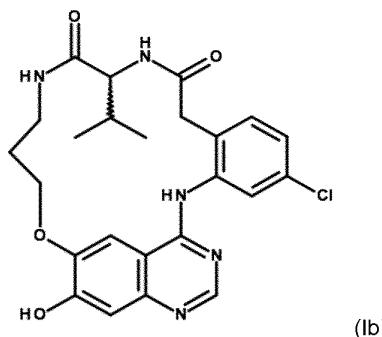
50

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un compuesto radiomarcado de acuerdo con la fórmula (I); dicho método comprende la etapa de hacer reaccionar compuestos radiomarcados

5



con un compuesto de fórmula (Ib)



(Ib)

10

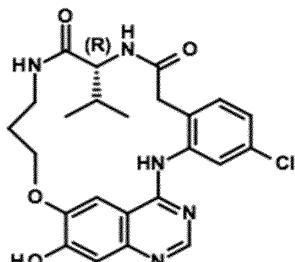
y aislar el compuesto resultante de fórmula (I).

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para preparar un compuesto radiomarcado de acuerdo con la fórmula (III); dicho método comprende la etapa de hacer reaccionar compuestos radiomarcados

15



con un compuesto de fórmula (IIIb)



(IIIb)

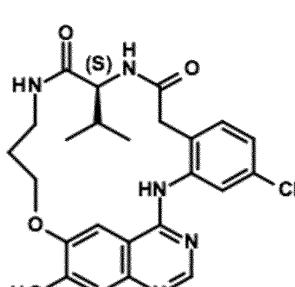
20

y aislar el compuesto resultante de fórmula (III).

En una realización alternativa, la presente invención proporciona un método para preparar un compuesto radiomarcado de acuerdo con la fórmula (II); dicho método comprende la etapa de hacer reaccionar compuestos radiomarcados

25

30 con un compuesto de fórmula (IIb)



(IIb)

Breve descripción de los dibujos

Con referencia específica ahora a las figuras, se destaca que los detalles que se muestran son a modo de ejemplo y con el propósito de una discusión ilustrativa de las diferentes realizaciones de la presente invención únicamente. Se presentan con la finalidad de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y sencilla de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se intenta mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle de lo necesario para una comprensión fundamental de la invención. La descripción tomada con los dibujos pone de manifiesto para los expertos en la técnica cómo se pueden realizar en la práctica las diversas formas de la invención.

5 10 Figura 1: Constante de afinidad de unión del Compuesto (II) determinada en experimentos de competición en extractos de líneas celulares NCI-H3255 (A) y NCI-H441 (B). Los extractos de las líneas celulares NCI-H3255 y NCI-H441 se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min con el Compuesto (II) (0,5-0,7 nM) y con concentraciones crecientes de Compuesto (IIa) (0,05 nM a 10 μ M).

15 15 Figura 2: Constante de afinidad de unión del Compuesto (II) determinada en experimentos de competición en extractos tumorales NCI-H3255 (A) y NCI-H1975 (B). Los extractos tumorales NCI-H3255 y NCI-H1975 se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min con el Compuesto (II) (0,1-0,3 nM) y con concentraciones crecientes de Compuesto (IIa) (0,25 nM a 1 μ M).

20 20 Figura 3: Cinética de unión del Compuesto (II) evaluada en extractos tumorales NCI-H3255 (A) y NCI-H1975 (B). El Compuesto (II) (1,5-2,5 nM) se incubó con extractos durante 2 a 90 minutos a temperatura ambiente. La unión no específica se evaluó en presencia de un Compuesto (IIa) con un exceso > 100 veces.

25 25 Figura 4: Biodistribución del Compuesto (II) en varias líneas celulares y los órganos principales (en % de DI/g) 90 min, 6 MBq (A); o 180 min, 30 MBq (B); y captación en sangre (C), músculo (D) y tumores (E).

Figura 5: Captación normalizada del Compuesto (II) - relación de tumor sobre músculo.

30 30 Figura 6: Captación en tumores medida mediante la recolección de tumores y el recuento de radiactividad en relación con las imágenes de PET.

35 35 Figura 7: Relación entre la absorción medida de los tumores recogidos y la intensidad de pEGFR medida por inmunohistoquímica (IHC), teniendo en cuenta el volumen tumoral como factor de confusión (A): pEGFR versus captación, con el volumen tumoral mostrado como el área del punto, para los tres modelos de tumores. B-D: para cada modelo NCI-H441 (B), NCI-H3255 (C) y NCI-H1975 (D), correlación de captación y pEGFR determinada para volúmenes tumorales por debajo de 1000 mm^3 (puntos negros) o por encima de 1000 mm^3 (triángulos grises).

40 40 Figura 8: Captación tumoral normalizada con o sin competencia con gefitinib o con el Compuesto (IIa). (en % de DI/g). (A) Captación tumoral - Biodis 90 min, 6 MBq; (B) Captación tumoral - Biodis 180 min, 30 MBq; (C) T/M - Biodis 90 min, 6 MBq; (D) T/M - Biodis 180 min, 30 MBq.

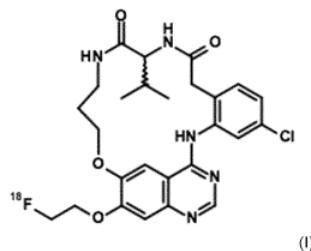
45 45 Figura 9: Curvas de actividad temporal (% de dosis inyectada corregida para la desintegración radiactiva en función del tiempo) de los compuestos I, II y III en órganos principales medidos por TEP dinámica después de una única inyección en ratas Sprague-Dawley. (A) Resultados de los compuestos I, II y III en riñones e hígado; (B) Resultados de los compuestos I, II y III en intestinos, riñón, hígado y estómago.

Descripción detallada de la invención

50 50 La presente invención se describirá ahora con más detalle. En los siguientes pasajes, se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

55 55 A menos que el contexto indique lo contrario, los asteriscos se utilizan en este documento para indicar el punto en el que un radical mono o bivalente representado está conectado a la estructura a la que se refiere y de la que el radical forma parte.

60 60 Como ya se mencionó anteriormente, en un primer aspecto la presente invención proporciona compuestos de Fórmula (I), o cualquier sal, polimorfo, solvato, hidrato, estereoisómero, radioisótopo o tautómero farmacéuticamente aceptable de los mismos.



5 Los compuestos de la invención pueden contener un átomo de carbono asimétrico que sirve como centro quiral, lo que puede conducir a diferentes formas ópticas (por ejemplo, enantiómeros). La invención comprende todas estas formas ópticas en todas las configuraciones posibles, así como mezclas de las mismas.

10 De manera más general, a partir de lo anterior, resultará claro para el experto en la materia que los compuestos de la invención pueden existir en forma de diferentes tautómeros, isómeros geométricos, isómeros conformacionales, isómeros E/Z, isómeros estereoquímicos (es decir, enantiómeros y diastereoisómeros). Todos estos posibles tautómeros diferentes, isómeros geométricos, isómeros conformacionales, isómeros E/Z, isómeros estereoquímicos (es decir, enantiómeros y diastereoisómeros) y mezclas de los mismos están incluidos dentro del alcance de la invención.

15 Siempre que se utilice en la presente invención, el término "compuestos de la invención" o un término similar incluye los compuestos de Fórmula general (I), (II) o (III) (es decir, los compuestos radiomarcados). El subgrupo de los mismos de Fórmula (Ia), (IIa) o (IIIa) (es decir, los compuestos "fríos") son solo parte de la descripción. Este término también se refiere a cualquier sal, polimorfo, solvato, hidrato, estereoísomerio, radioisótopo o tautómero farmacéuticamente aceptable del mismo. Los compuestos (Ib), (IIb) y (IIIb) son compuestos precursores usados en la preparación de compuestos de la invención. En la tabla A se puede encontrar una descripción general de la lista de compuestos de la invención y compuestos precursores.

Tabla A

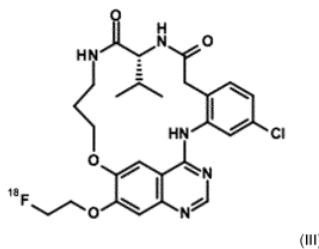
 Compuesto I	 Compuesto Ia	 Compuesto precursor Ib
 Compuesto II	 Compuesto IIa	 Compuesto precursor IIb
 Compuesto III	 Compuesto IIIa	 Compuesto Precursor IIIb

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el,

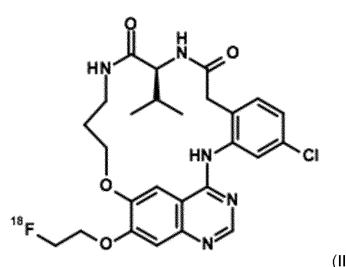
la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A modo de ejemplo, "un compuesto" significa un compuesto o más de un compuesto.

5 Los términos descritos anteriormente y otros usados en la memoria descriptiva son bien entendidos por los expertos en la técnica.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (III), es decir, que es el enantiómero R del compuesto de fórmula (I).



10 En una realización alternativa, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (II), es decir, que es el enantiómero S del compuesto de fórmula (I).



15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III), que opcionalmente comprende además uno o más vehículos y/o diluyentes inertes. En una realización preferida, la presente invención proporciona una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con la fórmula (II), que opcionalmente comprende además uno o más vehículos y/o diluyentes inertes.

20 En otro aspecto más, la invención preventiva proporciona el uso de un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III), o una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III); como agente de diagnóstico en medicina humana.

25 La presente invención proporciona además el uso de un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III), o una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III); en formación de imágenes de tumores.

30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III), o una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III) para su uso en un método de diagnóstico *in vivo* o formación de imágenes de tumores.

35 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para la formación de imágenes de diagnóstico de un tumor asociado a EGFR en un ser humano, que comprende administrar a un ser humano que necesita dicha formación de imágenes de diagnóstico una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III), o una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III); y obtener una imagen útil para cuantificar EGFR en el tumor de dicho ser humano mediante tomografía por emisión de positrones.

40 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la cuantificación del EGFR en tejido humano, que comprende poner en contacto dicho tejido humano en el que se desea la cuantificación con una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III), o una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de fórmula (I), (II) o (III); y detectar o cuantificar el EGFR usando tomografía por emisión de positrones.

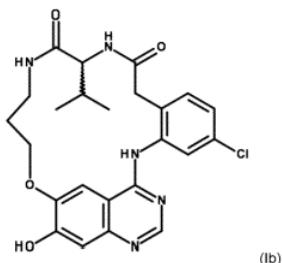
45 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los esquemas de reacción proporcionados en los ejemplos a continuación, pero los expertos en la técnica apreciarán que estos son solo

ilustrativos para la invención y que los compuestos de esta invención se pueden preparar mediante cualquiera de varios procesos de síntesis estándar usados comúnmente por los expertos en la técnica de la química orgánica.

5 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para preparar un compuesto radiomarcado de acuerdo con la fórmula (I); dicho método comprende la etapa de hacer reaccionar compuestos radiomarcados



10 con un compuesto de fórmula (Ib)

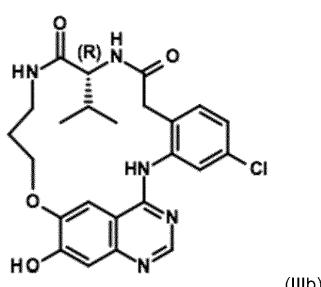


y aislar el compuesto resultante de fórmula (I).

15 En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para preparar un compuesto radiomarcado de acuerdo con la fórmula (II); dicho método comprende la etapa de hacer reaccionar compuestos radiomarcados



20 con un compuesto de fórmula (IIb)



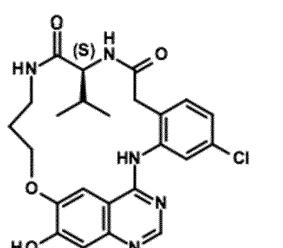
25 y aislar el compuesto resultante de fórmula (III)

En una realización alternativa, la presente invención proporciona un método para preparar un compuesto radiomarcado de acuerdo con la fórmula (III); dicho método comprende la etapa de hacer reaccionar compuestos radiomarcados

30 con un compuesto de fórmula (IIIb)



con un compuesto de fórmula (IIIb)



35 y aislar el compuesto resultante de fórmula (II)

Método de diagnóstico

- La presente invención proporciona un compuesto o composición para su uso en un método para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento del cáncer, más en particular al menos una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que comprende cáncer de pulmón de células no pequeñas, cánceres pancreático, hepatocelular, esofágico, gástrico, colorrectal, de próstata, cervical, renal, de ovario, de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y glioma maligno.
- Para uso diagnóstico, los compuestos de la invención pueden usarse como un ácido o base libre, y/o en forma de una sal de adición de ácido y/o de adición de base farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, obtenida con un ácido o base orgánico o inorgánico no tóxico), en forma de hidrato, solvato y/o complejo.
- Como se usa en este documento y a menos que se indique lo contrario, el término "solvato" incluye cualquier combinación que pueda ser formada por un compuesto de esta invención con un solvente inorgánico adecuado (por ejemplo, hidratos) o solvente orgánico, tal como pero no limitado a alcoholes, cetonas, ésteres y similares. Tales sales, hidratos, solvatos, etc. y la preparación de los mismos serán claros para el experto en la materia; se hace referencia, por ejemplo, a las sales, hidratos, solvatos, etc. descritos en los documentos US-A-6.372.778, US-A-6.369.086, US-A-6.369.087 y US-A-6.372.733.
- Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención, es decir, en forma de productos solubles en agua, aceite o dispersables, incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario que se forman, por ejemplo, a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. Ejemplos de tales sales de adición de ácido incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftaleno-sulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales básicas incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, etc. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico se pueden cuaternizar con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo; y diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo tales como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen la sal sulfato etanolato y las sales sulfato.
- Generalmente, para uso diagnóstico, los compuestos de la invención pueden formularse como una preparación de diagnóstico o composición radiofarmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención y al menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- Por medio de ejemplos no limitantes, tal formulación puede estar en una forma adecuada para administración parenteral (tal como por infusión intravenosa). Tales formas de administración adecuadas, así como métodos y vehículos, diluyentes y excipientes para usar en la preparación de las mismas, serán claras para el experto en la materia; de nuevo se hace referencia, por ejemplo, a los documentos US-A-6.372.778, US-A-6.369.086, US-A-6.369.087 y US-A-6.372.733, así como a los manuales estándar, tales como la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences.
- Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de tales preparaciones incluyen soluciones inyectables estériles para administración como un bolo y/o para administración continua, que se pueden formular con vehículos, excipientes y diluyentes que son adecuados por sí mismos para tales formulaciones. Además, los codisolventes tales como alcoholes pueden mejorar la solubilidad y/o la estabilidad de los compuestos. En la preparación de composiciones acuosas, la adición de sales de los compuestos de la invención puede ser más adecuada debido a su mayor solubilidad en agua.
- Las preparaciones farmacéuticas de la invención están preferiblemente en una forma de dosificación unitaria, y pueden empacarse en forma adecuada, por ejemplo, en una caja, blíster, vial, botella, sobre, ampolla o en cualquier otro recipiente o contenedor adecuado para dosis únicas o dosis múltiples (que puede estar marcado adecuadamente); opcionalmente con uno o más folletos que contienen información del producto y/o instrucciones de uso. Los compuestos pueden administrarse por vía intravenosa. Al menos un compuesto de la invención generalmente se administrará en una "cantidad eficaz", por lo que se entiende cualquier cantidad de un compuesto de Fórmula (I), (II) o (III) o cualquier subgrupo de los mismos que, tras una administración adecuada, sea suficiente para permitir la formación de imágenes de diagnóstico en el individuo al que se administra. Por lo general, dependiendo de la afección de la que se va a obtener la imagen, dicha cantidad efectiva generalmente estará entre 1-10 MBq por kilogramo de peso corporal por día del paciente por administración, más a menudo entre 3-5 MBq/kg, por kilogramo de peso corporal por día del paciente, que puede administrarse como una sola dosis diaria. El radiólogo o el físico nuclear pueden determinar la o las cantidades a administrar y la vía de administración, dependiendo de factores tales como la edad, el género y el estado general del paciente.

La invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos de síntesis y biológicos, que no limitan el alcance de la invención de ninguna manera.

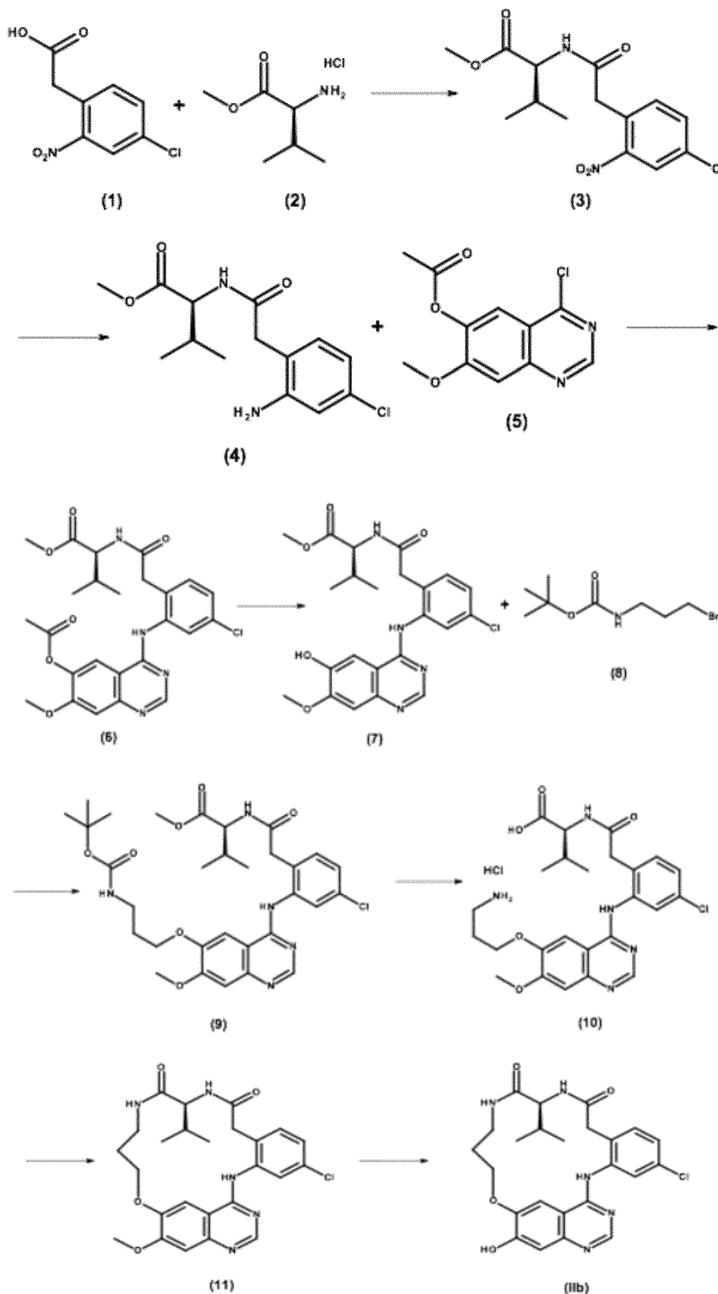
5 Ejemplos

Rutas de síntesis

Preparación de la fórmula del compuesto precursor (IIb)

10

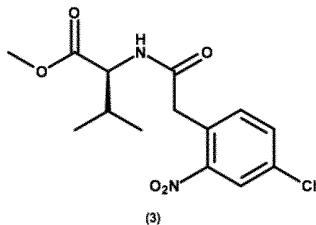
La preparación del compuesto precursor (IIb) se describe en el Esquema 1.



Esquema 1

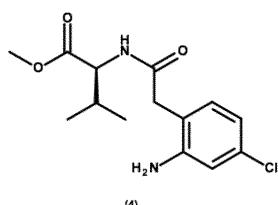
20 Siguiendo el Esquema 1, partiendo de (2S)-2-amino-3-metil-butanoato de metilo, se obtiene una mezcla en la que el enantiómero S de fórmula (IIb) es el enantiómero que se encuentra principalmente. El enantiómero S (IIb) se puede separar del enantiómero R (IIlb) mediante HPLC quirial.

Compuesto intermedio (3)



- 5 A una solución agitada de ácido 2-(4-cloro-2-nitrofenil)acético (10,0 g, 46,38 mmol) y clorhidrato de (2S)-2-amino-3-metilbutanoato de metilo (7,78 g, 46,38 mmol) en acetonitrilo (139 mL) se le añadieron hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (21,11 g, 55,66 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (23,42 mL, 139,14 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió acetato de etilo y se lavó la capa orgánica con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

10 Compuesto intermedio (4)

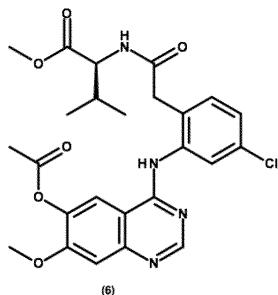


- 15 Una mezcla del compuesto intermedio (3) (46,38 mmol), hierro (12,95 g, 231,90 mmol) y cloruro de amonio (24,81 g, 463,80 mmol) en tolueno, tetrahidrofurano y agua (450 mL) se agitó a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió, se filtró y el residuo se lavó con una mezcla de tetrahidrofurano y metanol (4: 1). El disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó mediante chromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice.

20 Rendimiento: 12,0 g de compuesto intermedio (4) (87%)

Método 1 de LCMS: $MH^+ = 299$, RT = 0,763 min

25 Compuesto intermedio (6)

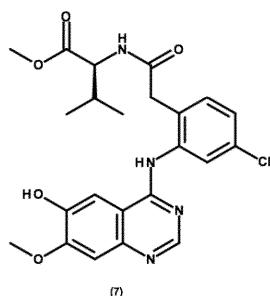


- 30 Se agitó una mezcla de acetato de (4-cloro-7-metoxi-quinazolin-6-ilo) (10,02 g, 39,66 mmol) y el compuesto intermedio (4) (11,85 g, 39,66 mmol) en isopropanol (119 mL) a 80 °C durante 5 horas. La mezcla se enfrió y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

35 Rendimiento: 9,64 g del compuesto intermedio (6) (47%)

Método 1 de LCMS: $MH^+ = 492$, RT = 0,430 min

35 Compuesto intermedio (7)



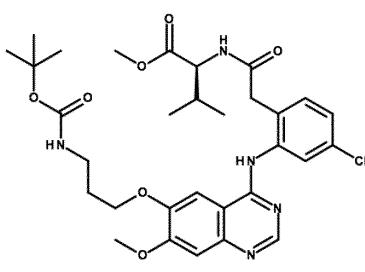
(7)

Se añadió amoniaco en metanol (7 N) (38 mL) a una solución del compuesto intermedio (6) (13,87 g, 26,93 mmol) en metanol (110 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

5
Método 1 de LCMS: $MH^+ = 473$, RT = 0,618 min

Compuesto intermedio (9)

10

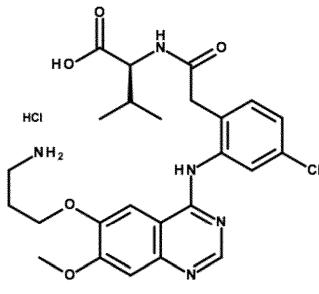


(9)

Se añadió carbonato de cesio (9,36 g, 28,74 mmol) a una solución del compuesto intermedio (7) (9,06 g, 19,16 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (57,5 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió N-(3-bromopropil)carbamato de terc-butilo (5,02 g, 21,08 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

15
Rendimiento: 11,48 g del compuesto intermedio (9) (95%)
20
Método 1 de LCMS: $MH^+ = 630$, RT = 0,877 min

Compuesto intermedio (10)

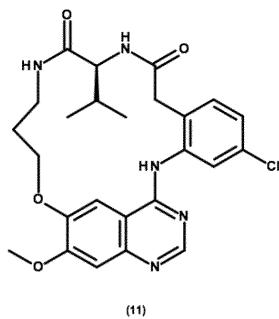


(10)

25
Se disolvió el compuesto intermedio (9) (11,48 g, 18,22 mmol) en 1,4-dioxano (227 mL) y se añadió una solución de ácido clorhídrico 12 N (45,5 mL, 546,60 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 3 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se lavó con éter dietílico y se secó a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

30
Método 1 de LCMS: $MH^+ = 517$, RT = 0,366 min

Compuesto intermedio (11)



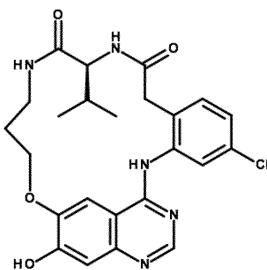
(11)

Se añadió una solución del compuesto intermedio (10) (3,30 g, 5,97 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 mL) durante un período de 2 horas a una solución de , Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (4,98 g, 13,13 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (30,5 mL, 179,16 mmol) en N,N-dimetilformamida (200 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El disolvente se eliminó a presión reducida. Se añadió diclorometano y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se lavó con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron, filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cristalización en acetonitrilo.

10 Rendimiento: 1,55 g del compuesto intermedio (11) (52%)

Método 1 de LCMS: $MH^+ = 498$, RT = 0,581 min

Compuesto intermedio (IIb)



(IIb)

15

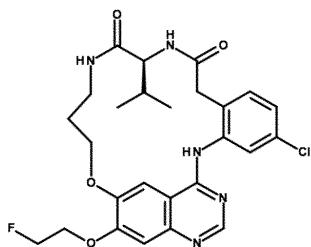
El experimento se realizó en 6 lotes con 0,3 g del compuesto intermedio (11) cada uno.

20 Se añadió gota a gota agua (2 gotas/mL de N,N-dimetilacetamida) a una mezcla del compuesto intermedio (11) (0,3 g, 0,60 mmol), cloruro de litio (0,25 g, 5,90 mmol) y sulfuro disódico (0,515 g, 6,60 mmol) en N,N-dimetilacetamida (8 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y a 140 °C durante 4 horas. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se lavó con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron, filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cristalización en acetonitrilo.

25 Rendimiento: 2,22 g del compuesto intermedio (IIb) (85%)

Método 2 de LCMS: $MH^+ = 484$, RT = 2,000 min

Preparación del análogo frío (IIa)



30

IIa

35 A una solución del compuesto intermedio (IIb) (110 mg, 0,23 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (4,0 mL) se le añadió carbonato de cesio (91 mg, 0,28 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una solución de 1-fluoro-2-yodo-etano (260 mg, 1,5 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (1,0 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice. Rendimiento: 54 mg de compuesto (IIa) (44%), pureza = 99%.

Método 2 de LCMS: $MH^+ = 530$, RT = 2,443 min.

La separación quiral de los dos enantiómeros se puede lograr en el compuesto precursor (IIb) o en el análogo frío (IIa). Como ejemplo, pero no limitativo, se ha descrito la separación quiral de una mezcla 30/70 de R/S de un compuesto de fórmula (IIb).

Separación quiral del compuesto precursor de fórmula (IIb):

Método preparativo:

Columna: CHIRALPAK® IA 5 μ m - 250 x 30 mm
 Fase móvil: dióxido de carbono/(etanol + dietilamina al 1%) 60/40
 Caudal: 120 mL/min
 Detección: UV 230 nm
 Presión de salida: 120 bar
 Temperatura: 25 °C

Método analítico:

Columna: CHIRALPAK® AD-H 5 μ m - 250 x 4,6 mm
 Fase móvil: n-heptano/etanol/etilendiamina 80/20/0,1
 Caudal: 1 mL/min
 Detección: DAD 300 nm
 Temperatura: 25 °C

Resultados:

A partir de 420 mg de materia cruda:

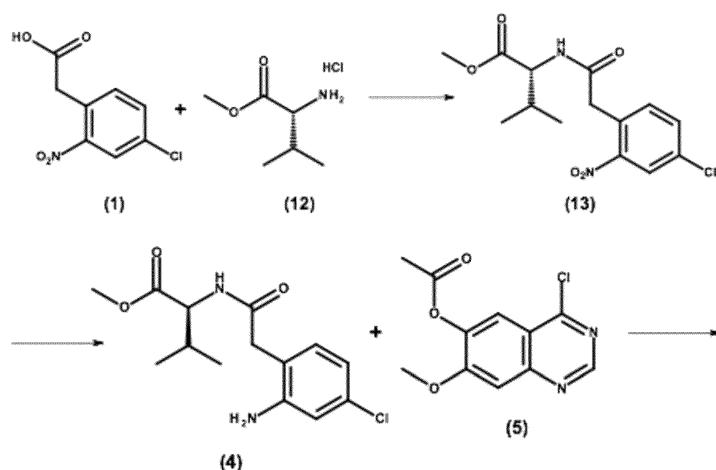
Primera enantiómero en eluir enantiómero (R) puro (IIb)	Segundo enantiómero en eluir enantiómero (S) puro (IIb)
Tiempo de retención (min) = 4,5	Tiempo de retención (min) = 5,9
Cantidad (mg) = 38	Cantidad (mg) = 313
Pureza química (% de área a 314 nm) = 99,3	Pureza química (% de área a 314 nm) > 99,5
Exceso enantiomérico (%) = 99,2	Exceso enantiomérico (%) = 99,0

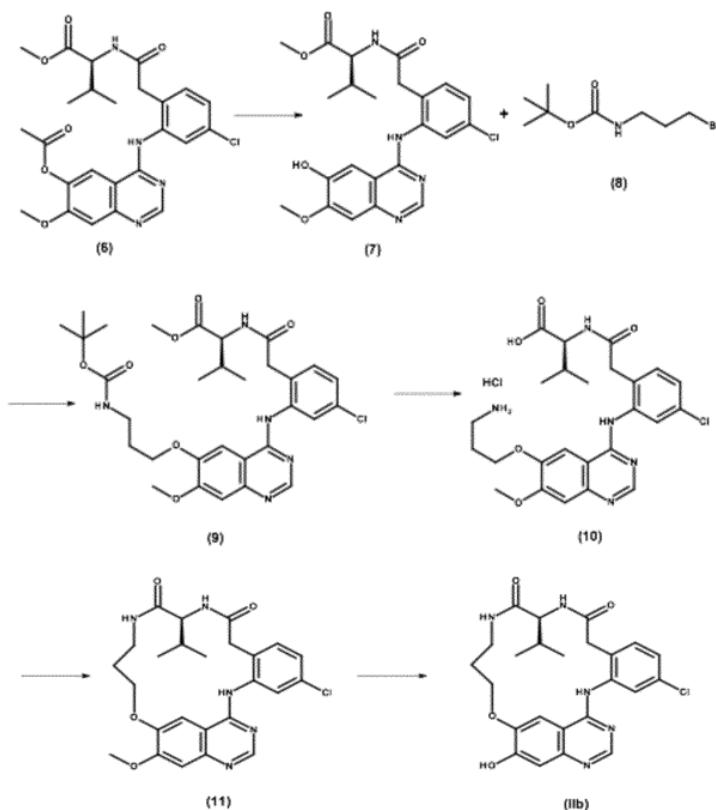
Los enantiómeros puros pueden usarse para realizar la etapa de alquilación (en frío o con ^{18}F).

Los análogos del enantiómero (R) del compuesto intermedio (IIb) y el compuesto (IIa) se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos experimentales descritos anteriormente.

Preparación del compuesto precursor de fórmula (IIb)

La preparación del compuesto precursor (IIb) se describe en el Esquema 2.

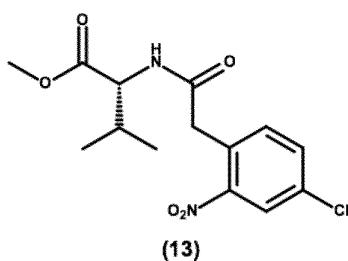




Esquema 2

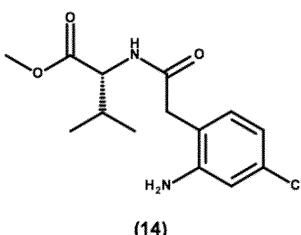
- 5 Siguiendo el esquema 2, partiendo de (2*R*)-2-amino-3-metil-butanoato de metilo, se obtiene una mezcla en la que el enantiómero R de fórmula (IIIb) es el enantiómero que se encuentra principalmente. El enantiómero R (IIIb) se puede separar del enantiómero S (IIb) mediante HPLC quiral.

10 Compuesto intermedio (13)



- 15 A una solución agitada de ácido 2-(4-cloro-2-nitro-fenil)acético (12,86 g, 59,65 mmol) y clorhidrato de (2*R*)-2-amino-3-metil-butanoato de metilo (10,0 g, 59,65 mmol) en acetonitrilo (179 mL) se le añadieron hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-*il*)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (27,147 g, 71,58 mmol) y N,N-disopropiletilamina (31,172 mL 178,95 mmol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

- 20 Compuesto intermedio (14)



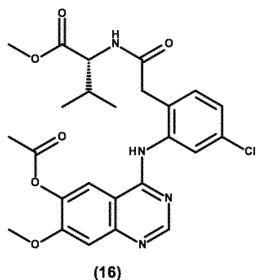
(14)

Se preparó una mezcla del compuesto intermedio (13) (59,65 mmol), hierro (16,66 g, 298,95 mmol) y cloruro de amonio (31,907 g, 596,5 mmol) en tolueno, tetrahidrofurano y agua (1: 1: 1, 450 mL). se agitó a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió, se filtró y el residuo se lavó con una mezcla de tetrahidrofurano y metanol (4: 1). El disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice.

5 Rendimiento: 16,5 g del compuesto intermedio (14) (93%)

10

Compuesto intermedio (16)

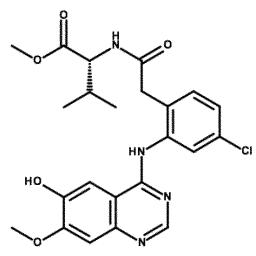


(16)

15 Se agitó una mezcla de acetato de (4-cloro-7-metoxi-quinazolin-6-ilo) (9,553 g, 37,81 mmol) y el compuesto intermedio (14) (11,30 g, 37,81 mmol) en isopropanol (113,4 mL) a 80 °C durante 5 horas. La mezcla se enfrió y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

20 Rendimiento: 19 g del compuesto intermedio (16) (98%)
Método 1 de LCMS: $MH^+ = 515$, RT = 1,209 min

Compuesto intermedio (17)



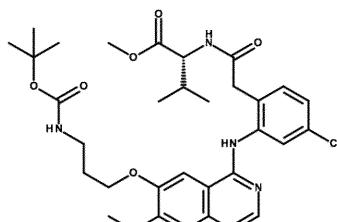
(17)

25

Se añadió amoníaco en metanol (7 N) (60 mL) a una solución del compuesto intermedio (16) (19,00 g, 36,90 mmol) en metanol (110,7 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

30 Rendimiento: 13,6 g del compuesto intermedio (17) (78%)

Compuesto intermedio (19)



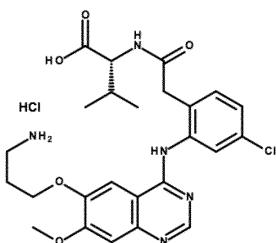
(19)

Se añadió carbonato de cesio (14,056 g, 43,14 mmol) a una solución del compuesto intermedio (17) (13,60 g, 28,76 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (86,3 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió

5 N-(3-bromopropil)carbamato de terc-butilo (6,85 g, 28,76 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó mediante chromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando heptano y acetato de etilo como eluyentes.

10 Rendimiento: 3,05 g del compuesto intermedio (19) (17%)
Método 1 de LCMS 1: $MH^+ = 630$, RT = 1,474 min

Compuesto intermedio (20)



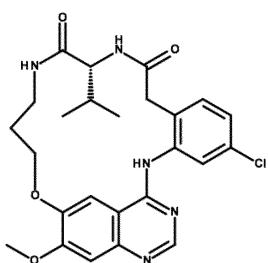
(20)

15

Se disolvió el compuesto intermedio (19) (2,635 g, 4,18 mmol) en 1,4-dioxano (55 mL) y se añadió una solución de ácido clorhídrico 12 N (10,9 mL, 125,40 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 3 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se lavó con éter dietílico y se secó a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

20

Compuesto intermedio (21)



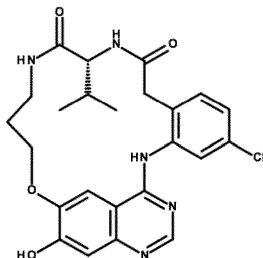
(21)

25

Se añadió una solución del compuesto intermedio (20) (3,05 g, 5,52 mmol) en N,N-dimetilformamida (150 mL) durante un período de 2 horas a una solución de Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (2,09 g, 5,52 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (28,163 mL, 165,60 mmol) en N,N-dimetilformamida (250 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió una solución de amoniaco (solución 7 N en metanol, 2 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El disolvente se eliminó a presión reducida. Se añadió diclorometano y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron, filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó mediante chromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando diclorometano y metanol (20%) como eluyentes. Se recogieron las fracciones de producto y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto se trituró con metanol, se filtró y el sólido se secó a presión reducida.

30 35 Rendimiento: 750 mg del compuesto intermedio (21) (27%)

Compuesto intermedio (IIIb)



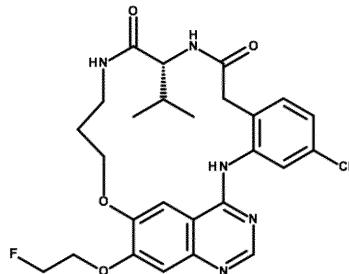
(IIIb)

- 5 El experimento se realizó en 9 lotes con 0,3 g del compuesto intermedio (21) cada uno.

Se añadió gota a gota agua (2 gotas/mL de N,N-dimetilacetamida) a una mezcla del compuesto intermedio (21) (0,3 g, 0,60 mmol), cloruro de litio (0,25 g, 6,00 mmol) y sulfuro disódico (0,515 g, 6,60 mmol) en N,N-dimetilacetamida (8 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y a 140 °C durante 4 horas. Se añadió 10 más sulfuro disódico (0,4 eq) y la mezcla de reacción se agitó a 140 °C durante 1 hora. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron, filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cristalización en acetonitrilo, el sólido se filtró y se lavó con éter dietílico. El compuesto se secó a presión reducida.

15 Rendimiento: 164 mg del compuesto intermedio (IIIb) (56%)

Preparación del análogo frío (IIIa)



(IIIa)

20 A una solución del compuesto intermedio (IIIb) (156 mg, 0,32 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (5,0 mL) se le añadió carbonato de cesio (124 mg, 0,38 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió 25 una solución de 1-fluoro-2-yodo-etano (110 mg, 0,64 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (1,0 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice. El producto se trituró con éter dietílico, se filtró y se secó a presión reducida.

Rendimiento: 95 mg del compuesto (IIIa) (56%)

Método 2 de LCMS: $MH^+ = 530$, RT = 2,537 min

30 La separación quiral de los dos enantiómeros se puede lograr en el compuesto precursor (IIIb) o en el análogo frío (IIIa). Como ejemplo, pero no limitativo, se ha descrito la separación quiral de una mezcla 70/30 de R/S de un compuesto de fórmula (IIIa).

35 Separación quiral del compuesto de fórmula (IIIa):

Método preparativo:

40 Columna: CHIRALPAK®AD-H 5 μ m - 250 x 30 mm

Fase móvil: etanol/metanol 50/50

Caudal: 30 mL/min

Detección: UV 250 nm

Temperatura: 25 °C

Método analítico:

Columna: CHIRALPAK® IA 5 μ m - 250 x 4,6 mm
 Fase móvil: Heptano/Isopropanol/Etilendiamina 50/50/0,1
 5 Caudal: 1 mL/min
 Detección: DAD 336 nm
 Temperatura: 35 °C
 Muestras disueltas en etanol al 100%

10 Resultados:

A partir de 141 mg de material crudo (IIIa):

Primera enantiómero en eluir enantiómero (R) puro (IIIa)	Segundo enantiómero en eluir enantiómero (S) puro (IIIa)
Tiempo de retención (min) = 3,7	Tiempo de retención (min) = 5,6
Cantidad (mg) = 90	Cantidad (mg) = 42
Pureza química (% de área a 314 nm) = 99,5	Pureza química (% de área a 314 nm) > 99,5
Exceso enantiomérico (%) = 99,5	Exceso enantiomérico (%) = 98,8

15 Identificación de compuestos

LCMS

Para la caracterización por LCMS de los compuestos de la presente invención, se utilizó el siguiente método.

20 Procedimiento general de LCMS

Todos los análisis se realizaron usando un cuadrupolo LC/MSD Agilent serie 6110 acoplado a un sistema de cromatografía líquida (LC) Agilent serie 1290 que consta de una bomba binaria con desgasificador, muestreador automático, compartimento de columna termostatado y detector de arreglo de diodos. El espectrómetro de masas (MS) se hizo funcionar con una fuente de ionización por electroaspersión a presión atmosférica (API-ES) en modo de 25 iones positivos. El voltaje capilar se fijo en 3000 V, el voltaje del fragmentador en 70 V y la temperatura del cuadrupolo se mantuvo a 100 °C. Los valores de temperatura y flujo de gas de secado fueron 12,0 L/min y 350 °C respectivamente. 30 Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador, a una presión de 35 psig. La adquisición de datos se realizó con el software Agilent Chem Station.

Método 1 de LCMS

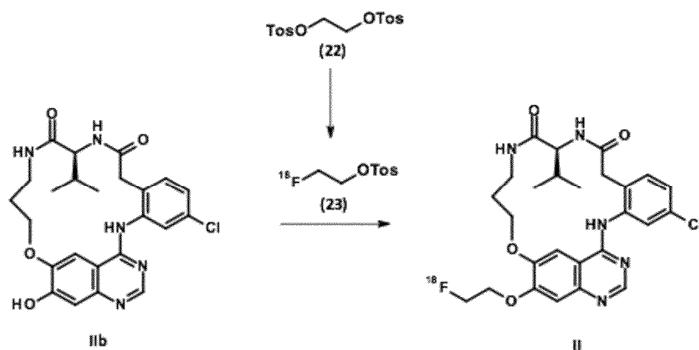
Además del procedimiento general de LCMS1: Los análisis se llevaron a cabo en una columna Phenomenex Kinetex 35 C18 (50 mm de largo x 2,1 mm diámetro interno; partículas de 1,7 μ m) a 60 °C, con un caudal de 1,5 mL/min. Se realizó una elución en gradiente de 90% (agua + ácido fórmico al 0,1%)/acetonitrilo al 10% hasta 10% (agua + ácido 40 fórmico al 0,1%)/acetonitrilo al 90% en 1,50 minutos, luego se mantuvo la composición de la fase móvil final durante un período de 0,40 min adicionales. El volumen de inyección estándar fue de 2 μ L. Los intervalos de adquisición se fijaron en 254 nm para el detector de UV-PDA y 80-800 m/z para el detector de MS.

Método 2 de LCMS

Además del procedimiento general de LCMS1: los análisis se llevaron a cabo en una columna empacada ODS-AQ 45 C18 de YMC (50 mm de largo x 4,6 mm de diámetro interno; partículas de 3 μ m) a 35 °C, con un caudal de 2,6 mL/min. Se realizó una elución en gradiente de 95% (agua + ácido fórmico al 0,1%)/acetonitrilo al 5% hasta 5% (agua + ácido fórmico al 0,1%)/acetonitrilo al 95% en 4,80 minutos, luego se mantuvo la composición de la fase móvil final durante 1,00 min adicionales. El volumen de inyección estándar fue de 2 μ L. Los intervalos de adquisición se establecieron en 190-400nm para el detector de UV-PDA y 100-1400 m/z para el detector de MS.

50 Preparación del compuesto final radiomarcado (II)

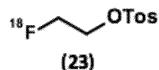
La preparación del compuesto final radiomarcado (II) se describe en el Esquema 3.



Esquema 3

5 La síntesis de los compuestos radiomarcados se realiza en un sintetizador automático (TracerLab FX-FN Pro, GE Healthcare).

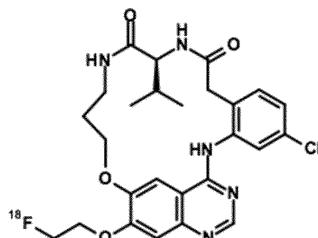
Compuesto intermedio radiomarcado (23) [¹⁸F]Fluoroetiltosilato:



10 Se produjo un ion fluoruro con ¹⁸F acuoso sin portador añadido en un ciclotrón (trazas de PET, GE Healthcare) por irradiación de H₂O enriquecido con ¹⁸O con protones a través de la reacción nuclear ¹⁸O(p, n)¹⁸F. Se transfirió el fluoruro con ¹⁸F a un sintetizador FX-FN de GE TRACERlab y se pasó a través de una resina de intercambio aniónico (cartucho Waters Sep-Pak Accell Light QMA en forma de carbonato). Se aisló el fluoruro con ¹⁸F atrapado mediante elución con una solución de eluyente acuoso que contenía K₂CO₃ (7 mg en 300 µL de agua pura), acetonitrilo (300 µL) y 22 mg de Kryptofix-222 (4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabiciclo[8.8.8]hexacosano). Se realizó un secado azeotrópico mediante la adición de ACN (1 mL). La evaporación se realizó a 90 °C bajo flujo de helio y vacío, y la operación se repitió dos veces.

20 Se añadió el ditosilato de etileno (10 mg en 350 µL de ACN) al reactor 1 que contenía el fluoruro. El reactor se calentó a 90 °C durante 7 min y luego se enfrió a 30 °C. Se purificó [¹⁸F]fluoroetiltosilato en un cartucho de sílice (Sep Pak Plus, WAT020520, Waters) acondicionado con diclorometano (DCM) y ciclohexano (5 mL, 5/5: v/v). Se añadieron al reactor 2 mL de DCM/ciclohexano (5/5: v/v). La mezcla se pasó a través del cartucho y se desecharó el eluado. El [¹⁸F]fluoroetiltosilato se eluyó del cartucho usando 1,5 mL de DCM/ciclohexano (7/3: v/v) al reactor 2. Los disolventes se eliminaron a presión atmosférica calentando bajo un flujo de helio. La misma operación se repitió una vez.

25 Compuesto final radiomarcado (II)

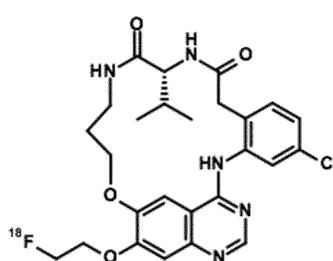


30 En el reactor 2 del módulo FX-FN Pro que contiene el [¹⁸F]fluoroetiltosilato seco se añadió el compuesto intermedio IIb (3 mg en 400 µL de DMSO) con 2,8 mg de carbonato de cesio (2,8 mg en 20 µL de agua). El reactor se puso bajo presión y se calentó a 100 °C durante 20 min. Luego se enfrió el reactor a 30-35 °C y se añadieron 1,5 mL de acetato de amonio (0,1 M)/ACN (6/4: v/v) para diluir la solución cruda. La solución se cargó en el circuito y se purificó mediante HPLC integrado en el módulo FX-FN Pro. La purificación se realizó en una columna Agilent XDB C18 de 5 µm de 9,4 x 250 mm con acetato de amonio (0,1 M)/ACN (6/4: v/v) como fase móvil y un flujo de 4 mL/min. En estas condiciones, el tiempo de retención es de alrededor de 16 min. La fracción recogida se diluyó con 30 mL de agua y se pasó a través de un cartucho ligero tC18 (Waters). El cartucho se enjuagó con 5 mL de agua y el compuesto radiomarcado final se eluyó del cartucho usando 500 µL de etanol inyectable. La formulación se completó añadiendo 3,5 mL de suero fisiológico.

35 Mediante este método, se puede obtener el compuesto radiomarcado final con una pureza radioquímica superior al 98% en 100-110 min con un rendimiento que puede alcanzar el 25% (desintegración corregida). Se ha observado que

una evaporación incompleta de los disolventes usados para la purificación de [¹⁸F]fluoroetiltosilato dificulta la segunda etapa y conduce a rendimientos más bajos. La actividad específica de las producciones estuvo en el intervalo de 70-150 GBq/μmol. El compuesto radiomarcado es estable en las condiciones de formulación con una pureza radioquímica aún superior al 95% 20 horas después de la producción con un almacenamiento a temperatura ambiente. También se comprobó la estabilidad plasmática hasta 4 horas sin degradación significativa del producto.

5 El compuesto radiomarcado enantiómero (R) de fórmula (III) se puede preparar de acuerdo con los procedimientos experimentales descritos anteriormente.



10 (III)

Ensayos *in vitro* e *in vivo*

15 A menos que se indique específicamente, los ensayos *in vitro* e *in vivo* se han realizado usando una mezcla de compuesto R (30%) y S (70%).

Determinación de IC₅₀ bioquímica y perfil de selectividad

20 Se usó un ensayo radiométrico de proteína quinasa (ensayo de actividad con ³³PanQinase®) para medir la actividad quinasa bioquímica de 3 proteínas quinasas, EGFR de tipo silvestre y 2 mutantes del EGFR (L858R, L858R/T790M). Los compuestos se probaron en DMSO al 100%, todas las proteínas quinasas recombinantes y sustratos con la concentración respectiva se describen en la Tabla 1.

25 Tabla 1: Proteínas quinasas recombinantes y sustratos utilizados para los ensayos de actividad bioquímica de quinasas

Quinasa	ATP		Sustrato	
	Nombre	Conc. nM	Conc. μM	Nombre
L858R de EGFR (humana, 672-1210)	4,5	1,0	poli(Glu, Tyr) 4:1	0,25
T790M/L858R de EGFR (humana, 672-1210)	2,2	0,3	poli(Glu, Tyr) 4:1	0,125
EGFR tipo silvestre (humana, 672-1210)	4,4	0,3	poli(Glu, Tyr) 4:1	0,125

30 El compuesto (IIa) y gefitinib, usados como compuesto de referencia dirigidos a EGFR (tipo silvestre y mutante L858R pero no L858R/T790M) se perfilaron frente a las 3 formas del EGFR. La actividad del compuesto (IIa) contra EGFR TS y mutante L858R del EGFR estaba por debajo de 10 nM, en el mismo intervalo que gefitinib (Tabla 2). Por otro lado, la actividad bioquímica contra el doble mutante L858R/T790M del EGFR mejoró en comparación con gefitinib.

Tabla 2a: Actividades bioquímicas en nM del Compuesto la en comparación con gefitinib

IC ₅₀ bioquímica (nM)	Compuesto (Ia) - Prueba 1	Compuesto (Ia) - Prueba 2	Compuesto (Ia) - Prueba 3	gefitinib
EGFR TS (activado)	3,2	5	5,7	1,35
L858R de EGFR	3	8	4,1	1,8
L858R/T790M de EGFR	372	990	246	1350

35 Tabla 2b: Actividades bioquímicas en nM del Compuesto (IIa) y (IIia) después de la separación quiral

IC ₅₀ bioquímica (nM)	Compuesto (IIa) - Enantiómero (S) puro-Prueba 1	Compuesto (IIia) - Enantiómero (R) puro-Prueba 1
EGFR TS (activado)	5,9	3,1
L858R de EGFR	6,3	2,7
L858R/T790M de EGFR	924	77,7
T790M	1011	54,7

40 Se determinó la selectividad de quinasas frente a un panel de 92 quinasas de tipo silvestre, elegidas para representar la diversidad del kinoma, para el Compuesto (IIa) y gefitinib. La actividad residual de los compuestos se determinó a 100 nM y 1 μM siguiendo el mismo protocolo que la determinación de IC₅₀. Las quinasas y sustratos correspondientes siempre se probaron a la concentración Km de ATP. La selectividad se representa en un dendrograma con un tamaño

de punto proporcional a la actividad residual. La puntuación de selectividad S(50) se calcula como sigue:

$$S(50) = \frac{(número\ de\ quinasas\ inhibidas) > 50\%}{número\ de\ quinasas\ probadas}$$

- 5 La selectividad fue muy buena ya que EGFR y RIPK2 fueron las únicas quinasas de tipo silvestre inhibidas en más del 50% por el Compuesto (IIa) a la concentración de 100 nM (datos no mostrados). Este perfil es comparable al del gefitinib. A 1 μ M, que corresponde a > 100 veces en comparación con la actividad primaria contra EGFR TS o mutante L858R del EGFR, se observó una inhibición de > 50% en otras 9 quinasas (otras 2 quinasas para gefitinib). Las puntuaciones de selectividad S(50) son 2,2% y 11,9% respectivamente a 100 nM y 1 μ M.
- 10 Las puntuaciones de selectividad S(50) del compuesto (IIa) - enantiómero S puro - son 2,5% y 13% respectivamente a 100 nM y 1 μ M.
- 15 Las puntuaciones de selectividad S(50) del compuesto (IIIa) - enantiómero R puro - son 0,6% y 2,8% respectivamente a 100 nM y 1 μ M.

Actividad celular

- 20 Las líneas celulares que se utilizaron para ensayar la actividad celular de los compuestos se detallan en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3: Descripción de las líneas celulares y estado respectivo de la mutación de EGFR

Línea celular	Tipo	Estado de la mutación de EGFR	Especie
NCI-H441	Adenocarcinoma papilar de pulmón	TS	Humana
NCI-H3255	Adenocarcinoma de pulmón	Mutación simple, L858R	
NCI-H1975	Adenocarcinoma, de cáncer de pulmón de células no pequeñas	mutación doble, L858R/T790M	
MCF-7	Adenocarcinoma de derrame pleural	Expresión muy baja o nula, TS	

- 25 Las células tumorales crecieron como monocapa a 37 °C en una atmósfera humidificada (5% de CO₂) en medio de cultivo completo adaptado a cada línea celular. La actividad celular de los compuestos se evaluó midiendo la viabilidad de la célula cancerosa en el ensayo MTS usando un compuesto de tetrazolio (MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) y un reactivo de acoplamiento de electrones denominado PMS (metosulfato de fenazina). El MTS es biorreducido por las células en un producto de formazán que es directamente soluble en medio de cultivo sin procesamiento. Las células se sembraron 24 horas antes del tratamiento a la densidad apropiada en su medio de cultivo para estar cerca del 90% de confluencia al final del experimento en condiciones tratadas con vehículo. Después de la adición de compuestos, las células se incubaron durante 72 horas.

- 30 Como se muestra en la tabla 4, las actividades celulares están en el mismo intervalo para el Compuesto (IIa) y gefitinib. El compuesto (IIIa) mostró una actividad muy alta en NCI-H3255 (IC₅₀ media de 6,1 nM) y una actividad moderada en NCI-H1975 (IC₅₀ media de 5 μ M), mientras que tiene una actividad débil en NCI-H441 (IC₅₀ media de 34,7 μ M). También se realizó una serie de experimentos en MCF-7 que no expresa EGFR (control negativo). El compuesto (Ia) y los enantiómeros S (IIa) y R (IIIa) correspondientes tienen una actividad muy débil sobre MCF-7 (IC₅₀ de 62,1 μ M), lo que sugiere una buena selectividad celular.

- 40 Tabla 4: IC₅₀ del compuesto (Ia), compuesto (IIa) (es decir, enantiómero S puro) y compuesto (IIIa) (es decir, enantiómero R puro) comparado con gefitinib determinado por el ensayo MTS realizado en NCI-H441, NCI-H3255, NCI-H1975 y MCF-7

IC ₅₀ celular (μ M)	Compuesto (Ia)	Compuesto (IIa)-Enantiómero puro (S)	Compuesto (IIIa)-Enantiómero puro (R)	Gefitinib
NCI-H441 (EGFR TS)	34,7 \pm 24	> 25	> 25	14,9 \pm 2,7
NCI-H3255 (L858R de EGFR)	0,006 \pm 0,002	0,030/0,049	0,0008/0,056	0,012 \pm 0,007
NCI-H1975 (L858R/T790M de EGFR)	5,0 \pm 1,4	10/25	20/25	17,7 \pm 5,9
MCF-7	62,1	> 25	> 25	

Efecto de los compuestos sobre la fosforilación del EGFR

- 45 Para evaluar la inhibición de la fosforilación del EGFR inducida por el Compuesto (Ia) en comparación con gefitinib, las células se trataron con un intervalo de dosis de cada compuesto y se indujeron con 10 ng/mL de EGF. El efecto sobre la fosforilación de Y₁₀₆₈ se observó mediante transferencia Western (datos no mostrados). En NCI-H441, el Compuesto (Ia) inhibió la fosforilación inducida por EGF, a un nivel ligeramente mejor que el gefitinib, observándose

una inhibición casi completa a 1 μ M. En NCI-H3255, se observó la inhibición completa del EGFR constitutivamente activo. Esta inhibición de la quinasa se observó aproximadamente a 100 nM para el Compuesto (Ia), a un nivel similar a la inhibición de gefitinib. En el doble mutante de EGFR constitutivamente activo expresado por NCI-H1975, el gefitinib no es activo a la dosis máxima de 1 μ M, ya que esta línea celular adquirió resistencia a este fármaco a través de la mutación T790M. Curiosamente, el Compuesto (Ia) pareció inhibir parcialmente la actividad del EGFR a 10 μ M mientras que el gefitinib no lo hizo, mostrando de nuevo la inhibición ligeramente mejor de la actividad de la quinasa del EGFR de este nuevo compuesto fluorado en comparación con gefitinib.

Solubilidad y estabilidad

La solubilidad cinética de los compuestos se evaluó en PBS a pH 7,4. El Compuesto (Ia) mostró una buena solubilidad de 88 μ M en PBS (Tabla 5).

Tabla 5: Solubilidad y estabilidad del Compuesto (Ia) y el Compuesto (I)

Parámetro	Resultado
Solubilidad cinética a pH 7,4 (μ M) (Compuesto Ia)	88
Estabilidad radioquímica (h) (Compuesto I)	> 20
Estabilidad plasmática (h) (Compuesto Ia e I)	> 4
estabilidad microsomal humana (Compuesto Ia)	Clint (μ L/min/mg de prot.) t1/2 (min)
	7,76 \pm 2,53 179
estabilidad microsomal de rata (Compuesto Ia)	Clint (μ L/min/mg de prot.) t1/2 (mínimo)
	37,9 \pm 1,89 36,5

Después de la radiosíntesis, se evaluó la estabilidad del radiotrazador por HPLC tanto en su vehículo como en plasma de rata. El compuesto (I) se formuló en suero fisiológico/etanol con la proporción respectiva 87,5/12,5 (v/v). Una mezcla de compuestos (I) (es decir, radiomarcados) y (Ia) (es decir, análogo frío) fue estable durante hasta 20 horas a temperatura ambiente en su vehículo, detectándose solo un pico en el tiempo de retención esperado. En plasma de rata se detectaron dos picos: uno a los 3,15 minutos y otro a los 8,02 minutos (correspondiente a una mezcla de compuestos (I) y (Ia)) tras una incubación a +37 °C durante 4 horas. El área del pico correspondiente a dicha mezcla representó > 95% del área total de ambos picos, lo que indica que dicha mezcla fue estable en plasma humano hasta por 4 horas (datos no mostrados).

La estabilidad microsomal metabólica se realizó en microsomas de hígado de rata y humano. Los microsomas (concentración final de proteína 0,5 mg/mL), tampón de fosfato 0,1 M pH 7,4 y compuesto de prueba (concentración final de sustrato = 3 μ M; concentración final DMSO = 0,25%) se incubaron previamente a 37 °C antes de la adición de NADPH (concentración final = 1 mM) para iniciar la reacción. El análisis se realizó con condiciones genéricas de LC-MS/MS para determinar la vida media y la eliminación intrínseca utilizando ecuaciones estándar. El estudio de estabilidad microsomal mostró, en ratas, una vida media en el intervalo de 40 minutos para ambos compuestos fluorados y una eliminación superior a 30 μ L/min/mg de proteínas (Tabla 5). En humanos, la estabilidad metabólica del Compuesto (Ia) fue mejor que en ratas y favorable para los estudios clínicos.

Evaluación de la unión *in vitro* del compuesto (I) en muestras celulares o tumorales

La afinidad de unión del Compuesto (I) y el número de sitios de unión se evaluaron primero en homogeneizados de células tumorales NCI-H3255 y NCI-H441 (Figura 1). La afinidad de unión (K_d) del Compuesto (I) en homogeneizados de células tumorales NCI-H3255 fue de $23,8 \pm 9,0$ nM y el número de sitios de unión fue $9,1 \pm 3,1 \times 10^9$ sitios/ μ g de proteína. La afinidad del Compuesto (I) en homogeneizados de células tumorales NCI-H441 fue $25,8 \pm 11,1$ nM, siendo similar a la determinada en homogeneizados de células tumorales NCI-H3255. El número de sitios de unión fue del mismo orden de magnitud ($6,1 \pm 0,5 \times 10^9$ sitios/ μ g de proteína).

Se realizaron experimentos similares en homogeneizados tumorales NCI-H3255 y NCI-H1975 (Figura 2). Las afinidades de unión fueron similares: $2,8 \pm 2,4$ nM y $4,7 \pm 2,0$ nM para homogeneizados tumorales NCI-H3255 y NCI-H1975, respectivamente. El número de sitios de unión fue $1,1 \pm 1,5 \times 10^9$ y $1,6 \pm 1,8 \times 10^9$ sitios/ μ g de proteína, respectivamente, en homogeneizados tumorales NCI-H3255 y NCI-H1975.

Teniendo en cuenta el extracto de la línea celular NCI-H3255 y el homogeneizado tumoral, la afinidad y el número de sitios de unión obtenidos para homogeneizados de células y tumores parecían consistentes: afinidad de unión del mismo orden de magnitud y número de sitios de unión 8 veces menor en homogeneizados de tumores que en los homogeneizados de células tumorales. El menor número de sitios de unión refleja muy probablemente el menor número de células tumorales en homogeneizados tumorales debido a la presencia de células de estroma.

La cinética de unión del Compuesto (I) también se evaluó en homogeneizados tumorales NCI-H3255 y NCI-H1975 (Figura 3). La constante de disociación (K_{disoc}) del Compuesto (I) fue ligeramente menor en los homogeneizados NCI-H3255 que en los homogeneizados tumorales NCI-H1975 ($0,114 \pm 0,001$ vs $0,270 \pm 0,109$ min $^{-1}$, respectivamente) mientras que la constante de asociación (K_{asoc}) fue ligeramente superior en homogeneizados tumorales NCI-H1975

que en homogeneizados tumorales NCI-H3255 ($6,5 \pm 5,3 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$ frente a $1,8 \pm 1,6 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente). Los datos cinéticos de unión muestran que el Compuesto (I) se une a su objetivo y se libera más rápidamente en NCI-H1975 que en homogeneizados tumorales NCH-H3255.

- 5 Como los datos *in vitro* mostraron que el Compuesto (I) se unía específicamente a EGFR activado, se iniciaron experimentos de autorradiografía en secciones de tumor congeladas humanas (datos no mostrados). Se incluyeron tres tipos de tumores de pulmón humano: tumores que albergan EGFR de tipo silvestre y tumores que portan genes EGFR mutados en L858R o con eliminación del exón 19. También se evaluó la competencia de unión con gefitinib y ATP en estas secciones de tumor congeladas. Se observó una unión específica del Compuesto (I) en todos los tipos de tumores. Gefitinib compitió con la unión del Compuesto (I) pero solo parcialmente mientras que el ATP (a 10 mM) abolió totalmente la unión del Compuesto (I) (datos no mostrados). Los datos sugieren que el desplazamiento observado en presencia de gefitinib puede ser mayor en tumores que albergan la mutación L858R o la eliminación del exón 19 en comparación con los tumores de tipo silvestre.
- 10 15 Los experimentos *in vitro* mostraron que una mezcla de compuestos (I) y (Ia) se unía específicamente a su objetivo, que es presumiblemente EGFR activado. La afinidad de unión de dicha mezcla estuvo en el intervalo nanomolar que es adecuado para estudios *in vivo*.

20 Imágenes de PET y estudios de biodistribución *in vivo* del compuesto (I) en ratas portadoras de tumores

25 Se realizaron imágenes de exploración PET dinámica y recuento gamma *ex vivo* en tres xenoinjertos de cáncer (NCI-H441, NCI-H3255, NCI-H1975) en ratas desnudas. Se iniciaron xenoinjertos en ratas atípicas, Hsd: RH-Foxn1nu (Harlan, Países Bajos) mediante inyección subcutánea de 2×10^7 células en 200 μL de RPMI 1640 en los flancos izquierdo y derecho. Se inyectaron células tumorales NCI-H3255 en el flanco derecho y NCI-H441 o NCI-H1975 en el flanco izquierdo. Cada estudio consistió en dos experimentos con 18 o 19 ratas, para un total de 113 ratas. La inyección de células NCI-H3255 se realizó el día D0, 24 a 72 horas después de una irradiación de todo el cuerpo con una fuente C(5 Gy, 60 Co, BioMep SARL, Bretenières, Francia). La inyección de células NCI-H441 o NCI-H1975 se realizó de 20 a 29 días después de la inyección de células NCI-H3255 para asegurar un volumen comparable para ambos tumores en el momento del experimento. Los tumores se cultivaron hasta que se alcanzó un volumen objetivo de 500-1500 mm^3 para ambos tumores, siempre que fue posible. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Animal Care and Use Committee of Oncodesign (acuerdo del CNREEA No. 91).

30 35 La solución de radiotrazador se diluyó en NaCl al 0,9% para preparar una solución de actividad 4-6 MBq (experimentos de recuento gamma) o 25-35 MBq (experimentos de imágenes de PET) en un volumen de 300-400 o 600-800 μL , respectivamente. Se midió la radioactividad en la jeringa antes y después de la inyección del trazador para determinar la dosis inyectada (DI) a los animales. Las ratas se anestesiaron con isoflurano inhalado (2% en aire) para la inyección del compuesto y durante el transcurso de la adquisición de imágenes. Después de la inyección del compuesto, se permitió que las ratas se despertaran y se volvieran a poner en su jaula durante un período de absorción que oscilaba entre 20 y 120 minutos, dependiendo del experimento.

40 45 50 Para el recuento gamma *ex vivo*, después del período de captación determinado o después de la obtención de imágenes, las ratas se sacrificaron por decapitación, y se extrajeron y pesaron los siguientes órganos: tumor, riñones, sangre, hígado, corazón, cola, músculo del muslo, pulmones, bazo y piel. La distribución del trazador se evaluó determinando el contenido de ^{18}F en cada tejido con un contador de pozos gamma (Perkin Elmer 2480 Wizard 23). Los datos de recuento se expresan como % de DI por gramo de tejido (% de DI/g). Una vez que se midió la radioactividad en los órganos, se prepararon algunas muestras para inmunohistoquímica.

55 60 65 Para los experimentos de formación de imágenes, las ratas se colocaron boca abajo en una cámara dedicada para formación de imágenes de ratas (Minerve, Francia). Su temperatura corporal se mantuvo mediante un flujo de aire caliente a través de la estructura del lecho de imágenes. Las imágenes de PET se realizaron en un sistema microPET eXplore Vista CT (General Electric Healthcare). El sistema Vista, equipado con 36 módulos detectores de Phoswich LYSO/GSO de doble capa, tiene un campo de visión axial/transaxial efectivo de 4,8/6,7 cm. La resolución espacial es < 2 mm en todas las direcciones y en todo el campo de visión. La sensibilidad es superior al 2,5% en todo el campo de visión. Después de una imagen de exploración para ajustar la posición del campo de visión, se adquirió una tomografía computarizada (140 μA , 40 kV). Un minuto después del inicio de la adquisición de imágenes de PET, se administró el Compuesto (I) en una vena lateral de la cola a través de una línea iv y enjuague con una solución salina. Los datos PET tridimensionales (3D) se adquirieron en modo de lista durante hasta 120 minutos y se reconstruyeron utilizando OSEM-2D para crear dos conjuntos de datos: una imagen estática como la suma de los datos durante toda la adquisición y un conjunto de imágenes dinámicas con marcos de tiempo de 10 minutos. Se aplicaron correcciones de atenuación, dispersión, tiempo muerto, sensibilidad del detector y aleatorias a los datos de emisión. Ambos conjuntos de datos tenían una resolución espacial de $0,4 \times 0,4 \times 0,8 \text{ mm}$ y un tamaño de $175 \times 175 \times 61$ voxels. Todas las ratas se sacrificaron inmediatamente después de la adquisición de datos de PET mediante decapitación, y los órganos se recolectaron como se describe en el párrafo anterior para obtener datos de biodistribución correspondientes a los datos de imágenes de PET.

65 Las imágenes de PET/CT reconstruidas se visualizaron y analizaron en un software dedicado (PMOD, versión 3.4).

Las regiones de interés (ROI) se dibujaron manualmente en imágenes de TC y, después del registro manual de las imágenes de PET y TC, se obtuvieron datos de actividad con corrección de decaimiento (en kBq/cm³, normalizados por volumen de ROI). Se generaron curvas de tiempo-actividad (TAC) del compuesto (I) para cada ROI promediando los fotogramas de 10 minutos. Para propósitos de visualización, también se generaron imágenes de la exploración estática sumadas en todo el volumen del tumor (6 a 10 cortes en el conjunto de datos volumétricos de PET).

5 Estudios de biodistribución *in vivo* del compuesto (I)

10 El compuesto (I) se eliminó rápidamente de la sangre (<0,05% de DI/g después de 45 min, Figura 4). El compuesto (I) mostró una absorción inicial en los riñones y el hígado, pero no se acumuló en estos órganos. El compuesto (I) también mostró acumulación central y excreción a través del tracto gastrointestinal. La absorción del compuesto (I) fue mayor en los tumores NCI-H3255 que en los tumores NCI-H441 o NCI-H1975, tanto a los 90 minutos como a los 180 minutos después de la inyección. La absorción disminuyó entre 90 min y 180 min en todos los órganos y tumores, excepto en NCI-H3255, donde se mantuvo estable (alrededor de 0,2% de DI/g). La absorción absoluta en los tumores fue relativamente baja (<0,5% de DI/g a 90 min, véase la Figura 4), pero la absorción normalizada (sobre el músculo) aumentó entre 90 min y 180 min en NCI-H3255 para alcanzar un valor de 12 a 180 min (NCI-H441: 2,6; NCI-H1975: 3,6, véase la Figura 5).

15 Imagen de PET del compuesto (I) en ratas portadoras de tumores

20 Para los tres modelos de tumores, las imágenes de PET representativas muestran la diferencia en la absorción medida por formación de imágenes *in vivo* en tumores entre los modelos de TS, de mutación simple y de mutación doble (datos no mostrados). La absorción se confirma por la distribución de la actividad recolectada fuertemente correlacionada con la distribución observada en las imágenes de PET (Figura 6).

25 Como se muestra en la Figura 6, las medidas de captación por imágenes de PET o contando la radiactividad en los tumores recolectados estaban fuertemente correlacionadas. Luego, nuestros experimentos pueden describirse mediante el estudio de las relaciones entre los modelos tumorales (estado de mutación del EGFR), la absorción de radiotrazador medida en los tumores recolectados (en % de DI/g), la tinción de pEGFR medida por inmunohistoquímica (IHC) en estos tumores y el volumen del tumor. Para IHC, los xenoinjertos se diseccionaron y fijaron en solución salina tamponada con formalina durante 24 horas, seguido de etanol al 70% antes de la inclusión y el corte en parafina (grosor: 4 µm). La fosforilación del EGFR se determinó mediante immunotinción con un anticuerpo contra pEGFR (fosfo Y1068, Abcam, ref ab32430) utilizando un instrumento de tinción automático (Ventana Discovery, Roche) y se evaluó la necrosis en tinciones de hematoxilina y eosina (H&E). Se prepararon controles negativos omitiendo el anticuerpo primario y no mostraron tinción. Los portaobjetos se digitalizaron utilizando un escáner de portaobjetos Nanozoomer (Hamamatsu, aumento de 20×) para el análisis y la cuantificación de imágenes. La necrosis se evaluó mediante la delimitación manual de las zonas necróticas en los tumores utilizando NDPView (Hamamatsu, Francia) y se informó como un porcentaje del área de superficie necrótica en toda el área del tejido tumoral. La tinción de pEGFR se cuantificó usando NDPView y Visilog (FEI Visualization Sciences Group, Francia) mediante la determinación del umbral y la delimitación manual del tejido tumoral viable y tejido positivo para pEGFR. La intensidad de pEGFR se informa como el producto del número de píxeles de pEGFR⁺ y su intensidad de tinción media, sobre el área de tejido tumoral viable en µm².

30 40 La Figura 7 (fila superior) muestra que los tumores de doble mutación eran comparativamente más grandes que los otros dos modelos, y que la intensidad de pEGFR era menor en tumores más grandes. Por lo tanto, se dividieron las mediciones en subconjuntos basados en los volúmenes tumorales (por debajo y por encima de 1000 mm³). En términos de biología tumoral, este umbral representa el volumen en el que comienza a aparecer la necrosis. La Figura 7 también muestra que esta partición permite identificar una correlación entre la actividad del EGFR y la absorción de radiotrazador medida en modelos de mutación simple y doble, en tumores más pequeños, mientras que esta correlación desaparece en tumores más grandes. Para el modelo de tumor TS, esta correlación no se observa independientemente del volumen del tumor.

35 45 50 Especificidad *in vivo* del compuesto (I)

55 60 65 Para evaluar la selectividad del Compuesto (I) para la formación de imágenes del EGFR activado en los tres modelos de tumor, se inyectaron ratas con gefitinib (2 mg/rata, para una dosis aproximada de 10 mg/kg) o el Compuesto (Ia) trazador no radiactivo (o frío) (1 mg/rata, dosis aproximada: 5 mg/kg) en gran exceso para competir por su objetivo. Las captaciones normalizadas y las proporciones de las captaciones tumorales sobre las musculares se presentan en la Figura 8.

La competencia sin gefitinib (+ 16%, p > 0,95) ni el Compuesto (Ia) (5%, p > 0,99) modificó la absorción del Compuesto (I) en tumores NCI-H441 TS. Para los tumores NCI-H3255 (mutación simple), las relaciones T/M disminuyeron en un 29% por la competencia con gefitinib (p <0,01) y en un 52% (p < 0,001) por competición con el Compuesto (Ia). Esto muestra la especificidad del radiotrazador para EGFR como un objetivo común en este modelo de tumor. Para los tumores NCI-H1975 (doble mutación), gefitinib no tiene ninguna influencia en las relaciones T/M (+ 1%, p > 0,99), pero se ha observado una disminución marcada pero estadísticamente no significativa (-55%, p = 0,2) después de la

competencia con el Compuesto (Ia).

En general, este perfil de PK es favorable para el uso del Compuesto (I) como radiotrazador, siempre que se observe un período de absorción suficientemente largo antes de la formación de imágenes.

- 5 En general, el Compuesto (I) es un buen candidato a radiotrazador de PET para evaluar mediante formación de imágenes de PET en tumores de pulmón humano la actividad del EGFR en correlación con su estado mutacional.
- 10 Biodistribución *in vivo* del Compuesto (I) y enantiómeros puros S (II) o R (III)
- 15 Para evaluar la biodistribución de los enantiómeros puros S (II) y R (III) en comparación con el compuesto (I), se realizaron imágenes de exploración PET dinámica y recuento gamma *ex vivo* en ratas Sprague Dawley. Se inyectó a los animales la solución de radiotrazador diluida en NaCl al 0,9% para preparar una solución de actividad 4-6 MBq (experimentos de recuento gamma) o 11-13 MBq (experimentos de imágenes PET) en un volumen de 300-400 o 600-800 μ L, respectivamente. El contenido de radiactividad en todas las muestras biológicas se determinó con un contador y de centelleo (Cobra 4180, Perkin-Elmer Inc.).
- 20 A la luz de los datos de biodistribución del compuesto (I), se evaluó la biodistribución de los enantiómeros R (III) - y S (II) - mediante contador γ en los que la acumulación del compuesto (I) era prominente (es decir: sangre, corazón, riñones, hígado, estómago, intestino delgado y colon). Se seleccionaron dos puntos de tiempo: 5 y 30 minutos después de la inyección. La elección de estos dos puntos de tiempo se debió al hecho de que el compuesto (I) no se acumuló en la sangre, el hígado y los riñones. Se esperaba que las captaciones más altas de enantiómero R (III) y enantiómero S (II) en estos órganos se observaran en los primeros momentos después de la inyección, produciendo las señales más altas en el contador γ y, por lo tanto, haciendo más relevante la comparación de los datos de biodistribución.
- 25 Además, como las imágenes de PET se adquirieron con el compuesto (I), las imágenes de PET se incluyeron en la evaluación de la biodistribución del enantiómero R y del enantiómero S. Esto dio la oportunidad de tener un punto de tiempo adicional a las 4 horas después de la inyección para la recolección de órganos principales y la determinación del contenido de radiactividad mediante recuento γ *ex vivo*.
- 30 En el punto de tiempo 5 minutos posterior a la inyección, la absorción en sangre alcanzó $0,20 \pm 0,002\%$ de DI/g para el enantiómero R (III) y $0,11 \pm 0,01\%$ de DI/g para el enantiómero S (II) (mientras que la absorción fue de $0,13 \pm 0,02\%$ DI/g para el compuesto (I)). En el punto de tiempo de 0,5 horas, la absorción de radiactividad fue similar para los tres trazadores (cerca de $0,03-0,04\%$ DI/g). De manera similar, la absorción a las 4 horas después de la inyección fue en el mismo intervalo de magnitud para los tres trazadores ($0,02-0,04\%$ de DI/g). El comportamiento del enantiómero R (III) y el enantiómero S (II) en sangre fue similar al del compuesto (I).
- 35 Cinco minutos después de la inyección, la absorción en el corazón del enantiómero R (III) y del enantiómero S (II) alcanzó $0,99 \pm 0,02$ y $1,35 \pm 0,35\%$ de DI/g, respectivamente, siendo estas captaciones comparables a las del compuesto (I) ($0,91 \pm 0,12\%$ de DI/g). Treinta minutos después de la inyección, las captaciones fueron similares para el enantiómero R y el enantiómero S ($0,10 \pm 0,02$ y $0,19 \pm 0,08\%$ de DI/g) y todavía eran comparables a las del compuesto (I) ($0,23 \pm 0,05\%$ de DI/g). En el punto de tiempo de 4 horas, la absorción de los tres trazadores había disminuido hasta $0,01\%$ de DI/g.
- 40 Cinco minutos después de la inyección, la absorción del enantiómero R (III) y el enantiómero S (II) en los riñones fue similar a la del compuesto (I): $4,15 \pm 0,79$ y $6,89 \pm 0,52\%$ de DI/g vs $5,07 \pm 0,30\%$ DI/g, respectivamente. En el punto de tiempo de 30 minutos, la absorción en los riñones fue del mismo orden de magnitud para el enantiómero S (II) y el compuesto (I) ($1,04 \pm 0,17$ y $1,47 \pm 0,36\%$ DI/g, respectivamente) pero fue menor para el enantiómero R (III) ($0,25 \pm 0,08\%$ de DI/g). Para este último trazador, las absorciones individuales registradas 30 minutos después de la inyección fueron más bajas que el valor individual más bajo registrado para el compuesto (I) en el mismo punto de tiempo. La absorción de los riñones fue de $0,01-0,05\%$ de DI/g para los tres trazadores 4 horas después de la inyección.
- 45 Para el enantiómero R (III), la absorción en el hígado aumentó de 5 minutos a 30 minutos después de la inyección: $0,02 \pm 0,09$ a $0,71 \pm 0,07\%$ de DI/g, respectivamente. Para el enantiómero S (II), se observó una disminución entre 5 y 30 minutos después de la inyección: $0,97 \pm 0,92$ a $0,15 \pm 0,03\%$ de DI/g como se observó para el compuesto (I) ($1,66 \pm 0,43$ a $0,37 \pm 0,07\%$ de DI/g). En el punto de tiempo de cuatro horas, la absorción hepática no excedió el $0,02\%$ de DI/g para los tres trazadores.
- 50 La absorción en el estómago de enantiómero R (III) y enantiómero S (II) fue $1,86 \pm 0,73\%$ de DI/g y $0,72 \pm 0,38\%$ de DI/g, respectivamente, 5 minutos después de la inyección. En este momento, la absorción del compuesto (I) fue $1,27 \pm 2,13\%$. La absorción de enantiómero R (III) y enantiómero S (II) disminuyó a $0,26 \pm 0,07$ y $0,20 \pm 0,05\%$ de DI/g en el punto de tiempo de 30 minutos, mientras que se observó un ligero aumento para el compuesto (I) ($2,72 \pm 4,75\%$ de DI/g). Cuatro horas después de la inyección, la absorción en el estómago aumentó para el enantiómero R (III) y el enantiómero S (II) ($2,58 \pm 2,52$ y $2,39 \pm 2,31\%$ de DI/g) mientras que disminuyó para el compuesto (I) ($0,14 \pm 0,23\%$ DI/g).
- 55 La absorción en el intestino delgado alcanzó $0,35 \pm 0,19$ y $0,08 \pm 0,09\%$ de DI/g a los 5 minutos después de la inyección

para el enantiómero R (III) y el enantiómero S (II), respectivamente, mientras que la absorción fue $0,28 \pm 0,15\%$ de DI/g. para el compuesto (I). Treinta minutos después de la inyección, la absorción del enantiómero R (III) y el enantiómero S (II) fue menor que la del compuesto (I) ($0,02 \pm 0,004$ y $0,08 \pm 0,07\%$ de DI/g frente a $0,40 \pm 0,40\%$ de DI/g, respectivamente). A las 4 horas después de la inyección, la absorción del enantiómero R (III) y del enantiómero S (II) fue similar a la del compuesto (I) (en el intervalo de 0,6-0,8% de DI/g).

La absorción en el colon del enantiómero R (III), el enantiómero S (II) y el compuesto (I) fue de 0,2-0,4% de DI/g para los tres trazadores 5 y 30 minutos después de la inyección. Cuatro horas después de la inyección, la absorción del enantiómero R (III) y del enantiómero S (II) permaneció cerca de 0,2-0,4% de DI/g mientras que la absorción aumentó hasta $10,55 \pm 4,53\%$ de DI/g para el compuesto (I).

En resumen, el enantiómero R (III) y el enantiómero S (II) se eliminaron rápidamente de la sangre como se observó para el compuesto (I). Estos dos trazadores también se eliminaron del cuerpo tanto a través del riñón como del hígado y no quedaron atrapados en estos órganos. En cuanto al compuesto (I), se observó una absorción en el estómago, el intestino delgado y el colon para el enantiómero R y el enantiómero S.

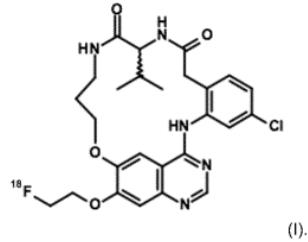
El comportamiento global del enantiómero R (III) y del enantiómero S (II) después de una inyección iv es comparable a la del compuesto (I). Los perfiles farmacocinéticos son similares para los tres trazadores.

La absorción (% de DI, corregida por la desintegración radiactiva) del compuesto (I), enantiómero R (III) y enantiómero S (II) en riñones e hígado determinada por análisis de imágenes de PET y recuento γ ex vivo se presenta en la Figura 9 (A). Curvas de tiempo-actividad de 90 minutos (% de DI corregido para la desintegración radiactiva en función del tiempo) del compuesto (I), enantiómero R (III) y enantiómero S (II) en riñones, intestino, estómago e hígado después de una única inyección intravenosa en ratas Sprague-Dawley se presentan en la Figura 9 (B).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I) marcado con flúor 18, o cualquier sal, polimorfo, solvato, hidrato, estereoisómero, radioisótopo o tautómero del mismo farmacéuticamente aceptable.

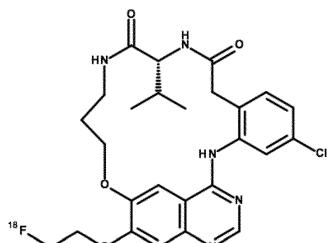
5



(I).

2. Un compuesto marcado con flúor 18 como se define en la reivindicación 1 y que tiene la estereoisoquímica R como se representa en la fórmula (III), o cualquier sal, polimorfo, solvato, hidrato, estereoisómero, radioisótopo o tautómero del mismo farmacéuticamente aceptable.

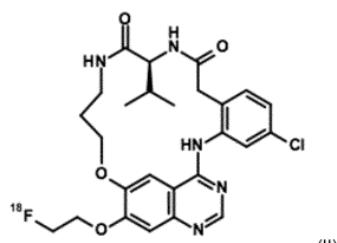
10



(III).

3. Un compuesto marcado con flúor-18 como se define en la reivindicación 1 y que tiene la estereoisoquímica S como se representa en la fórmula (II), o cualquier sal, polimorfo, solvato, hidrato, estereoisómero, radioisótopo o tautómero del mismo farmacéuticamente aceptable.

15



(II).

20 4. Una composición radiofarmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, que además comprende opcionalmente uno o más vehículos y/o diluyentes inertes.

5. Un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 o una composición radiofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para uso como agente de diagnóstico en medicina humana.

25

6. Uso de un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 o una composición radiofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 en la formación de imágenes de tumores.

30 7. Un compuesto radiomarcado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 o una composición radiofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para uso en diagnóstico *in vivo* o formación de imágenes de tumores.

35 8. Un método para la formación de imágenes de diagnóstico de un tumor asociado a EGFR en un ser humano, que comprende administrar a un ser humano que necesita dicha formación de imágenes de diagnóstico una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 o una composición radiofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, y obtener una imagen útil para cuantificar EGFR en el tumor de dicho humano mediante tomografía por emisión de positrones.

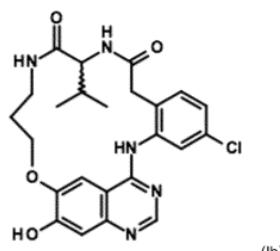
40 9. Un método para la cuantificación del EGFR en tejido humano, que comprende poner en contacto dicho tejido humano en el que se desea la cuantificación con una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, o una composición radiofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, y detectar o cuantificar EGFR mediante tomografía por emisión de positrones.

10. Un método para preparar un compuesto radiomarcado de acuerdo con la reivindicación 1; comprendiendo dicho método la etapa de hacer reaccionar un compuesto radiomarcado

5



con un compuesto de fórmula (Ib)



(Ib)

10

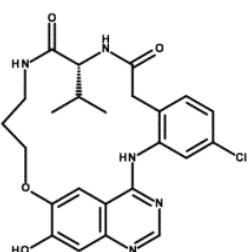
y aislar el compuesto resultante de fórmula (I).

11. Un método para preparar un compuesto radiomarcado de acuerdo con la reivindicación 2; comprendiendo dicho método la etapa de hacer reaccionar un compuesto radiomarcado

15



con un compuesto de fórmula (IIIb)



(IIIb)

20

y aislar el compuesto resultante de fórmula (III).

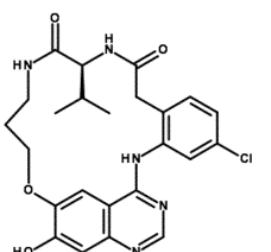
12. Un método para preparar un compuesto radiomarcado de acuerdo con la reivindicación 3; comprendiendo dicho método la etapa de hacer reaccionar un compuesto radiomarcado

25



con un compuesto de fórmula (IIb)

30

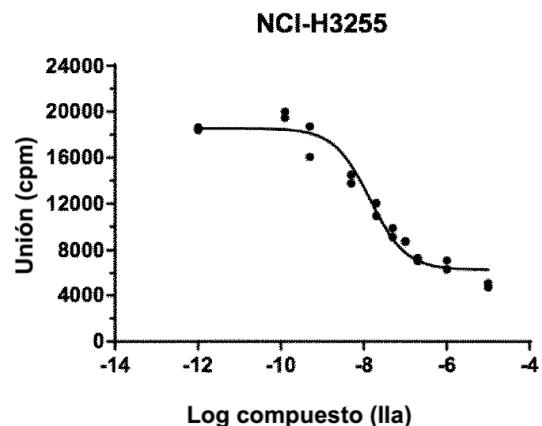


(IIb)

y aislar el compuesto resultante de fórmula (II).

Fig. 1

(A)



(B)

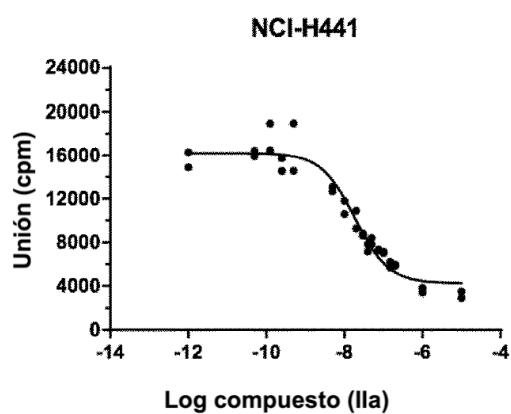
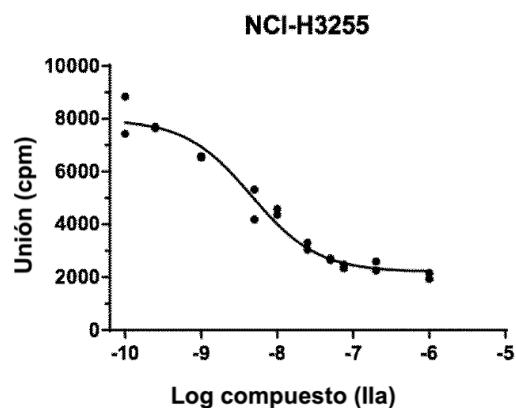


Fig. 2

(A)



(B)

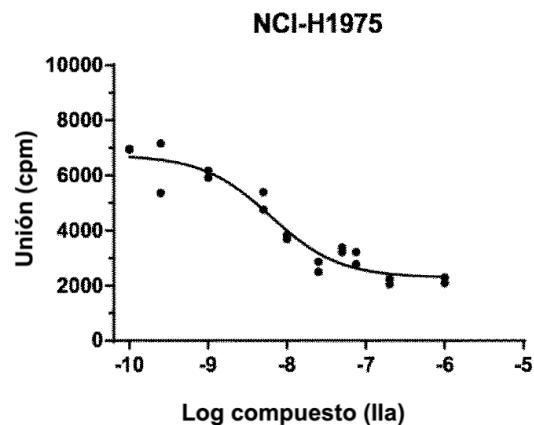
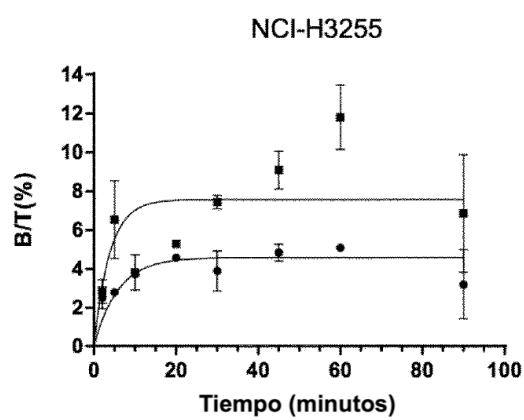


Fig. 3

(A)



(B)

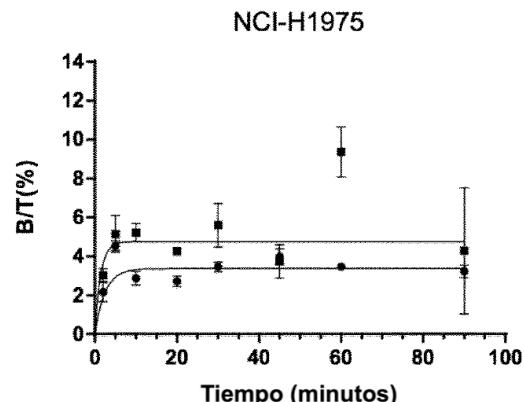
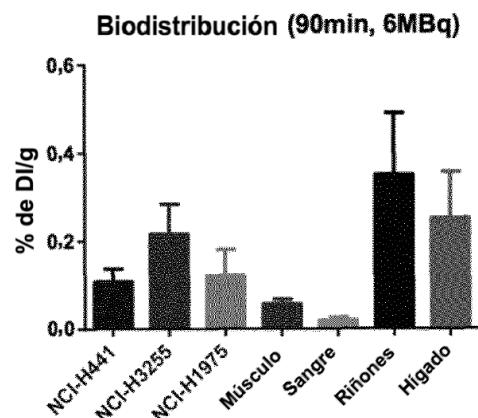
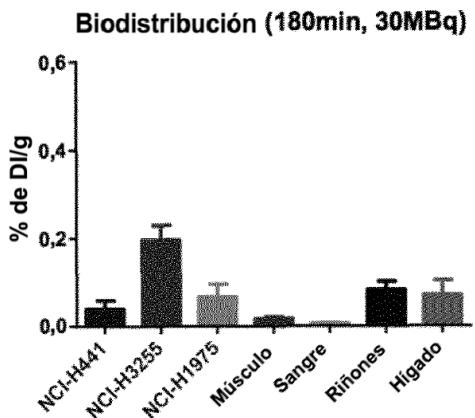


Fig. 4

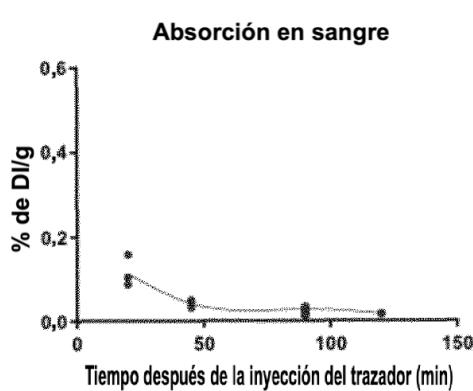
(A)



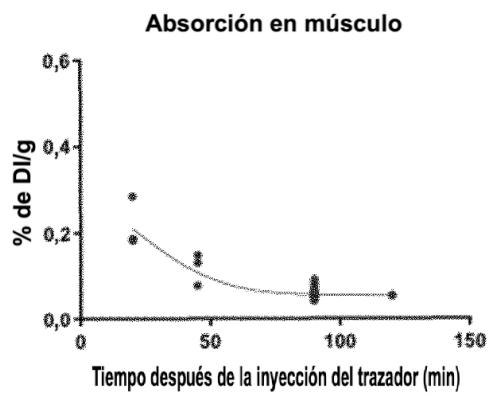
(B)



(C)



(D)



(E)

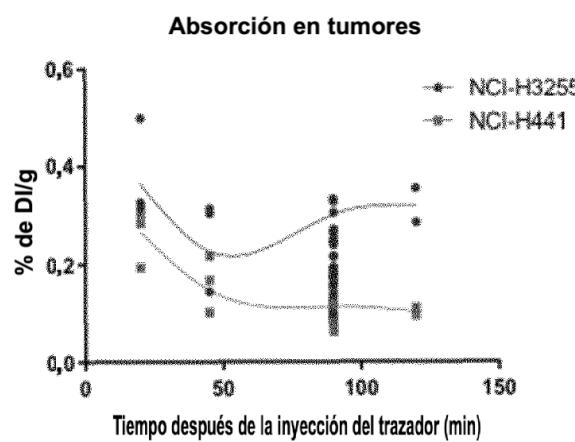


Fig. 5

Relación de tumor sobre músculo

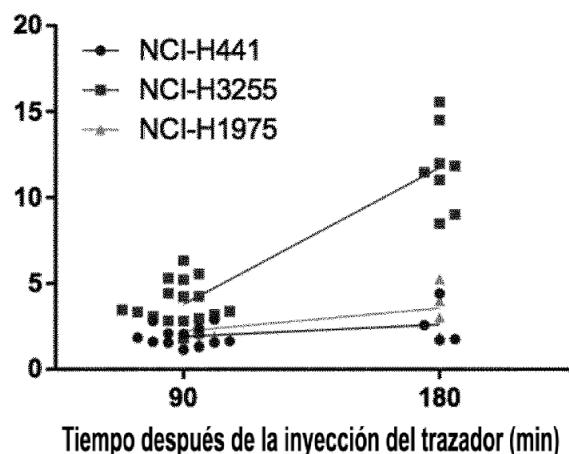


Fig. 6

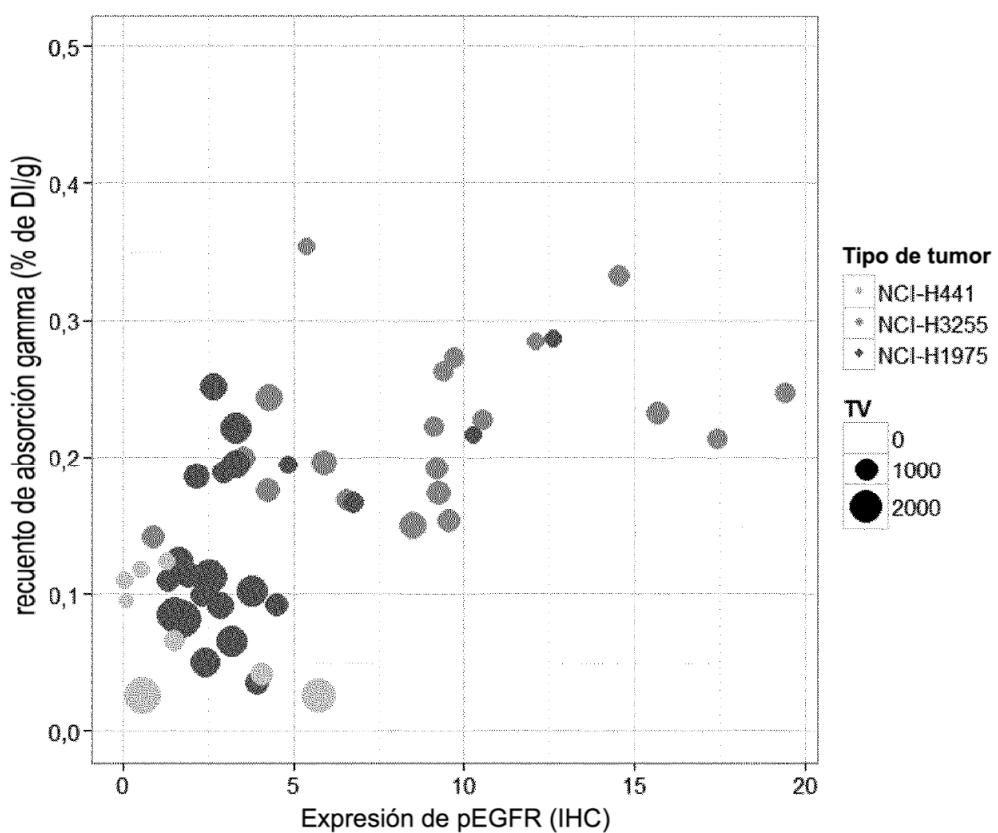
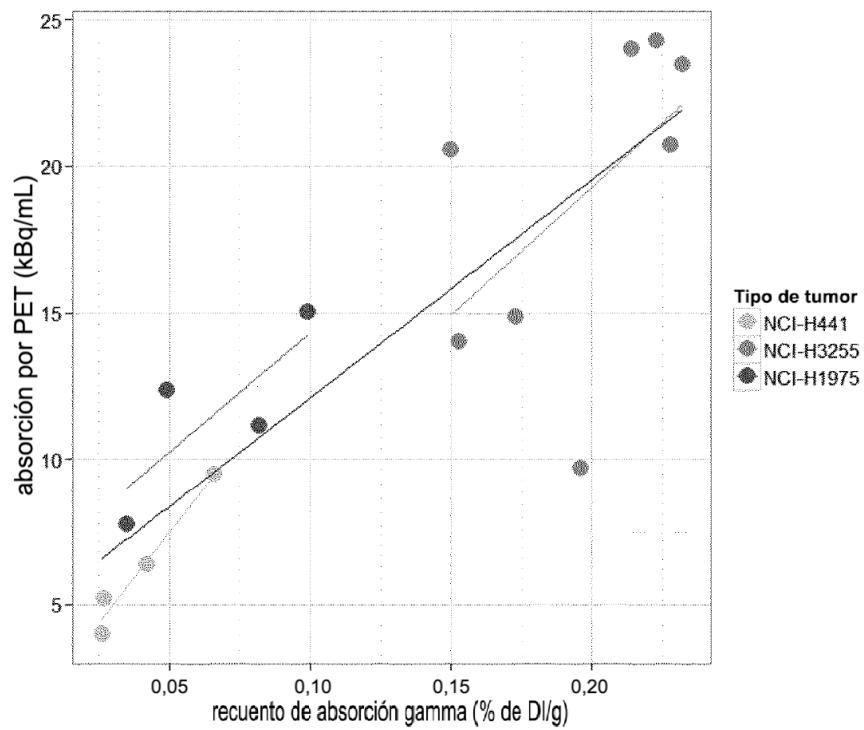
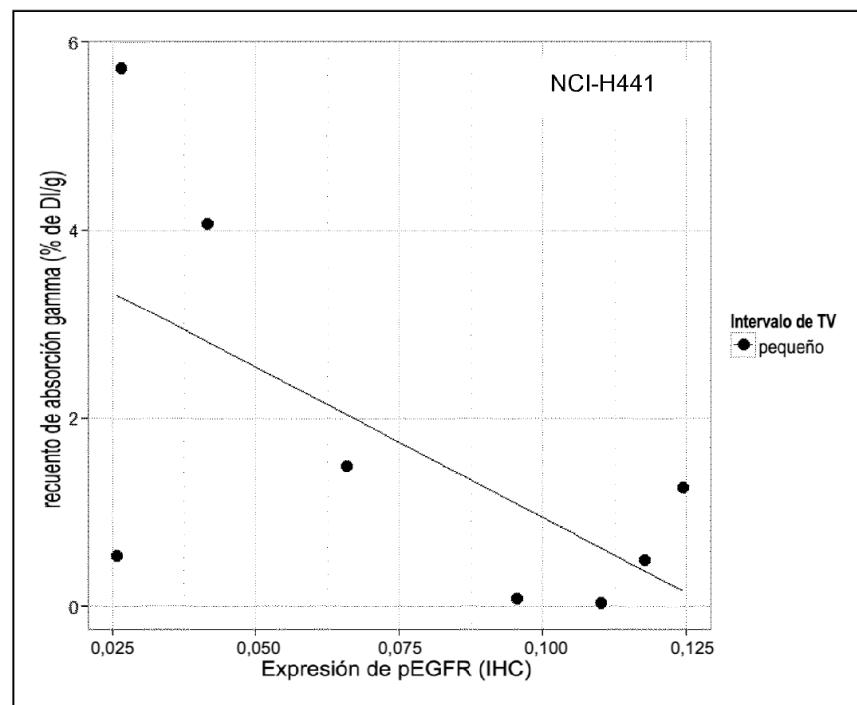


Fig. 7

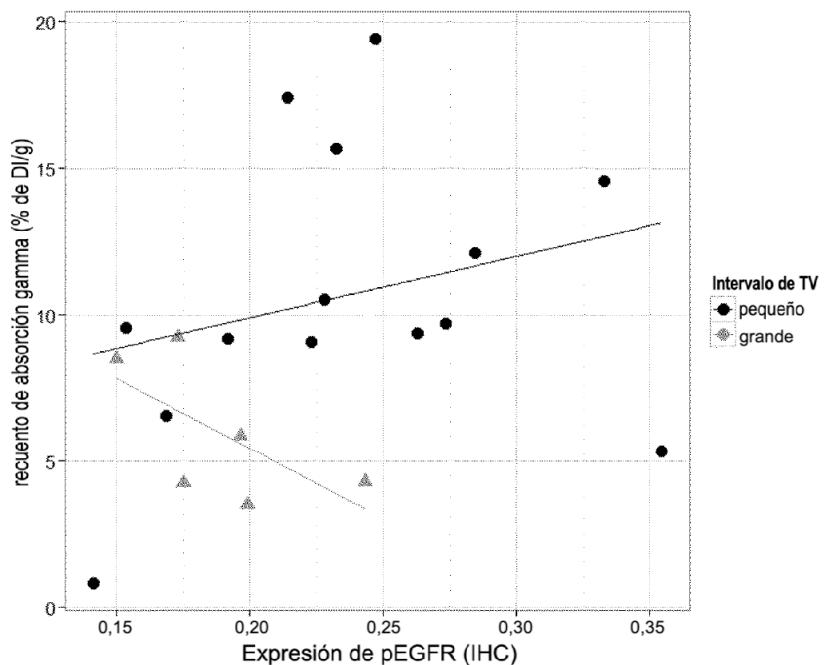
(A)



(B)



(C)



(D)

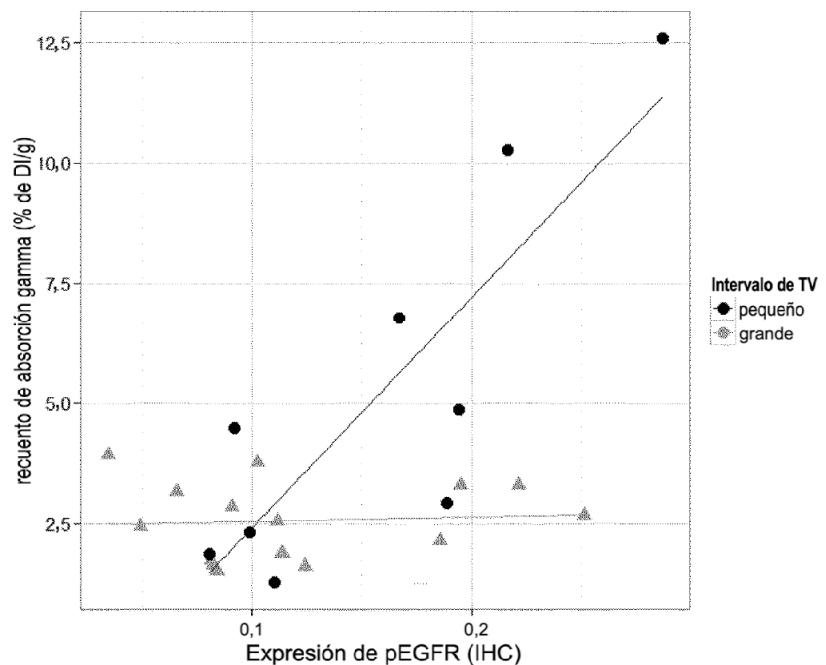
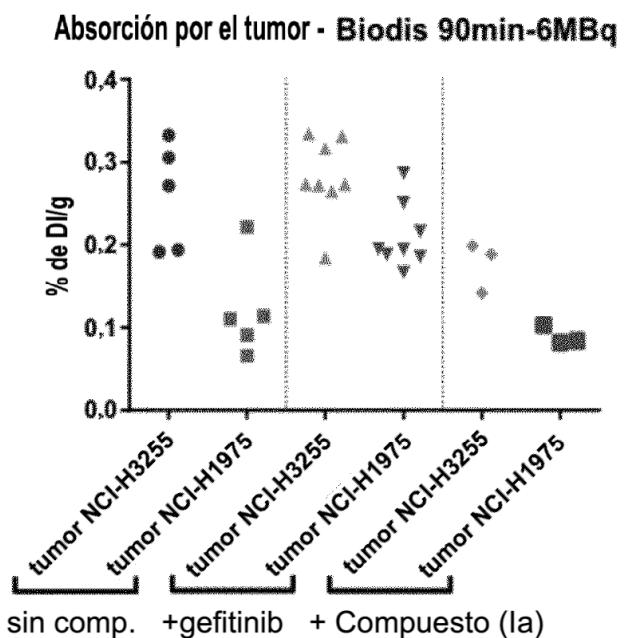
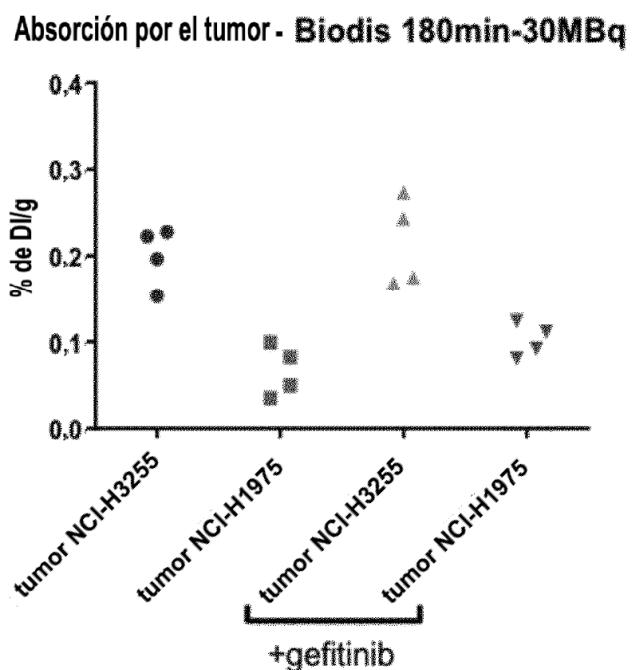


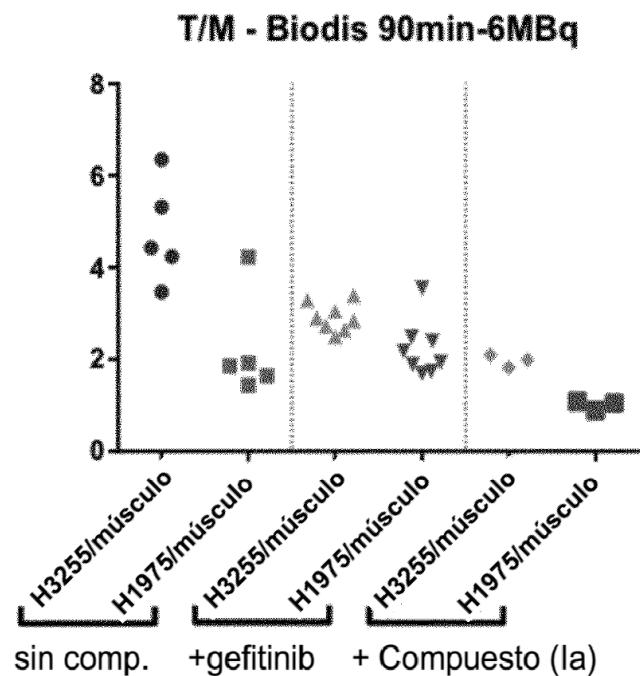
Fig. 8
(A)



(B)



(C)



(D)

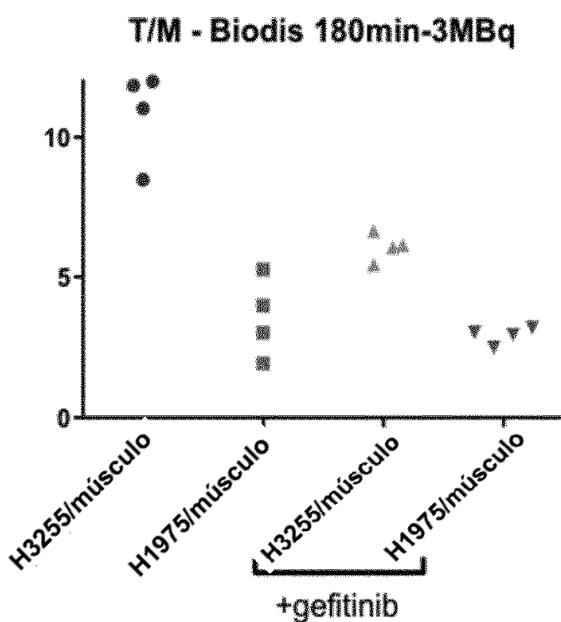


Fig. 9

(A)

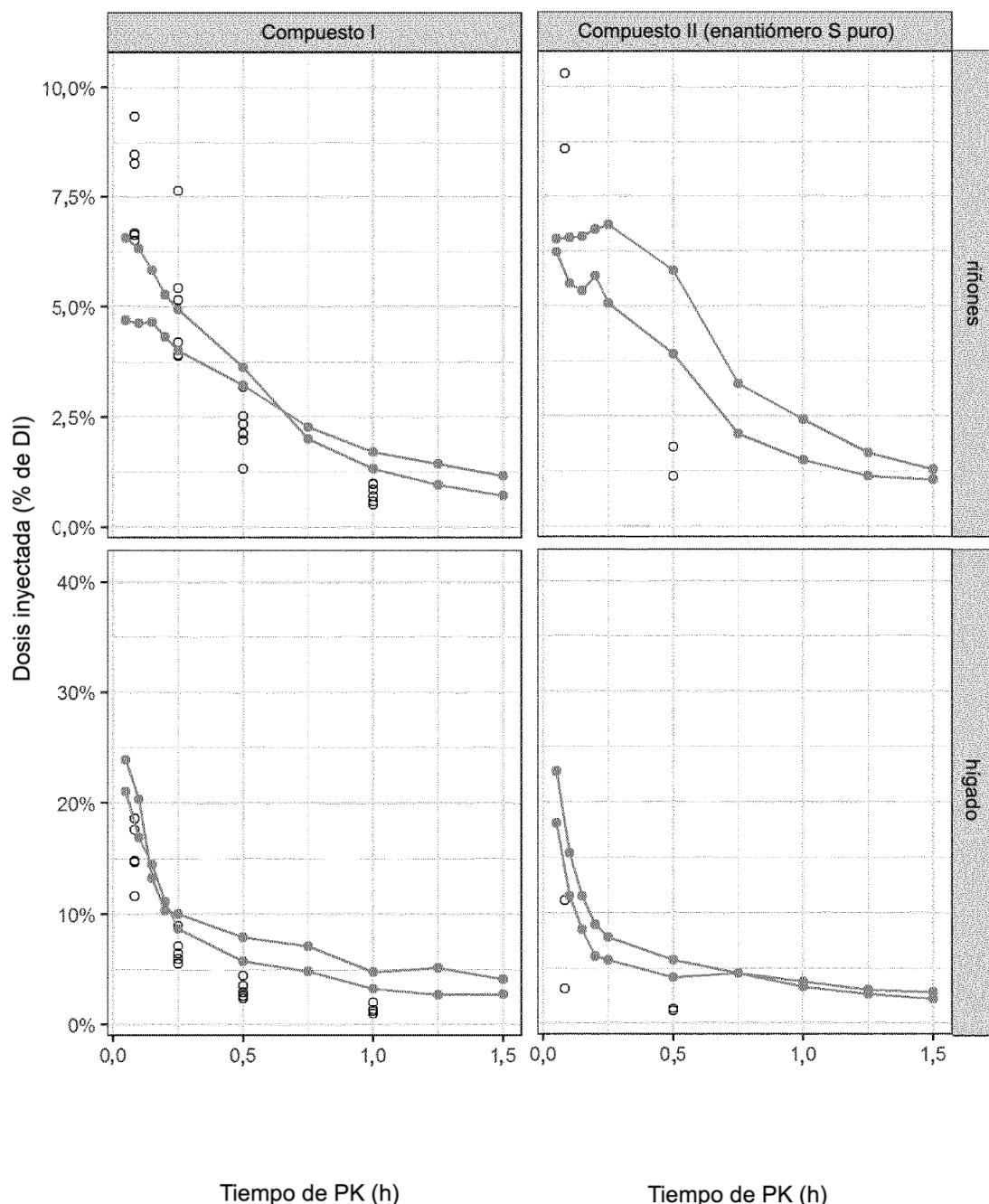


Fig. 9 (A) - Continuación

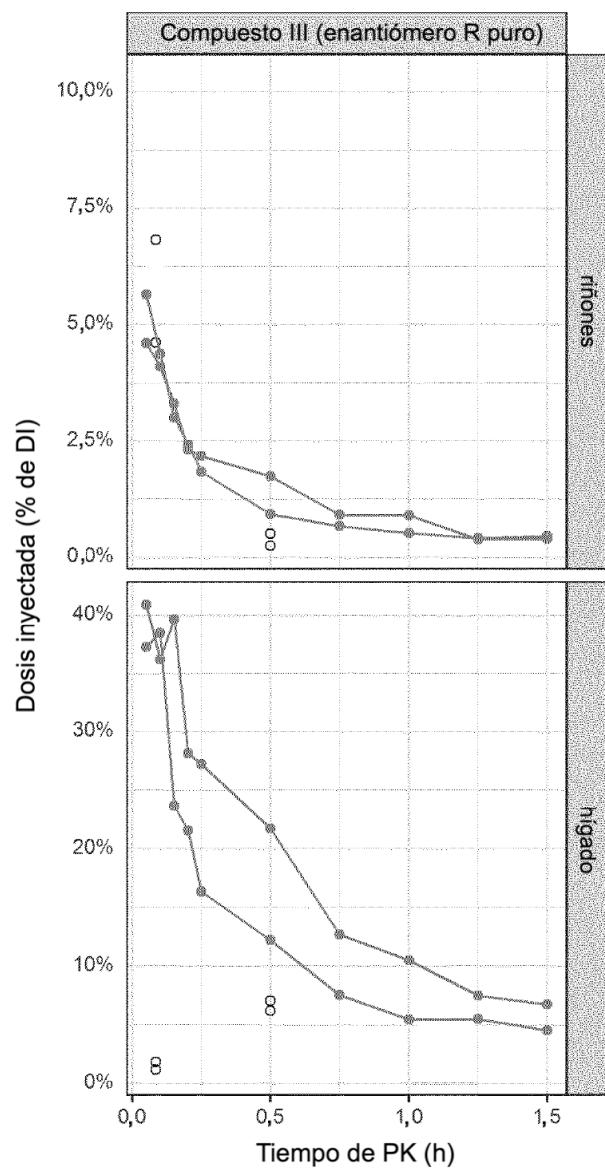


Fig. 9 (B)

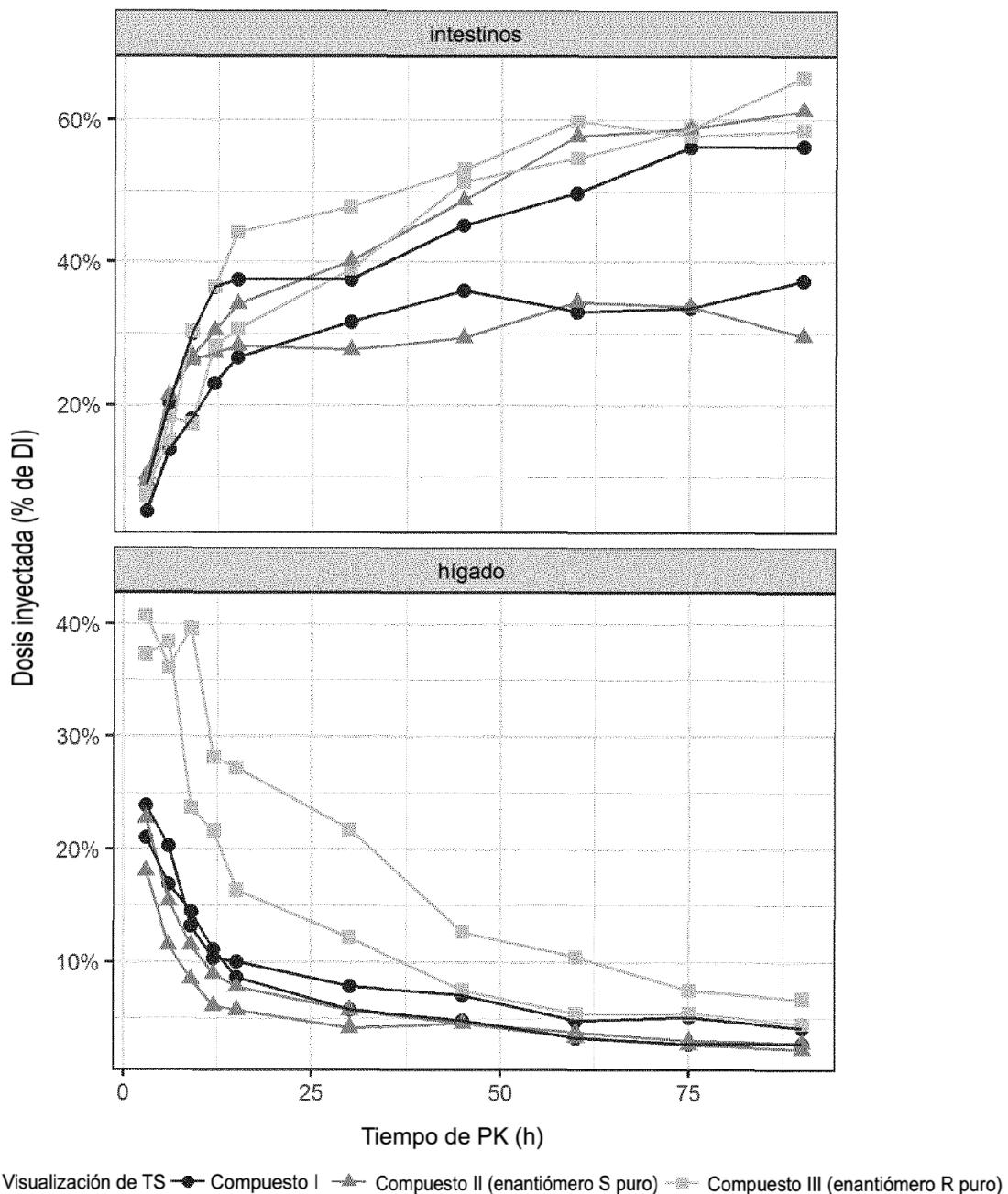


Fig. 9 (B) - Continuación

