

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 346**

51 Int. Cl.:

**C07D 213/80** (2006.01)

**A61K 51/04** (2006.01)

**C07B 59/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2010 E 10710143 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2414333**

54 Título: **Reactivos y procedimientos de radiomarcado**

30 Prioridad:

**30.03.2009 GB 0905438**

**30.03.2009 US 164494 P**

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

**27.05.2013**

73 Titular/es:

**GE HEALTHCARE LIMITED (100.0%)**  
**Amersham Place Little Chalfont**  
**Buckinghamshire HP7 9NA , GB**

72 Inventor/es:

**OLBERG, DAG ERLAND y**  
**ARUKWE, JOSEPH, MADUABUCHI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 404 346 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

Reactivos y procedimientos de radiomarcado

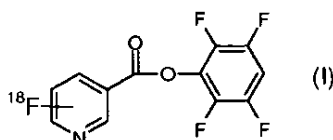
La presente invención se refiere a reactivos y procedimientos para la fluoración con [ $^{18}\text{F}$ ] de biomoléculas, particularmente de péptidos. Los compuestos marcados con  $^{18}\text{F}$  resultantes, son útiles como radiofármacos, específicamente para su uso en tomografía por emisión de positrones (PET).

La aplicación de péptidos bioactivos radiomarcados para la formación de imágenes diagnósticas está adquiriendo importancia en la medicina nuclear. Las moléculas biológicamente activas que interaccionan selectivamente con tipos celulares específicos son útiles para la administración de radioactividad a los tejidos diana. Por ejemplo, los péptidos radiomarcados tienen un potencial significativo para la administración de radionúclidos a tumores, infartos, y tejidos infectados para el diagnóstico por imagen y la radioterapia. El  $^{18}\text{F}$ , con su vida media de 110 minutos, es el núclido emisor de positrones de elección para muchos estudios de imagen de receptores. Por lo tanto, los péptidos bioactivos marcados con  $^{18}\text{F}$  tienen gran potencial clínico debido a su utilidad en la PET para detectar cuantitativamente y caracterizar una amplia variedad de enfermedades.

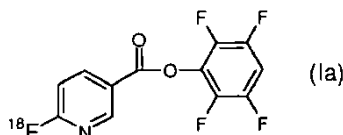
Una dificultad en la preparación de péptidos marcados con  $^{18}\text{F}$  es que los reactivos de marcado con  $^{18}\text{F}$  existentes precisan de mucho tiempo para su preparación. El marcado efectivo de péptidos y proteínas con  $^{18}\text{F}$  sólo se consigue mediante el uso de grupos prostéticos adecuados. En la literatura se han propuesto varios de estos grupos prostéticos, incluyendo la N-succinimidil-4- $^{18}\text{F}$ fluorobenzoato, m-maleimido-N-(p- $^{18}\text{F}$ fluorobencil)-benzamida, bromuro de N-(p- $^{18}\text{F}$ fluorofenil)maleimida y 4- $^{18}\text{F}$ fluorofenilbromuro. Casi todos los procedimientos actualmente utilizados hoy en día para el marcado de péptidos y proteínas con  $^{18}\text{F}$  utilizan ésteres activos. El reactivo para el marcado con  $^{18}\text{F}$  más comúnmente utilizado es N-succinimidil-4- $^{18}\text{F}$ fluorobenzoato (SFB). SFB tiene el inconveniente de que necesita 3 etapas sintéticas para su preparación (fluoración, hidrólisis y generación del éster activo), seguido de una etapa de purificación mediante HPLC prolongada, por lo que la preparación de SFB es difícil de automatizar. Además, la presencia del anillo fenilo en el reactivo de marcado añade hidrofobicidad significativa al producto marcado con  $^{18}\text{F}$ , lo que puede afectar negativamente a su perfil de biodistribución. Por lo tanto, todavía existe una necesidad de reactivos de marcado con  $^{18}\text{F}$  alternativos y metodologías que permitan la introducción quimioselectiva rápida de  $^{18}\text{F}$ , en particular en péptidos, en condiciones suaves para dar productos marcados con  $^{18}\text{F}$ . Además, hay una necesidad de tales metodologías que son susceptibles de automatización para facilitar la preparación de radiofármacos en el contexto clínico.

El documento WO 2004/002984 divulga derivados maleimida marcados con  $^{18}\text{F}$  y su uso para marcar macromoléculas.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I):

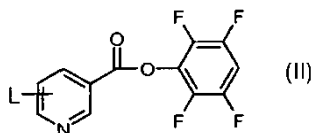


En un aspecto, el marcado con  $^{18}\text{F}$  se añade en orto respecto al nitrógeno del piridilo, de tal manera que el compuesto de fórmula (I) tiene la fórmula (Ia):



Los compuestos de fórmula (I) y (Ia) deben añadir ventajas significativas para el marcado con  $^{18}\text{F}$  de biomoléculas. Los compuestos de fórmula (I) y (Ia) pueden marcarse con  $^{18}\text{F}$  en un solo paso, el marcado es rápido a una temperatura cercana a la temperatura ambiente, la purificación se puede realizar con un sistema basado en cartucho (por ejemplo, columna Oasis MCX) que hacen que la automatización sea más practicable. También se sabe que el sistema de piridina es más hidrófilo que el análogo de bencilo y se espera, por lo tanto, añadir un impacto positivo en el perfil de biodistribución del producto  $^{18}\text{F}$ . Como se demuestra a continuación, se ha observado que el éster fenílico tetrafluoro es más estable durante el marcado con  $^{18}\text{F}$  que otros ésteres activos

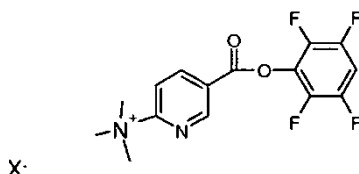
Los compuestos de fórmula (I) y (Ia) pueden prepararse a partir del correspondiente compuesto de fórmula (II):



o una sal del mismo, en la que L es un grupo saliente seleccionado entre cloro, bromo, yodo, nitro y tri(alquil C<sub>1-6</sub>)amonio (convenientemente trimetil amonio). Dichos compuestos de fórmula (II) son novedosos y, por lo tanto, forman un aspecto adicional de la invención.

5 En un aspecto, L en el compuesto de fórmula (II) es tri(alquil C<sub>1-6</sub>)amonio (convenientemente trimetil amonio), con un contraión adecuado seleccionado de los derivados de ácidos minerales, por ejemplo, ácido clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, perclórico, nítrico y sulfúrico y de los derivados de ácidos orgánicos, por ejemplo, los ácidos tartárico, trifluoroacético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico, metanosulfónico, trifluorometanosulfónico y ácido para-toluenosulfónico; adecuadamente seleccionados  
10 entre cloruro, bromuro, perclorato, sulfonato, nitrato, fosfato y trifluorometanosulfonato, más adecuadamente con un contraión trifluorometanosulfonato.

En un aspecto, el compuesto de fórmula (II) es:



en la que X- es un contraión como se ha definido anteriormente y es preferiblemente trifluorometanosulfonato.

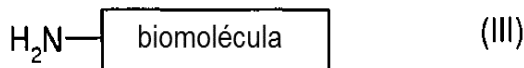
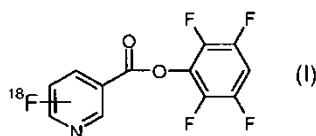
15 La preparación de un compuesto de fórmula (I) a partir del compuesto correspondiente de fórmula (II) o una sal del mismo se puede efectuar mediante procedimientos de marcado con <sup>18</sup>F estandarizados. El [<sup>18</sup>F]fluoruro se prepara convenientemente a partir de agua enriquecida con <sup>18</sup>O usando la reacción nuclear (p, n), (Guillaume y col., Appl. Radiat. Isot. 42 (1991) 749-762) y generalmente se aísla como una sal tal como Na<sup>18</sup>F, K<sup>18</sup>F, Cs<sup>18</sup>F, [<sup>18</sup>F]fluoruro de tetraalquilamonio o [<sup>18</sup>F]fluoruro de tetraalquilfosfonio. Para aumentar la reactividad del [<sup>18</sup>F]fluoruro, se puede añadir un catalizador de transferencia de fase, tal como un aminopolietéer o éter corona, por ejemplo, 4, 7, 13, 16, 21, 24  
20 hexaoxa-1,10-diazabicyclo [8,8,8] hexacosano (Kryptofix 2.2.2 ) y la reacción se lleva a cabo en un disolvente adecuado. Estas condiciones dan iones fluoruro reactivos. Opcionalmente, se puede usar una trampa de radicales libres para mejorar los rendimientos de fluoración. Opcionalmente, se puede describir en el documento WO 2005/061415. La expresión "trampa de radicales libres" se define como cualquier agente que interacciona con los radicales libres y los inactiva. Una trampa de radicales libres adecuada para este propósito se puede seleccionar a partir de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido (TEMPO), 1,2-difeniletileno (DPE), ascorbato, ácido para-amino benzoico (PABA), α-tocoferol, hidroquinona, di-t-butil-fenol, β-caroteno y ácido genticóico.

25 El tratamiento de un compuesto de fórmula (II) con [<sup>18</sup>F]fluoruro se puede efectuar en presencia de un disolvente orgánico adecuado, tal como acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, tetrahidrofurano, dioxano, 1,2-dimetoxietano, sulfolano, N-metilpirolidinona o en un líquido iónico, tal como un derivado de imidazolio (por ejemplo, hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazolio), un derivado de piridinio (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio), un compuesto de fosfonio o un compuesto de tetraalquilamonio a una temperatura no extrema, por ejemplo, 15°C a 50°C, preferiblemente a aproximadamente la temperatura ambiente tal como 15°C a 30°C, por ejemplo 18°C a 25°C.

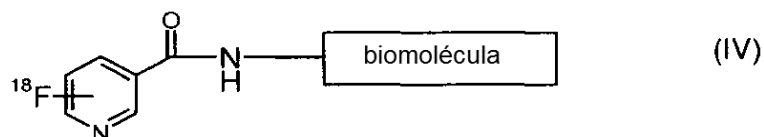
35 Los compuestos de fórmula (II) y las sales de los mismos se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles comercialmente, tales como el ácido 6-cloro-nicotínico. Los rendimientos para el proceso general son buenos (> 50%). Los pasos incluyen esterificación con tetrafluorofenol activado, por ejemplo, con dicitohexil carbodiimida (DCC), generación de la sal trimetilamonio mediante el tratamiento del éster del ácido 6-cloro-nicotínico activo con una solución saturada de trimetilamina en tetrahidrofurano (THF) y generación de la sal trifluorometanosulfonato (triflato) con triflato de plata.

40 Después de la preparación de un compuesto de fórmula (I), este se puede purificar por procedimientos estándar, generalmente usando extracción en fase sólida, por ejemplo, con una columna Oasis MCX™, de la que el compuesto de fórmula (I) se puede eluir con buena pureza usando una mezcla de disolvente orgánico/agua adecuada.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para la fluoración con <sup>18</sup>F que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (I) con un compuesto de fórmula (III):

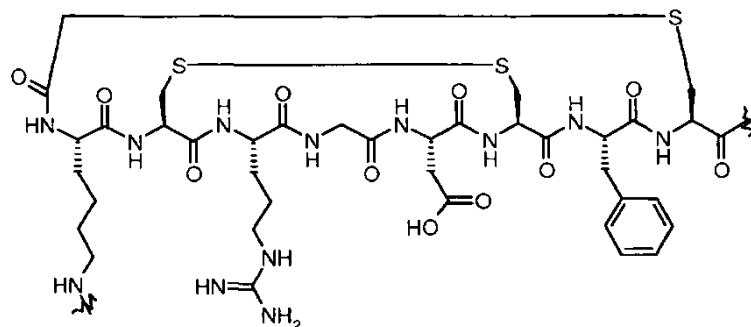


para dar un  $^{18}\text{F}$ -producto de fórmula (IV):

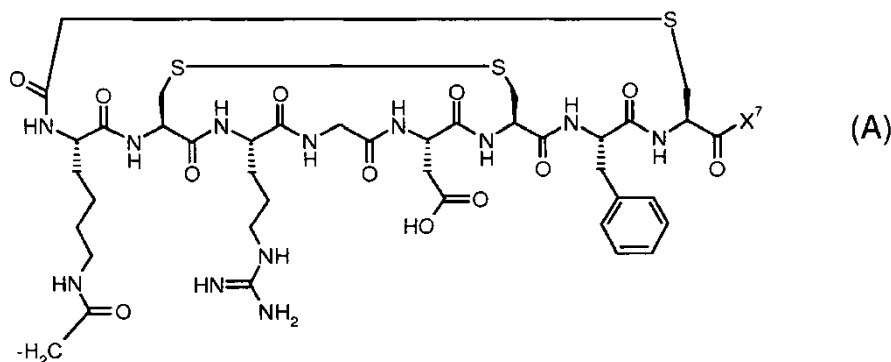


- 5 La reacción de un compuesto de fórmula (I) con un compuesto de fórmula (III) se puede efectuar en un disolvente adecuado, por ejemplo, en un tampón acuoso en el intervalo de pH 2-11, adecuadamente 3-11 y a una temperatura no extrema de 5 a 70°C, preferiblemente a temperatura ambiente.

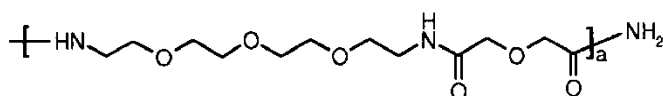
- 10 En las fórmulas (III) y (IV) biomoléculas adecuadas para el marcado son péptidos, que pueden incluir análogos de la somatostatina, tales como octreótido, bombesina, péptido intestinal vasoactivo, análogos de péptidos quimiotácticos, hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocitos, neurotensina, péptido Arg-Gly-Asp y sus análogos, el péptido de conexión de la proinsulina humana, endotelina, angiotensina y formil-norleucil-leucil-fenilalanil-norleucil-tirosil-lisina. Los péptidos preferidos para el marcado son el péptido Arg-Gly-Asp y sus análogos, tales como los descritos en los documentos WO 01/77415 y WO 03/006491. Los péptidos preferidos comprenden el fragmento:



- 15 En un aspecto particular, la biomolécula en la fórmula (III) o (IV) es un péptido de fórmula (A):



en la que  $X^7$  es o bien  $\text{-NH}_2$  o



en la que a es un número entero de 1 a 10, preferiblemente a es 1.

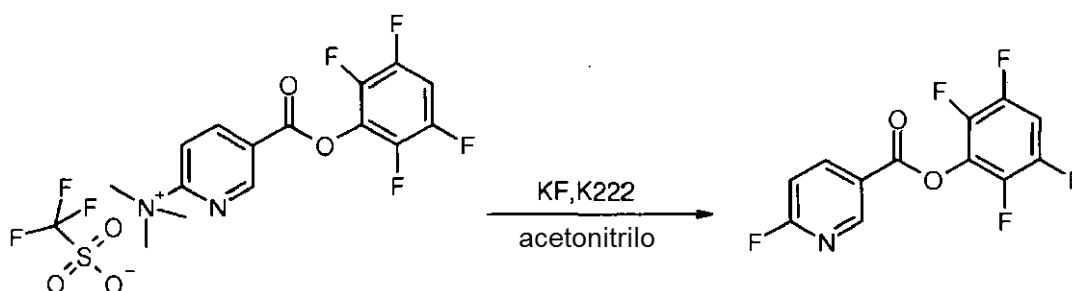
- 20 Como se apreciará por el experto en la materia, los procedimientos de la invención también se pueden usar para la fluoración con  $^{18}\text{F}$  de otras biomoléculas, tales como proteínas, hormonas, oligonucleótidos y fragmentos de anticuerpos, así como moléculas del tipo fármacos pequeños para proporcionar una variedad de trazadores PET.

Los compuestos de fórmula (III) se pueden preparar por procedimientos estándar de síntesis de péptidos, por ejemplo, síntesis en fase sólida de péptidos, por ejemplo, como se describe en Atherton, E. y Sheppard, RC; "Solid Phase Synthesis", IRL Press: Oxford, 1989. La incorporación del grupo amina primaria en un compuesto de fórmula (III) se puede lograr por reacción del extremo N o C-terminal del péptido o con algún otro grupo funcional contenido en la secuencia peptídica, cuya modificación no afecta a las características de unión del vector. El grupo amina primaria se introduce preferiblemente mediante la formación de un enlace amida estable formado por reacción de una función amina peptídica con un ácido activado e introducida durante o después de la síntesis de péptidos. Cuando el precursor es un ácido, entonces la amina primaria se puede introducir usando agentes activadores *in situ*, tales como hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), N-óxido, hexafluorofosfato de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetileno]-N-metilmetanaminio (HATU).

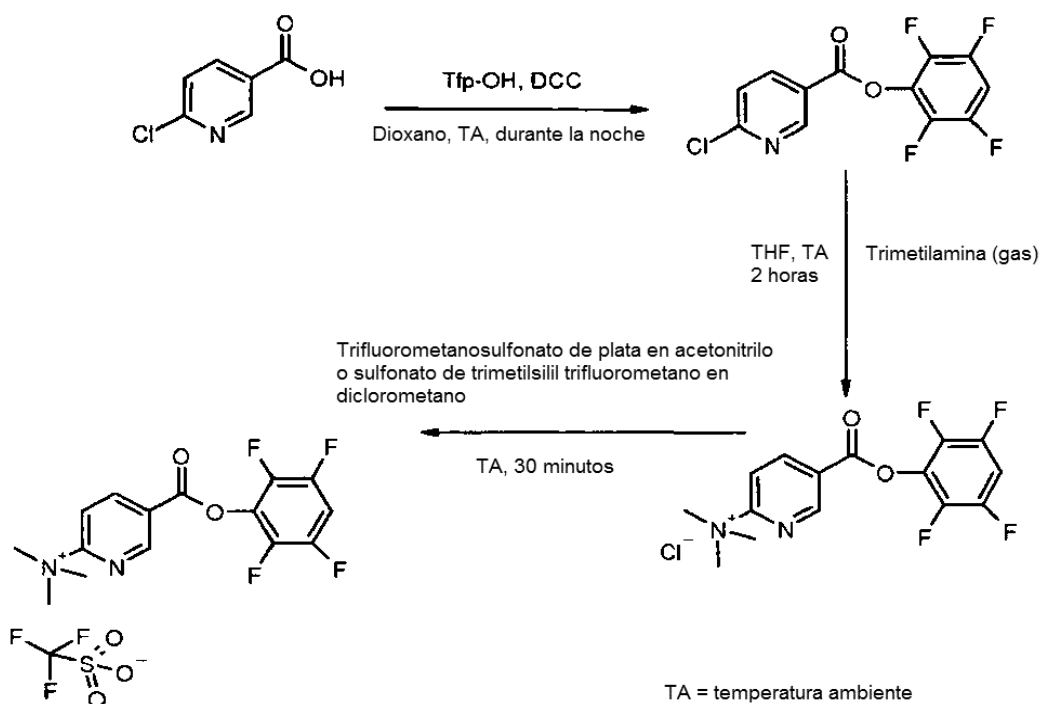
La invención se ilustrará ahora sólo a modo de ejemplo.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1. Síntesis del éster 2,3,5,6-tetrafluoro-fenílico del ácido 6-fluoro-nicotínico



El éster 2,3,5,6-tetrafluorofenol (TFP) activo del ácido 2-trimetilamonio nicotínico se sintetizó en tres etapas a partir del ácido 6-cloro nicotínico (Sigma-Aldrich). La esterificación del ácido 6-cloro nicotínico (3 g, 19 mmol) con 2,3,5,6-tetrafluorofenol (3,25 mg, 19 mmol) activado por diclohexilcarbodiimida (DCC) (3,96, 19 mmol) en 50 ml de dioxano tras la cristalización a partir de hexano dio el éster TFP del ácido 6-cloro nicotínico con 73% de rendimiento. La generación de la sal trimetilamonio por tratamiento del éster TFP del ácido 6-cloro nicotínico (1 g, 3,27 mmol) en una solución saturada de trimetilamina (burbujeo continuo durante dos horas) en tetrahidrofurano (THF) (15 ml), dio la sal trimetilamonio con cloruro como contraión con un rendimiento del 45%. El material sin reaccionar se pudo filtrar, ya que la sal precipita de la solución de tetrahidrofurano. La generación de la sal triflato se puede conseguir de dos maneras: o bien por tratamiento de la correspondiente sal cloruro con triflato de plata en un exceso molar de 1,2 en acetonitrilo o tratamiento con trifluorometanosulfonato de trimetilsililo. Esta última es la opción preferida, ya que el procesamiento es más simple y no se necesita cromatografía preparativa. Ambos procedimientos son casi cuantitativos.



El precursor sintetizado (9,2 mg) se marcó inicialmente con  $^{19}\text{F}$  por medio de K222 (10 mg) y KF (1,1 mg) en acetonitrilo (0,7 ml). La reacción de  $^{19}\text{F}$  con el éster Tfp se estudió mediante RMN de  $^1\text{H}$  en acetonitrilo- $d_6$  a  $27^\circ\text{C}$  para evaluar la cinética de reacción y las impurezas formadas.

### Ejemplo Comparativo

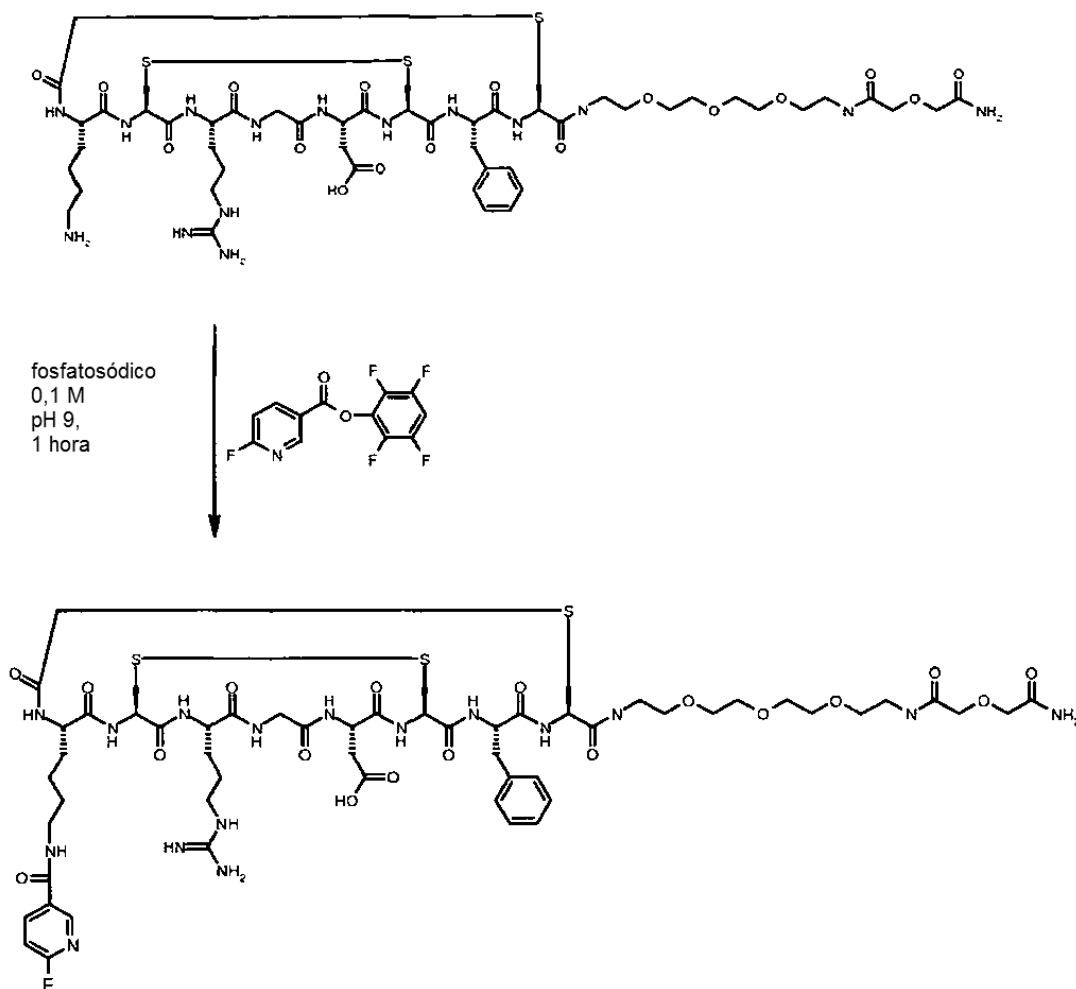
- 5 El éster *N*-hidroxisuccinimida (NHS) del ácido 2-trimetilamonio nicotínico se sintetizó a partir del ácido 6-cloro-nicotínico y se marcó con  $^{19}\text{F}$  por analogía a los procedimientos anteriores.

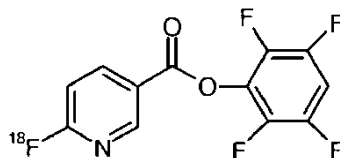
#### Resultados:

10 Ambos ésteres se sintetizaron con buenos rendimientos (> 30% a partir del ácido 6-cloro nicotínico) y se hace reaccionar fácilmente con fluoruro en acetonitrilo a temperatura ambiente. El éster NHS era más propenso a la hidrólisis que el éster TPF y, por lo tanto, no se evaluó adicionalmente. Los estudios de la reacción del éster Tfp mediante RMN de  $^1\text{H}$  durante 30 minutos mostró una rápida incorporación de fluoruro a temperatura ambiente, después de 2,5 minutos, 32% de el material de partida se convirtió en el producto fluorado deseado. En un conjunto de experimentos se obtuvo el 70% del producto fluorado en menos de 20 minutos. Se identificaron dos derivados del ácido nicotínico como productos secundarios junto con el producto deseado.

### 15 Ejemplo 2: Reacción del éster 2,3,5,6-tetrafluoro-fenílico del ácido 6-fluoro-nicotínico con péptido RGD funcionalizado

20 La reacción del producto fluorado del Ejemplo 1 (1 mg) con un péptido RGD adecuadamente funcionalizado (5 mg, preparado como se describe en los documentos WO 01/77415 y WO 03/006491) en una solución 1:1 de acetonitrilo fosfato sódico 0,1 M pH 9 (total de 3 ml) dio el producto deseado, analizado por CL-EM. Condiciones de la CL-EM: Phenomenex Luna C18(2)  $3\mu$  2 x 50 mm, fase móvil A: Agua/ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% fase móvil B: acetonitrilo/TFA 0,1%, caudal 0,6 ml/min, 10-30% de B durante 5 min. Tiempo de retención (Tr) = 3,42 min,  $\text{M}+\text{H}^+$  (esperado 1381,5, hallado 1381,6).



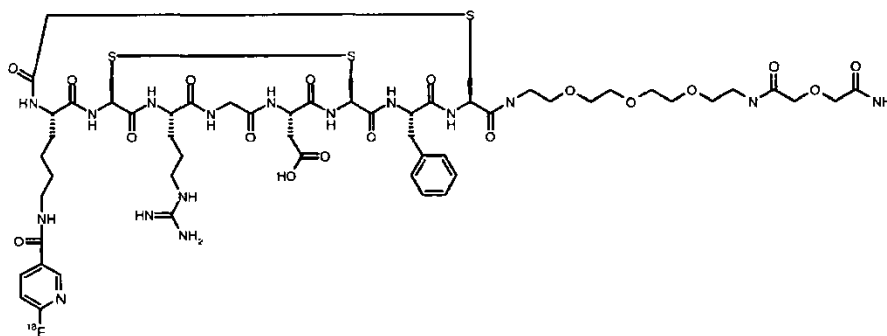
**Ejemplo 3: Radiosíntesis del éster 2,3,5,6-tetrafluoro-fenílico del ácido 6-<sup>18</sup>F]fluoro-nicotínico**

Se secó azeotrópicamente [<sup>18</sup>F]fluoruro acuoso (hasta 150 MBq) en la presencia de 15 mg de Kryptofix 222 y 3 mg de bicarbonato de potasio (KHCO<sub>3</sub>) calentando en atmósfera de N<sub>2</sub> a 100°C durante 9 minutos. Durante este tiempo se añadieron 2x1 ml de acetonitrilo y se evaporó. Después de enfriar a 40°C, se añadió una solución de metanosulfonatotrimetil-[5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenoxicarbonil)-piridin-2-il]-amonio (7 mg en 1 ml de acetonitrilo). El recipiente de reacción se calentó a 40°C durante 10 minutos para efectuar el marcado. La mezcla de reacción en bruto se sometió a radio-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) y radio-TLC (cromatografía en capa fina) con co-inyección del patrón de referencia frío para confirmar la generación del <sup>18</sup>F-compuesto diana. Los rendimientos de incorporación estaban típicamente entre 50-80% tal como se determinó por radio-TLC (n = 3). **Radio-TLC:** Placas de gel de sílice 60 F pre-recubiertas F<sub>254</sub> (Merck) Gradiente n-hexano/acetato de etilo 50:50. Se utilizó un aparato Instant Imager (Packard BioScience) para medir la distribución radiactiva en las placas de TLC. Rf: 0,65

**Radio-HPLC:** Se realizó una radio-HPLC analítica en un sistema Agilent (serie 1100) con detección UV equipado en serie con un detector  $\gamma$  (Bioscan recuento de flujo). Columna Phenomenex Luna C18 (2) (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), flujo 1,0 ml/min con gradiente de 20-80% de B durante 20 min. (La detección UV a 214 y 254 nm se combinó con un detector  $\gamma$ ). Tr 14,4 min.

Purificación

La mezcla de reacción bruta que contiene éster 2,3,5,6-tetrafluoro-fenílico del ácido [<sup>18</sup>F]fluoro-nicotínico en 2 ml de acetonitrilo, se diluyó hasta acetonitrilo al 30% con agua destilada. La solución acuosa se pasó a través de un cartucho Oasis MCX más (acondicionado de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes). A continuación, el cartucho se lavó con 5 ml de agua destilada. El producto purificado se eluyó a continuación de la columna con acetonitrilo al 100% con una pureza radioquímica superior al 90%. Todos los restos de precursor sin reaccionar metanosulfonato trimetil-[5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenoxicarbonil)-piridin-2-il]-amonio se mantuvieron en el cartucho.

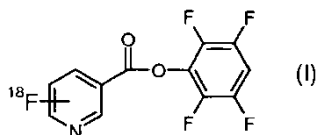
**Ejemplo 4: Conjugación del éster 2,3,5,6-tetrafluoro-fenílico del ácido 6-<sup>18</sup>F]fluoro-nicotínico con un péptido RGD cíclico con funcionalidad amino libre**

A una solución del éster 2,3,5,6-tetrafluoro-fenílico del ácido 6-<sup>18</sup>F]fluoro-nicotínico purificado en 1,5 ml de una solución 1:1 de acetonitrilo/agua, se añadieron 3 mg del péptido RGD adecuadamente funcionalizado (Pm: 1258,47) disuelto en un 1 ml de una solución 1:1 de acetonitrilo y NaHPO<sub>4</sub> 0,1 M. La mezcla resultante con un pH de 9, se calentó a 40°C. Después de 30 minutos se analizó una pequeña alícuota de la mezcla con radio-HPLC. El radiocromatograma mostró la conversión en el producto deseado con un rendimiento de más del 65%. El producto co-eluyó con su <sup>18</sup>F-patrón de referencia.

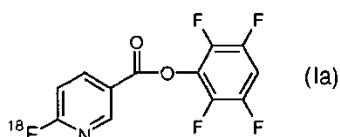
**Radio-HPLC:** Se realizó una radio-HPLC analítica en un sistema Agilent (serie 1100) con detección UV equipado en serie con un detector  $\gamma$  (Bioscan recuento de flujo). Columna Phenomenex Luna C18(2) (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), flujo 1,0 ml/min con gradiente de 0-40% de B durante 20 min. (La detección UV a 214 y 254 nm se combinó con un detector  $\gamma$ ). Tr 10,0 min.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):

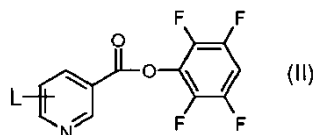


2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de fórmula (Ia):



5

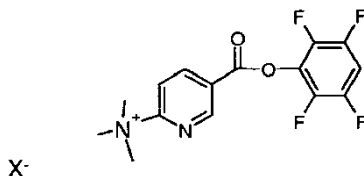
3. Un compuesto de fórmula (II):



o una sal del mismo, en la que L es un grupo saliente seleccionado entre cloro, bromo, yodo, nitro y tri(alquil<sub>C1-6</sub>) amonio (convenientemente trimetil amonio).

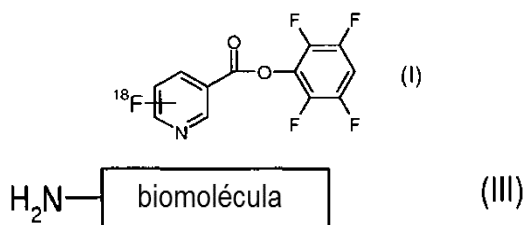
10 4. Un compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo, de acuerdo con la reivindicación 3, en el que L es tri(alquil<sub>C1-6</sub>) amonio (convenientemente trimetil amonio).

5. Un compuesto de fórmula (II), según la reivindicación 3 o 4, que es:



en la que X<sup>-</sup> es un contraión y es preferiblemente trifluorometanosulfonato.

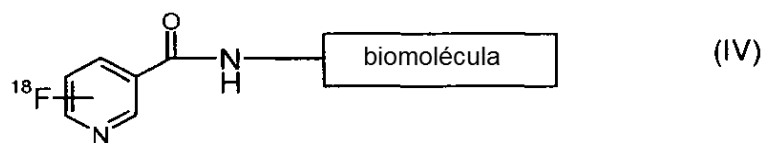
15 6. Un procedimiento para la fluoración con <sup>18</sup>F que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (I) o (Ia), como se define en la reivindicación 1 o 2, con un compuesto de fórmula (III):



20

para dar un <sup>18</sup>F-producto de fórmula (IV):

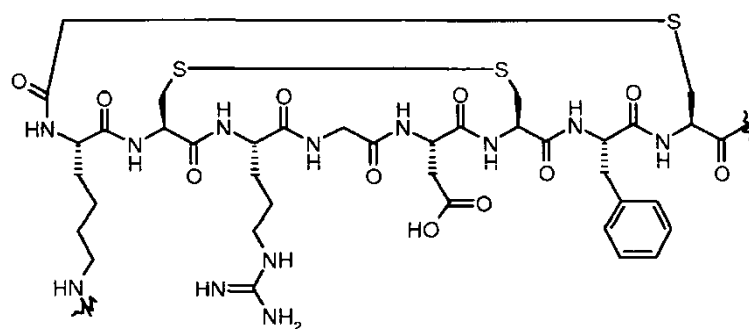




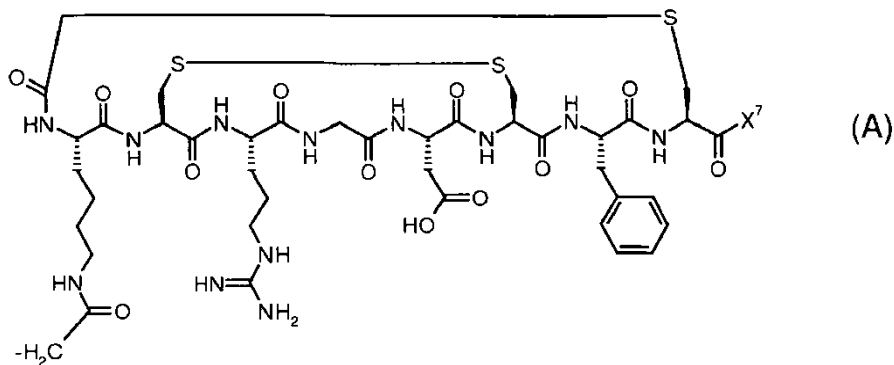
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 en el que la biomolécula es un péptido.

8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 en el que la biomolécula es un péptido seleccionado de análogos de la somatostatina, tales como octreótido, bombesina, péptido intestinal vasoactivo, análogos de péptidos quimiotácticos, hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocitos, neurotensina, péptido Arg-Gly-Asp y sus análogos, péptido de conexión de la pro-insulina humana, endotelina, angiotensina y formil-norleucil-leucil-fenilalanil-norleucil-tirosil-lisina.

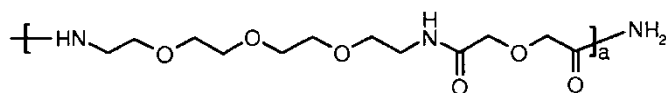
9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en el que la biomolécula comprende el fragmento:



10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 en el que la biomolécula es un péptido de fórmula (A):



en la que  $X^7$  es o bien  $-NH_2$  o



donde a es un número entero de 1 a 10, preferiblemente a es 1.