

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 070**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2012 E 12730230 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2595666**

54 Título: **Método de marcaje de una molécula biológicamente activa con una 5-fluoro-5-desoxipentosa o una 3-fluoro-3-desoxipentosa**

30 Prioridad:

17.06.2011 GB 201110239

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

20.11.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF ST ANDREWS (50.0%)
College Gate, North Street
St Andrews, Fife KY16 9AJ, GB y
TURUN YLIOPISTO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**O'HAGAN, DAVID y
LI, XIANG-GUO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 523 070 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

Método de marcaje de una molécula biológicamente activa con una 5-fluoro-5-desoxipentosa o una 3-fluoro-3-desoxipentosa

5

Antecedentes

La presente invención se refiere a conjugados de compuestos biológicamente activos, tales como proteínas o péptidos, y 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosas o 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosas, a procedimientos de fabricación de los mismos y al uso de dichos conjugados que comprenden 5-¹⁸F-5-desoxipentosas o 3-¹⁸F-3-desoxipentosas en la formación de imágenes, en particular, la formación de imágenes mediante tomografía por emisión de positrones.

10

Introducción

El isótopo de flúor-18 tiene un uso muy extendido para aplicaciones médicas de formación de imágenes por tomografía de emisión de positrones (PET). Tiene una semivida de 110 minutos y, por lo tanto, los métodos para preparar y manipular las moléculas que contienen ¹⁸F han de ser rápidos. El hidrato de carbono más comúnmente usado para la PET es la 2-¹⁸F-fluoro-2-desoxiglucosa (2-[¹⁸F]-FDG, comúnmente denominada FDG, es decir, de modo que el contexto implica el marcaje con ¹⁸F), lo que representa más del 90 % de todos los estudios de marcaje con flúor-18 en el campo clínico a nivel internacional. La FDG se administra más comúnmente a pacientes con cáncer para la detección y monitorización de tumores, y, por esta razón, la 2-FDG se prepara rápidamente a partir de fluoruro-18 (producido en un ciclotrón) en muchos centros de PET y hospitales de todo el mundo.

15

20

Hay una demanda creciente por el marcaje, o la ligadura, de entidades biológicamente activas, tales como péptidos y proteínas, con ¹⁸F. Los péptidos y las proteínas se pueden diseñar específicamente para que reconozcan los tipos de tejidos enfermos o de células enfermas y, si se marcan con flúor-18 y se inyectan en un paciente, se puede generar una imagen de los tipos de tejidos/células enfermos. Por lo tanto, los conjugados de proteínas que contienen ¹⁸F se pueden usar para la formación de imágenes (por ejemplo, mediante PET), permitiendo de este modo a los médicos diagnosticar o controlar la enfermedad.

25

30

Un desafío tecnológico significativo radica en lograr la unión eficaz del isótopo de flúor-18 con la proteína. En este sentido, se han usado moléculas pequeñas hidrófobas que contienen ¹⁸F, incluyendo compuestos fluoroaromáticos tales como 4-[¹⁸F]-fluorobenzaldehído. Sin embargo, es deseable añadir marcadores hidrosolubles de manera que las propiedades globales de la proteína marcada con ¹⁸F resultante no se desvíen demasiado significativamente de las de la proteína precursora.

35

Los hidratos de carbono pequeños ofrecen la oportunidad de abordar el problema encontrado con el uso de los compuestos fluoroaromáticos y, en dicho contexto, la FDG se ha explorado ampliamente como la molécula de marcaje (véase, por ejemplo, el documento WO 2005/086612 A2 (Immunomedics, Inc.), porque se puede obtener fácilmente, debido a su uso clínico existente. La ligadura de FDG a las proteínas sigue suponiendo un reto químico, pues se han desarrollado pocos métodos de conjugación eficaces. La formación de oximas, sin embargo, es uno de los métodos más adaptables para lograr la ligadura de los azúcares (véase R. Haubner, H. J. Wester, F. Burkhart, R. Senekowitsch-Schmidtke, W. Weber, S. L. Goodman, H. Kessler y M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.* 2001, 42, 326-336; M. Schottelius, F. Rau, J. C. Reubi, M. Schwaiger y H-J. Wester, *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 429-437; R. D. Egleton y T. P. Davis, *NeuroRx*, 2005, 2, 44-53; y D. E. Olberg y O. K. Hjelstuen, *Curr. Topics Med. Chem.*, 2010, 10, 1669-1679).

40

45

Hasta la fecha, la FDG es, de hecho, el único azúcar fluorado que se ha usado para formar oximas con péptidos. Convenientemente, la FDG se prepara en, o se envía a, prácticamente todos los centros de PET del mundo. Sin embargo, un problema importante con las ligaduras de proteína y FDG es la baja eficacia en la formación de los conjugados deseados, por ejemplo, a través de la formación de oximas. Por consiguiente, se han de usar temperaturas de reacción altas (hasta 130 °C) y valores de pH muy bajos (tan bajos como de 1-2) para permitir la eficacia adecuada de las reacciones de conjugación. No obstante, dichas condiciones no son deseables: la alta temperatura y el bajo pH no son adecuados para la mayoría de las proteínas y los péptidos, que son susceptibles a la degradación en dichas condiciones.

50

55

Dos publicaciones recientes (de 2010) han descrito el desarrollo de métodos alternativos, más elaborados, para abordar el problema de la baja eficacia de la ligadura de la FDG con proteínas.

El primero implicaba una inhibición basada en un mecanismo de la enzima glucocerebrosidasa (GCasa) por [¹⁸F]-FDG, que aseguró una molécula de [¹⁸F]-FDG en el sitio activo (C. P. Phenix, B. P. Rempel, K. Colobong, D. J. Doudet, M. J. Adam, L. A. Clarke y S. G. Withers. *PNAS*, 2010, 107, 10842-10847). Sin embargo, dicho método se restringe a la enzima GCasa y enzimas relacionadas, y, por lo tanto, no es de aplicación general.

60

El segundo método descrito implica la incorporación inicial de una azida en la posición 1 de la FDG para permitir una reacción denominada de "clic" con un aminoácido que contiene acetileno diseñado por ingeniería genética en la

65

5 proteína (véase O. Boutureira, F. D'Hooge, M. Fernandez-Gonzalez, G. J. L. Bernardes, M. Sanchez-Navarro, J. R. Koeppel y B. G. Davis, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 8142-8144; S. Maschauer y O. Prante, *Carbohydr. Res.* 2009, 344, 753-761; S. Maschauer, J. Einsiedel, R. Haubner, C. Hocke, M. Ocker, H. Hubner, T. Kuwert, P. Gmeiner y O. Prante, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 976-979; y O. Prante, J. Einsiedel, R. Haubner, P. Gmeiner, H.-J. Wester, T. Kuwert y S. Maschauer, *Bioconjugate Chem.* 2007, 18, 254-262). La necesidad de modificar la FDG con el fin de permitir la introducción de la funcionalidad azida reduce la eficacia global del proceso de conjugación, lo que no es deseable.

10 Por tanto, es deseable proporcionar una forma alternativa de fabricación de moléculas biológicamente activas marcadas con ^{18}F , tales como proteínas y péptidos, para abordar una o más de las deficiencias de la técnica descrita o a la que se ha hecho alusión anteriormente.

Sumario

15 Habiéndose estudiado la baja eficacia de las reacciones de formación de oximas entre la FDG y las proteínas, los presentes inventores han postulado que esta se puede deber a la tendencia de la FDG a existir en una forma de piranosa de anillo cerrado en lugar de en forma de un compuesto que contiene aldehído de anillo abierto. Si bien este es un fenómeno bien conocido para las aldohexosas, los presentes inventores piensan que, con la FDG, la ubicación del átomo de flúor electronegativo en la posición 2 suprimirá la apertura del anillo en el aldehído y dirigirá el equilibrio todavía más hacia la forma de piranosa, suprimiendo así la velocidad de conjugación con una molécula que contiene aminooxi. Cuando se desea hacer reaccionar la funcionalidad aldehído con una funcionalidad aminooxi para proporcionar una oxima, los presentes inventores piensan que dicha tendencia podría explicar las bajas eficacias de ligadura en la técnica anterior.

25 Los presentes inventores piensan que, además de la colocación específica del flúor, un anillo de 5 miembros se abre más rápidamente que un anillo de 6 miembros.

30 Como consecuencia de dichas consideraciones, pero sin quedar limitados a las mismas, se ha encontrado que las 5-fluoro-5-desoxi-pentosas o las 3-fluoro-3-desoxi-pentosas, por ejemplo, las 5- ^{18}F -fluoro-5-desoxi-pentosas o las 3- ^{18}F -fluoro-3-desoxi-pentosas, participan de manera más eficaz en las reacciones de ligadura, en particular, en las reacciones de ligadura que implican la aminación del grupo carbonilo en la forma de cadena abierta de dichas desoxipentosas, que las moléculas de hidrato de carbono fluoradas, en general, y la FDG, en particular.

35 Por lo tanto, vista desde un primer aspecto, la invención proporciona un conjugado que comprende una molécula biológicamente activa y una 5- ^{18}F -fluoro-5-desoxipentosa o una 3- ^{18}F -fluoro-3-desoxipentosa.

40 Vista desde un segundo aspecto, la invención proporciona un método de fabricación de un conjugado de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende la reacción de una molécula biológicamente activa con una 5- ^{18}F -fluoro-5-desoxipentosa o una 3- ^{18}F -fluoro-3-desoxipentosa.

Vista desde un tercer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un conjugado del primer aspecto de la invención junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

45 Vista desde un cuarto aspecto, la invención proporciona un conjugado o una composición de la invención para su uso en un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.

50 Vista desde un quinto aspecto, la invención proporciona un método de formación de imágenes de un sujeto, que comprende la administración de un conjugado o una composición que contiene ^{18}F de la invención al sujeto y la formación de imágenes de la distribución de ^{18}F dentro del sujeto, usando, por lo general, PET.

55 Vista desde un sexto aspecto, la invención proporciona un conjugado o una composición que contiene ^{18}F para su uso en un método de diagnóstico de una enfermedad o afección, en el que se administra el conjugado o la composición que contiene ^{18}F de la invención a un sujeto, se forman imágenes de la distribución de ^{18}F en el sujeto, y, si está presente, se diagnostica la enfermedad o afección.

De acuerdo con aspectos adicionales de la invención relacionados con el quinto y sexto aspecto de la invención, la administración del conjugado o de la composición de la invención se ha efectuado antes de la formación de imágenes de acuerdo con el quinto y sexto aspecto.

60 Otros aspectos y otras realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la descripción más detallada de la invención, y de los posteriores ejemplos, que se presentan a continuación.

Breve descripción de las figuras

65 La Fig. 1 representa el equilibrio entre las formas de piranosa y de cadena abierta de 2- ^{18}F -FDG (**1a**) y 5- ^{18}F -FDR (**1b**).

La Fig. 2 muestra un esquema para la conjugación de 5-[¹⁹F]-FDR (**1b**) con péptidos.

La Fig. 3 representa una síntesis conocida de FDR fría (**1b**; 5-[¹⁹F]-FDR).

La Fig. 4 representa una síntesis conocida de un compuesto aminooxi **2**.

La Fig. 5 representa una síntesis típica del compuesto aminooxi derivado de glutatión **3**.

5 La Fig. 6 representa un esquema para la conjugación del compuesto aminooxi derivado de glutatión **3a** con FDR fría (**1b**; 5-[¹⁹F]-FDR) para proporcionar un conjugado de oxima marcada con ¹⁹F **4a**.

La Fig. 7(a) muestra las configuraciones del conjugado de oxima marcada con ¹⁹F **4a** en D₂O a 20 °C. La Fig. 7(b) representa señales de RMN de ¹H (N=CH) para el isómero *E* y *Z* de **4a**, respectivamente.

10 La Fig. 8 representa un esquema para la conjugación del compuesto aminooxi **2** con FDR fría (**1b**; 5-[¹⁹F]-FDR) para proporcionar un conjugado de oxima marcada con ¹⁹F **7**.

La Fig. 9 representa una síntesis enzimática conocida de ¹⁸F-fluororribosa (**1b**; ¹⁸F-FDR).

La Fig. 10 representa un esquema para la conjugación de 5-[¹⁸F]-FDR (**1b**) con péptidos.

Descripción detallada

15 La presente invención se basa en el hallazgo de los presentes inventores de que las 5-fluoro-5-desoxipentosas y las 3-fluoro-3-desoxipentosas participan de manera más eficaz en las reacciones de ligadura, particularmente, en las reacciones de ligadura que implican la aminación del grupo carbonilo de la desoxipentosa en su forma de cadena abierta, por ejemplo, para formar oximas, que las moléculas de hidratos de carbono fluorados, en general, y que la FDG, en particular. Por tanto, la presente invención permite provechosamente la provisión de conjugados de desoxipentosas, marcadas en las posiciones 5 y/o 3 con ¹⁸F, y moléculas biológicamente activas.

20 De acuerdo con realizaciones particulares de todos los aspectos de la presente invención, el flúor presente en la posición 5 o 3 es ¹⁸F y, en particular, está presente en la posición 5, mediante lo cual se proporcionan 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosas. A continuación, se describe la invención con referencia en concreto a dichas realizaciones.

Los términos "ligar" o "ligadura" usados en el presente documento pretenden significar el acoplamiento de dos o más moléculas. Como se usan en el presente documento, dichos términos son sinónimos de los términos "conjugar" y "conjugación", respectivamente. Un conjugado es el producto de una reacción de ligadura o conjugación.

30 Como es conocido en la técnica, una pentosa es un monosacárido que comprende cinco átomos de carbono, y por lo general, de fórmula química C₆(H₂O)₅ (C₅H₁₀O₅). Como también es conocido, las pentosas pueden ser bien aldosas (aldopentosas) o cetosas (cetopentosas). Las aldopentosas se pueden obtener de forma natural (D-aldopentosas) o artificial (L-aldopentosas). Las aldopentosas naturales son D-ribosa, D-xilosa, D-arabinosa y D-lixosa. Hay cuatro L-aldopentosas no naturales correspondientes. Entre las cetopentosas, los compuestos 2-ceto (ribulosa y xilulosa) son más comunes.

40 Los derivados desoxi de las pentosas, es decir, las desoxipentosas, conservan la estructura esencial que contiene cinco átomos de carbono del compuesto precursor. El término "desoxipentosas" pretende significar, en el presente documento, pentosas que tienen uno o más, normalmente uno, dos o tres, de los grupos hidroxilo en el compuesto precursor reemplazados, independientemente, por un átomo de hidrógeno o un sustituyente alternativo. Cuando no se especifica el sustituyente de la posición "x" en una x-desoxipentosa, la convención dicta que el grupo hidroxilo se ha reemplazado por un átomo de hidrógeno. Por lo tanto, una 2-desoxirribosa es un derivado de ribosa en el que el grupo 2-hidroxi de la ribosa está reemplazado por un sustituyente no especificado, que puede ser hidrógeno; y la 2-desoxirribosa es un derivado de ribosa en el que el grupo 2-hidroxi de la ribosa está reemplazado por hidrógeno.

50 En las desoxipentosas presentes en los conjugados de la invención, al menos el grupo 5-hidroxilo de la pentosa precursora está ausente y reemplazado por un átomo de flúor-18, y/o el grupo 3-hidroxilo de la pentosa precursora está ausente y reemplazado por un átomo de flúor-18. En otras palabras, los conjugados del primer aspecto de la invención comprenden una 5-fluoro-5-desoxipentosa, una 3-fluoro-3-desoxipentosa o una 3,5-fluoro-3,5-didesoxipentosa, entendiéndose 3,5-fluoro-3,5-didesoxipentosa como un ejemplo tanto de una 5-fluoro-5-desoxipentosa como de una 3-fluoro-3-desoxipentosa.

55 En algunas realizaciones, las desoxipentosas que están marcadas en la posición 3 y/o 5 con flúor son 2-desoxipentosas, por ejemplo, son 5-fluoro-2,5-didesoxipentosas, 3-fluoro-2,3-didesoxipentosas, 5-fluoro-2,3,5-tridesoxipentosas o 3-fluoro-2,3,5-tridesoxipentosas, por ejemplo, 3,5-difluoro-2,3,5-tridesoxipentosas.

60 El grupo hidroxilo ausente en una desoxipentosa, cuando no está reemplazado por un átomo de flúor, puede estar reemplazado por un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, halo distinto de flúor, alquilo, alquenilo, alquínilo, amino (-NH₂), dialquilamino y alcoxi). Por lo general, el grupo hidroxilo ausente de una 2-desoxipentosa no está reemplazado por un halógeno, en particular, no está reemplazado por un átomo de flúor.

65 Los ejemplos de desoxipentosas presentes en los conjugados de la invención incluyen, por lo tanto, 2-, 3- y 5-desoxipentosas, por ejemplo, 5-fluoro-2,5-didesoxirribosas tales como 5-fluoro-2,5-didesoxirribosa; 3-fluoro-2,3-didesoxirribosas tales como 3-fluoro-2,3-didesoxirribosa; 5-fluoro-3,5-didesoxirribosas tales como 5-fluoro-3,5-didesoxirribosa y 3-cloro-5-fluoro-3,5-didesoxirribosa; 5-fluoro-2,3,5-tridesoxirribosas tales como 5-fluoro-2,3,5-

tridesoxirribosa; 3-fluoro-2,3,5-tridesoxirribosas tales como 3-fluoro-2,3,5-tridesoxirribosa; y 3,5-difluoro-2,3,5-tridesoxirribosas tales como 3,5-difluoro-2,3,5-tridesoxirribosa, incluyendo derivados de alquilo, amino y alcoxi de cualquiera de los anteriores en los que un átomo de carbono de una desoxirribosa carente de un grupo hidroxilo en el que no se especifica que tiene un sustituyente alternativo está sustituido con un sustituyente alquilo, amino o alcoxi.

El término "alquilo" pretende significar, en el presente documento, un radical hidrocarbilo saturado, que puede ser de cadena lineal, cíclico o ramificado (normalmente, de cadena lineal). Cuando el grupo hidrocarbilo tiene uno o más sitios de insaturación, estos pueden estar constituidos por dobles enlaces carbono-carbono o por triples enlaces carbono-carbono. Cuando un grupo alquilo comprende un doble enlace carbono-carbono, este proporciona un grupo alqueno; la presencia de un triple enlace carbono-carbono proporciona un grupo alquino. Por lo general, los grupos alquilo, alqueno y alquino comprenderán de 1 a 10 átomos de carbono, más normalmente de 1 a 6 átomos de carbono, entendiéndose que el límite inferior en los grupos alqueno y alquino es de 2 átomos de carbono y, en los grupos cicloalquilo, de 3 átomos de carbono.

Halo es flúor, bromo, cloro o yodo.

Alquiloxi (sinónimo de alcoxi) es de fórmula -O-alquilo, donde el alquilo es como se ha definido anteriormente en el presente documento.

Un grupo dialquilamino es de fórmula -N(R)₂, en la que cada R es, independientemente, alquilo o en la que los dos R unidos al átomo de nitrógeno N están conectados para formar un dirradical de alqueno (derivado formalmente de un alcano del cual se han extraído dos átomos de hidrógeno, normalmente de átomos de carbono terminales) mediante lo que se forma un anillo junto con el átomo de nitrógeno N.

Por lo general, las 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosas o las 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosas, de acuerdo con los diversos aspectos de la invención, son aldodesoxipentosas, en particular, aldodesoxi-D-pentosas. De acuerdo con realizaciones particulares de los diversos aspectos de la invención, la desoxipentosa marcada en la posición 5 o 3 con ¹⁸F es una D-desoxirribosa. Por lo tanto, de acuerdo con realizaciones particulares de los diversos aspectos de la presente invención, la desoxipentosa es una 5-desoxi-5-¹⁸F-fluoro-aldopentosa, por ejemplo, una 5-desoxi-5-¹⁸F-fluoro-D-aldopentosa. De acuerdo con realizaciones particulares de la invención, la desoxipentosa marcada en la posición 5 o 3 con ¹⁸F es una 5-desoxi-5-¹⁸F-fluororribosa o una 3-desoxi-3-¹⁸F-fluororribosa, en particular, 5-desoxi-5-¹⁸F-fluoro-D-ribosa o 3-desoxi-3-¹⁸F-fluoro-D-ribosa. La 5-desoxi-5-¹⁸F-fluoro-D-ribosa se denomina en lo sucesivo FDR o FDR caliente (la FDR fría se refiere, en el presente documento, a la 5-desoxi-5-¹⁹F-fluoro-D-ribosa) y la descripción de la invención se centra en dicha realización particular.

Las 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosas o las 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosas, incluyendo, pero sin limitación, la FDR, se pueden preparar mediante métodos tanto químicos como enzimáticos. La FDR, por ejemplo, se describe bien en la literatura (véase, en particular, M Onega *et al.*, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 139-141, en el que se describe una ruta enzimática para su síntesis, y la literatura a la que se hace referencia en el mismo; véase también la Fig. 9 del presente documento). El experto podrá sintetizar fácilmente otras 5-fluoro-5-desoxipentosas y 3-fluoro-3-desoxipentosas.

Los conjugados particulares de la presente invención comprenden una 5-desoxipentosa marcada con ¹⁸F en 5, por ejemplo, FDR, y una molécula biológicamente activa para permitir la dirección del conjugado a determinados tipos de tejidos enfermos o de células enfermas. La expresión "molécula biológicamente activa" pretende significar, en el presente documento, una molécula que presenta un efecto farmacológico en un sujeto de interés, tal como en un cuerpo humano o animal.

No se limita específicamente la naturaleza de las moléculas biológicamente activas que se pueden conjugar con las 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosas o las 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosas, siempre que la molécula biológicamente activa sea susceptible a la conjugación con dichas desoxipentosas. Como se describe a continuación, aunque la presente invención se ilustra con un péptido y una proteína, el experto comprenderá a partir de la técnica que, de acuerdo con la presente invención, se puede usar una amplia variedad de moléculas biológicamente activas, incluyendo proteínas, péptidos (que pretenden significar una molécula que comprende una secuencia de entre 2 y 300, por ejemplo, de entre 2 y 20, aminoácidos de origen natural o no natural), ácidos nucleicos, oligosacáridos y polisacáridos. Por ejemplo, las moléculas biológicamente activas pueden ser una hormona, un factor de crecimiento, un anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo quimérico, humanizado o completamente humano, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Por lo general, la molécula biológicamente activa tendrá un peso molecular inferior a 100.000 Da, generalmente inferior a 10.000 Da. De acuerdo con estas y otras realizaciones de la invención, la molécula biológicamente activa puede ser un posible compuesto farmacéutico.

En los siguientes ejemplos, se ilustra la presente invención con el uso del péptido glutatión y una proteína Affibody. El glutatión (un tripéptido natural) se seleccionó como modelo de péptido para optimizar las condiciones de conjugación. Para demostrar la utilidad de la invención para una posible aplicación médica, se describe el marcaje con ¹⁸F de una Affibody.

Dicha Affibody es una proteína corta (6,9 kDa) diseñada por ingeniería genética a partir del dominio B de la región de unión a inmunoglobulina de la proteína A estafilocócica (J. Löfblom, J. Feldwisch, V. Tolmachev, J. Carlsson, S. Ståhl y F. Y. Frejd, *FEBS Lett.* 2010, 584, 2670-2680). Tiene afinidad picomolar hacia el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), que es sobre-expresado en muchos tipos de células cancerosas, por ejemplo, en el cáncer de mama (A. Orlova, M. Magnusson, T. L. J. Eriksson, M. Nilsson, B. Larsson, I. Hoiden-Guthenberg, C. Widstrom, J. Carlsson, V. Tolmachev, S. Ståhl y F. Y. Nilsson, *Cancer Res.* 2006, 66, 4339-4348). Hasta la fecha, la Affibody se ha unido principalmente con nucleidos metálicos (por ejemplo, ^{68}Ga y ^{111}In) para la formación de imágenes médicas (V. Tolmachev, M. Altai, M. Sandström, A. Perols, A. E. Karlström, F. Boschetti y A. Orlova, *Biocojugate Chem.* 2011, doi: dx.doi.org/10.1021/bc100470x). Había dos publicaciones sobre la síntesis de Affibody marcada con ^{18}F (D. O. Kiesewetter, G. Kramer-Marek, Y. Ma y J. Capala, *J. Fluor. Chem.* 2008, 129, 799-805; y Z. Cheng, O. P. De Jesus, M. Namavari, A. De, J. Levi, J. M. Webster, R. Zhang, B. Lee, F. A. Syud y S. S. Gambhir, *J. Nucl. Med.* 2008, 49, 804-813), y en ambos casos se emplearon enlazadores aromáticos hidrófobos.

Se entenderá que la naturaleza de la enfermedad, del tejido o de las células diana de las que se pueden formar imágenes solo está limitada por la disponibilidad de una molécula biológicamente activa adecuada para dirigirla a una célula o tejido de interés. Cualquier proteína o péptido que se una al tejido enfermo, tal como tejido canceroso, por ejemplo, por medio de los antígenos asociados a tumores, se puede marcar, por tanto, con una 5- ^{18}F -desoxipentosa o una 3- ^{18}F -desoxipentosa de acuerdo con la presente invención para permitir la formación de imágenes (por ejemplo, con el fin de detectar o monitorizar) la célula o el tejido de interés. Por lo tanto, de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, la invención proporciona la formación de imágenes del tejido canceroso mediante lo cual se permite el diagnóstico y la monitorización del cáncer.

Los métodos de conjugación de compuestos biológicamente activos con moléculas marcadas con ^{18}F , incluyendo los compuestos aromáticos marcados con ^{18}F y la FDG, son bien conocidos en la técnica. Como es sabido, la molécula biológicamente activa se puede conjugar con el compuesto de interés (en el presente documento, una 5- ^{18}F -desoxipentosa o una 3- ^{18}F -desoxipentosa) a través de un resto de unión, por ejemplo, un resto de unión hidrosoluble. La expresión "resto de unión" o "enlazador" es un término muy extendido en la técnica, y significa un resto bifuncional corto (por ejemplo, de aproximadamente 2 a 50, por ejemplo, de aproximadamente 3 a 10 átomos de longitud), que sirve, por ejemplo, para derivatizar una molécula biológicamente activa con el fin de introducir funcionalidad deseable que permita la conjugación con el compuesto de interés. En general, también se confieren otras ventajas mediante el uso de enlazadores. La técnica está repleta de restos de unión adecuados. Por ejemplo, los restos de unión pueden comprender una o más funcionalidades seleccionadas del grupo que consiste en aminooxi, éster, amina, disulfuro e imida. Para consultar una revisión que describe el uso de enlazadores en los conjugados de anticuerpo y fármaco, véase L. Ducry y B. Stump (*Bioconjugate Chem.*, 2010, 21(1), pág. 5-13).

De acuerdo con realizaciones particulares de la invención, la derivatización de la molécula biológicamente activa sirve para introducir un resto de unión que presente una funcionalidad amino nucleófila. Este puede participar en una aminación del grupo carbonilo presente en la forma de cadena abierta de las desoxipentosas. Dichas animaciones incluyen las reacciones de moléculas biológicamente activas con funcionalidad hidrazida o hidrazina con las desoxipentosas marcadas con ^{18}F descritas en el presente documento, con lo que se proporcionan conjugados que comprenden enlaces de hidrazona; o la reacción de moléculas biológicamente activas con funcionalidad tiosemicabazida con las desoxipentosas marcadas con ^{18}F , con lo que se proporcionan conjugados que comprenden enlaces de tiosemicabazona.

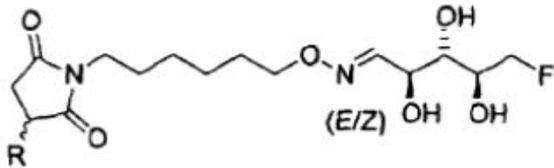
De acuerdo con realizaciones particulares de la invención, la derivatización de la molécula biológicamente activa se puede efectuar para introducir un resto de unión que muestre una funcionalidad aminooxi ($-\text{ONH}_2$). Esta derivatización permite la conjugación con una, por ejemplo, 5- o 3-fluoro-desoxipentosa o pentosa marcada con ^{18}F a través de un enlace de oxima. La metodología de conjugación en este sentido es bien conocida por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, T. Poethko *et al.* *J. Nucl. Med.*, 2004, 45, 892-902; T. Poethko *et al.* *Radiochim. Acta*, 2004, 92, 317-327; y M. Schottelius *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10, 3593-3606).

Como se ha mencionado anteriormente, es un beneficio particular de la invención que, por ejemplo, las 5- o 3-fluoro-desoxipentosas marcadas con ^{18}F , en particular, la FDR, se ligan particularmente rápido en condiciones de aminación reductora, por ejemplo, mediante la reacción de un material biológicamente activo con funcionalidad aminooxi con una desoxipentosa marcada con ^{18}F , para formar un enlace de oxima. En el presente documento, los presentes inventores demuestran que dichas reacciones avanzan directamente, de manera eficaz y en condiciones suaves. De hecho, la velocidad de la reacción es varios órdenes de magnitud más rápida que la de 2-FDG. Convenientemente, las reacciones de conjugación se pueden llevar a cabo en solución acuosa (opcionalmente, de en ausencia de disolvente orgánico) a valores de pH de entre 4 y 6, y a la temperatura ambiente (por ejemplo, entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 40 °C), en escalas temporales relativamente cortas (por ejemplo, duraciones de aproximadamente 1 a 30 minutos, por ejemplo, de aproximadamente 5 o aproximadamente 7 a 30 min). Es particularmente beneficioso que las desoxipentosas marcadas con ^{18}F tales como FDR se pueden conjugar con moléculas biológicamente activas, que opcionalmente se pueden activar previamente para introducir la funcionalidad adecuada para la reacción con las desoxipentosas marcadas con ^{18}F , que se pueden hacer reaccionar sin necesidad de derivatización previa.

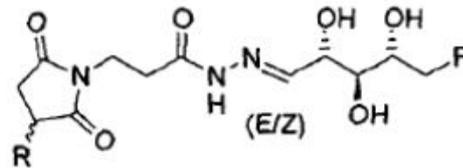
En el apartado experimental que se presenta a continuación, se desvela la preparación de compuestos (que contienen ^{19}F) "fríos". El experto entenderá que la misma química funcionará cuando se apliquen a los correspondientes compuestos que contienen ^{18}F , cuyo esquema de reacción se representa en la Fig. 10.

- 5 Algunos de los compuestos que contienen ^{18}F y ^{19}F descritos en el presente documento son nuevos *per se*. Por lo tanto, se revelan los compuestos que tienen las siguientes estructuras:

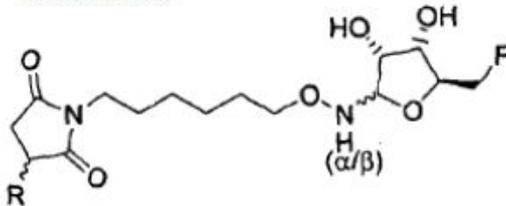
Estructura 1:



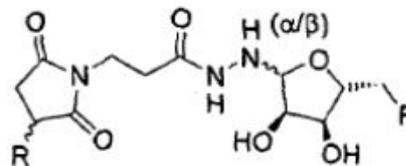
Estructura 3:



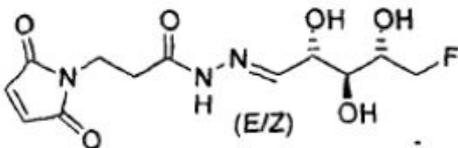
Estructura 2:



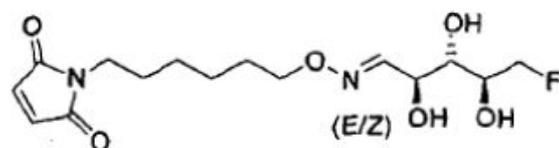
Estructura 4:



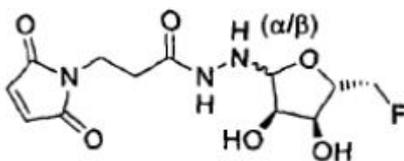
Estructura 5:



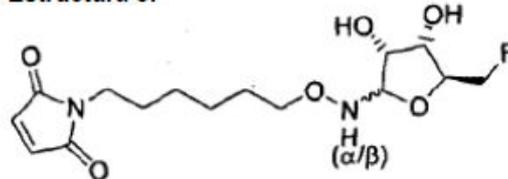
Estructura 7:



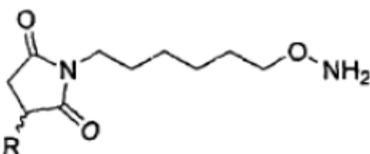
Estructura 6:



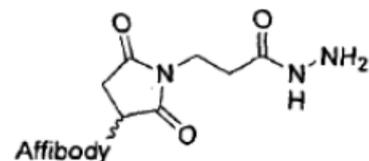
Estructura 8:



Estructura 9:

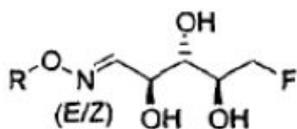


Estructura 10:

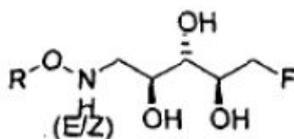


R = cualquier péptido/secuencia de proteína, a excepción del glutatión

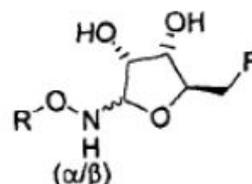
Estructura 11:



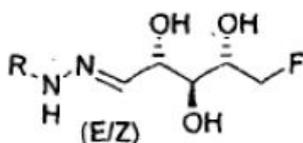
Estructura 12:



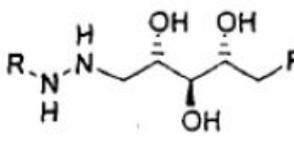
Estructura 13:



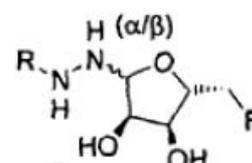
Estructura 14:



Estructura 15:



Estructura 16:



En las Estructuras 1 a 4 y 11 a 16, R puede ser el resto de cualquier molécula biológicamente activa, tal como las definidas en el presente documento, en particular, el resto de un péptido o de una proteína.

5

En cada una de las Estructuras 1 a 16, el átomo de flúor del resto representado a la derecha en cada estructura, que se deriva de 5-fluoro-5-desoxirribosa, puede ser bien flúor-18 o flúor-19. Por tanto, cuando el átomo de flúor es flúor-18, dichas realizaciones de las Estructuras 1 a 4 y 11 a 16 constituyen realizaciones del conjugado de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

10

Los compuestos de las Estructuras 1, 3, 5, 7, 11, 12 y 14 representan formas de anillo abierto de conjugados que contienen oxima o hidrazona, siendo la maleimida de la Estructura 7 susceptible a la conjugación con una molécula biológicamente activa, proporcionándose así una succinimida correspondiente como la representada como la Estructura 1.

15

Los compuestos de Estructuras 2, 4, 6, 8, 13 y 16 representan formas de anillo cerrado de conjugados que contienen oxima o hidrazona, siendo la maleimida de la Estructura 8 susceptible a la conjugación con una molécula biológicamente activa, proporcionándose así una succinimida correspondiente como la representada como la Estructura 2.

20

Los compuestos de Estructuras 9 y 10 representan succinimidias unidas a moléculas biológicamente activas con funcionalidad aminooxi e hidrazida atada adecuada para la conjugación con desoxipentosas marcadas con ^{18}F , proporcionándose así los conjugados de la presente invención.

25

El compuesto con la Estructura 15 representa el producto resultante de la reducción de la hidrazona mostrada como la Estructura 14, que mejoró la estabilidad frente a la hidrólisis.

30

Anteriormente, los presentes inventores han desarrollado un método de biosíntesis para la síntesis de ^{18}F -FDR (véase Onega *et al.* (*infra*) y las referencias citadas en el mismo, el documento WO 03/020945 y el documento WO 2004/078914 A2). Esta y otras 5-fluoro-5-desoxipentosas y 3-fluoro-3-desoxipentosas se pueden fabricar fácilmente mediante síntesis químicas sintéticas.

35

La presente invención ofrece ventajas significativas para el marcaje de proteínas, y podría encontrar un uso general en los centros de PET de todo el mundo, tanto para la investigación como para fines clínicos. El siguiente apartado experimental ilustra tanto la reactividad significativamente mayor de la FDR en una reacción de conjugación ilustrativa en comparación con otros azúcares como que una conjugación típica es técnicamente muy sencilla, usando metodologías de conjugación existentes con las que los expertos están muy familiarizados.

40

Se apreciará que los conjugados de la presente invención y otros compuestos descritos en el presente documento pueden existir en diversas formas estereoisómeras. Se ha de entender que dichos compuestos incluyen todas las formas estereoisoméricas y mezclas de las mismas, incluyendo enantiómeros, diastereómeros y mezclas racémicas. La presente invención incluye dentro de su alcance el uso de cualquiera de dichas formas estereoisoméricas o mezcla de estereoisómeros, incluyendo los enantiómeros y diastereómeros individuales de los conjugados de la invención, así como las mezclas de dichos estereoisómeros.

45

El experto también comprenderá que algunos conjugados de la invención contendrán uno o más grupos funcionales básicos tales como grupos (alquil)amino. Por lo tanto, dichos conjugados son capaces de formar sales

- farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. Los expertos habituales en la técnica entienden fácilmente la expresión “sales farmacéuticamente aceptables” y, en el presente documento, se ha de entender que se refiere a sales de adición de ácido orgánico o inorgánico relativamente no tóxicas de los conjugados de la presente invención. Dichas sales pueden prepararse *in situ* en el vehículo de administración o haciendo reaccionar por separado un compuesto purificado de la invención en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada durante la purificación posterior. Las sales representativas incluyen sales inorgánicas tales como sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato y nitrato; y sales de ácidos orgánicos tales como tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato y acetato.
- El experto también comprenderá que algunos conjugados de la invención contendrán uno o más grupos funcionales ácidos. Por lo tanto, dichos conjugados son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. Así pues, la expresión “sal farmacéuticamente aceptable”, en el presente contexto, se refiere a sales de adición de base inorgánica y orgánica relativamente no tóxicas de los conjugados de la presente invención. Dichas sales también se pueden preparar *in situ* en el vehículo de administración o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable tal como litio, sodio, potasio, calcio y magnesio, con amoníaco o con una amina farmacéuticamente aceptable tal como etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina y piperazina.
- Como se ha señalado anteriormente, los conjugados de la presente invención son de utilidad en métodos de formación de imágenes y diagnóstico del sujeto. En algunas realizaciones de dichos aspectos de la invención, el sujeto habrá recibido previamente un conjugado de la invención. En ciertas realizaciones, la formación de imágenes es la formación de imágenes por PET, y se prevé que la invención sea fácilmente susceptible a la automatización en los centros de PET.
- En una investigación de PET típica, se administra una pequeña cantidad de compuesto al sujeto, normalmente a un ser humano u otro animal. La circulación dentro del sujeto permite la absorción del compuesto, normalmente, en tipos de tejido/célula diana. De acuerdo con la presente invención, se pretende que los conjugados sean retenidos preferentemente en determinados tipos de tejidos a la luz de la molécula biológicamente activa con la que se conjugue la desoxipentosa marcada con ^{18}F . A continuación, se pueden formar imágenes de la distribución del conjugado usando la PET. Los datos resultantes constituyen información espacial cuantitativa útil para el médico, quien la puede usar para llegar a un diagnóstico. Por ejemplo, la acumulación diferencial del conjugado puede indicar la presencia de una enfermedad o un tipo de célula a la que se haya dirigido el conjugado.
- Entre otros beneficios, la PET permite investigar *in vivo* los cambios bioquímicos o efectos metabólicos de un posible candidato a fármaco. De esta manera, la PET se puede usar para medir la distribución del fármaco, permitiendo así la evaluación de la farmacocinética y la farmacodinámica de un determinado candidato a fármaco objeto de estudio. Como es conocido en la técnica, la PET se puede usar para cuantificar la presencia de sitios de unión en los tejidos.
- Por lo general, los conjugados de la presente invención se implementan como composiciones que comprenden un conjugado de la presente invención junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la formación de imágenes por PET en una cantidad suficiente para producir una imagen significativa usando un equipo de formación de imágenes por PET.
- Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia, e incluyen, pero sin limitación, tampón fosfato 0,1 M y preferentemente 0,05 M o solución salina al 0,8 %. Además, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites fijos. También puede haber conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.
- Por lo general, los conjugados se administrarán por vía parenteral, normalmente por inyección. La introducción de los conjugados en el sujeto puede ser mediante una o más administraciones, por ejemplo, por inyección. Para dicha administración, en general, los conjugados se formularán en forma de una solución acuosa estéril, libre de pirógenos, parenteralmente aceptable de acuerdo con la capacidad habitual de los expertos habituales en la materia. Un médico experto determinará cualquier cantidad apropiada para un sujeto en cuestión basándose en la edad, el peso y el género del sujeto, así como en consideraciones instrumentales.

La invención se ilustra en mayor profundidad mediante los ejemplos que se describen a continuación.

Preparación de conjugados que contienen ^{19}F (conjugados fríos)

Los experimentos se llevaron a cabo usando el tripéptido endógeno glutatión como péptido modelo para la

conjugación. La Fig. 2 muestra el esquema de síntesis llevado a cabo, que comprende la conjugación entre el enlazador **2** conocido y el glutatión o una proteína Affibody para proporcionar los compuestos **3a** y **3b**, que luego se conjugan con FDR que contiene ^{19}F (compuesto que contiene ^{19}F **1b**; FDR fría) para proporcionar los conjugados **4a** y **4b**.

5 La síntesis de FDR fría (**1b**; representado en la Fig. 3) se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento publicado (véase T. Carell *et al. Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 2325-2327; F. J. Lopez-Herrera *et al. Tetrahedron*, 1996, 52, 4757-4768; A. E. Stutz *et al. Carbohydr. Res.*, 1998, 305, 331-336; y M. J. Weiss *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 5559-5564).

10 El enlazador **2** se sintetizó de acuerdo con un procedimiento publicado (M. Berndt *et al. Nuclear Medicine Biology*, 2007, 34, 5-15).

15 Se realizó la conjugación entre **2** y el glutatión en agua a temperatura ambiente durante 3 minutos, proporcionando el compuesto **3a** con la conversión completa. En la Fig. 5, se muestra una preparación del compuesto **3a**. Un ejemplo típico de preparación se lleva a cabo de la siguiente manera: se incubó una solución de enlazador **2** (12,4 mg, 50,0 μmol) y glutatión (15,4 mg, 50,0 μmol) en agua estéril (1 ml) en un tubo Eppendorf durante 3 minutos a 25 °C. El análisis por HPLC indicó que se había logrado la conversión total. Se dividió la solución resultante de **3a** (50 mM) en agua en alícuotas y se almacenó a -80 °C para su uso posterior. El compuesto **3a** así obtenido se usó para la posterior conjugación sin necesidad de purificación. Para fines analíticos, se purificó **3a** convenientemente haciéndolo pasar a través de una columna RP C18.

25 Dado que el grupo tiol del glutatión ataca el doble enlace carbono-carbono de **2** por ambos lados, **3a** se obtuvo en forma de una mezcla de diastereómeros (como se indica), lo que explica la aparición de un saliente en la traza de HPLC del compuesto purificado.

30 En la literatura (por ejemplo, J. W. Haas, Jr. y R. E. Kadunce, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, 84, 4910-4913) se ha indicado que el pH óptimo para que la D-ribosa formara una oxima era de aproximadamente 4,6 a 25 °C. Por consiguiente, el compuesto **3a** (20 mM) se incubó con FDR (**1b**) (20 mM) en tampón de acetato de sodio (0,25 M, pH 4,6) a 25 °C, generando la formación de conjugado de péptido y azúcar **4a** con la conversión completa en 7 minutos. En la Fig. 6, se representa un procedimiento típico para la preparación del conjugado **4a**. Se llevaron a cabo las siguientes preparaciones:

35 *Experimentos a escala de ensayo:* se incubó una solución de **3a** (1,0 mg, 2,0 μmol) y FDR (0,3 mg, 2,0 μmol) en tampón de acetato de sodio (100 μl , 0,25 M, pH 4,6) en un tubo Eppendorf a 25 °C. Se tomaron muestras (2 μl cada una) a intervalos de tiempo y se diluyeron 50 veces con agua para el análisis de HPLC. La conversión total se alcanzó en 7 minutos de reacción.

40 *Experimentos a escala preparativa:* se incubó una solución de **3a** (10,4 mg, 20,0 μmol) y FDR (3,0 mg, 20,0 μmol) en tampón de acetato de sodio (1 ml, 0,25 M, pH 4,6) en un tubo Eppendorf durante 7 minutos a 25 °C. Se cargó la mezcla de reacción en una columna de cartucho RP C18. Se lavó la columna con agua (5 x 2 ml, ácido fórmico al 0,1 %) y posteriormente con tampón de elución (CH_3CN al 30 %, ácido fórmico al 0,1 % en H_2O , normalmente, 10 ml). Se combinaron las fracciones que contenían el producto **4a** y se liofilizó la solución combinada, proporcionando un producto sólido de color blanco **4a** (12,9 mg, 19,8 μmol , rendimiento aislado del 99 %). RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7,40 (d, J = 6,8 Hz, 0,8H, N=CH, isómero E), 6,78 (d, J = 6,0 Hz, 0,2H, N=CH, isómero Z), 4,93 (dd, J = 6,0 Hz, 3,0 Hz, 0,2H, N=CHCH, isómero Z), 4,58 (m, 1H), 4,43 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 4,37 (dd, J = 6,8 Hz, 4,1 Hz, 0,8H, N=CHCH, isómero E), 3,98 (m, 3H), 3,83 (s, 2H), 3,76 (m, 2H), 3,63 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 3,39 (t, J = 7,0 Hz, 2H, NCH₂), 3,21 (m, 2H), 2,99 (1 H), 2,60 (dddd, 1H), 2,21 (m, 2H), 2,02 (c, 2H), 1,43 (m, 4H), 1,20 (m, 4H). RMN de ^{19}F (470 MHz, D_2O) δ -234,70 (ddt, J = 47,4 Hz, 24,4 Hz), -235,38 (ddt, J = 47,5 Hz, 25,5 Hz).

50 Para confirmar la identidad del producto, se aisló **4a** haciéndolo pasar a través de una columna de cartucho C18 Alltech y se analizó por espectroscopia de masas (MS), RMN 1D y 2D. Como se muestra en la Fig. 7, la RMN de ^1H indica que el conjugado existe exclusivamente en formas de anillo abierto (relación de E/Z de 4:1 a 20 °C) en solución (D_2O). El protón de imina aparece a 7,40 ppm (N=CH, d, J = 6,8 Hz) para el isómero E y el protón correspondiente en el isómero Z está a 6,78 (d, J = 6,0 Hz). Esta conjugación simple puede facilitar las evaluaciones de GMP posteriores para la producción de rutina de trazadores de PET. Por el contrario, la conjugación de 2-FDG con péptidos/proteínas generó varios productos isoméricos adicionales (por ejemplo, de anillo cerrado, de anillo abierto). Así pues, la presente invención permite la provisión de un producto más homogéneo.

60 Un estudio de estabilidad confirmó que el conjugado **4a** es estable en solución salina tamponada con fosfato (PBS) al menos durante 8 horas a 37 °C, siendo lo suficientemente estable para aplicaciones de PET.

65 La concentración de sustrato influye en la eficacia de la conjugación de **4a** y **1b**. A pH 4,6, se observó la formación cuantitativa de **4a** en 3-7 minutos a 25 °C, cuando se hizo reaccionar una concentración relativamente alta de **3a** (20-50 mM) con un equivalente de **1b** (véase la Tabla 1, la entrada es 1 y 2). Cuando se aplicó una concentración

relativamente baja de **3a** (1 mM) y **1b** (1 mM), se requirieron 110 minutos para que la reacción se completara (entrada 3) en condiciones por lo demás idénticas. Sin embargo, los datos muestran que la conjugación entre **3a** y **1b** se puede lograr en un intervalo de pH relativamente amplio (2,6-6,0) del medio de reacción y en un tiempo de reacción razonable (< 30 minutos), siendo el pH óptimo de 4,6 (Tabla 1, entrada 2). La viabilidad de la conjugación con FDR a pH 4-7 a 25 °C representa una clara ventaja frente a la conjugación con FDG, que requiere valores de pH tan bajos como pH 1-2 y una temperatura de hasta 130 °C.

Tabla 1. Efecto de la concentración de sustrato (**3a** y **1b**) y el pH del medio en la eficacia conjugación a 25 °C.

Entrada	3a (mM)	1b (mM)	pH (tampón, M)	Tiempo para la conversión completa en el producto 4a (minutos)
1	50	50	4,6 (acetato de sodio, 0,25)	3
2	20	20	2,6 (ácido cítrico-Na ₂ HPO ₄ , 0,25)	30
			3,6 (ácido cítrico-Na ₂ HPO ₄ , 0,25)	15
			4,6 (acetato de sodio, 0,25)	7
			4,6 (acetato de sodio, 0,50)	7
			6,0 (fosfato de potasio, 0,25)	30
			7,0 (fosfato de potasio, 0,25)	100
3	1	1	4,6 (acetato de sodio, 0,25)	110

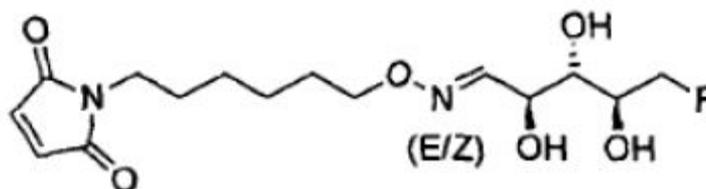
10 Para confirmar la hipótesis de que la fluoración en la posición 5 del FDR **1b** tiene la capacidad particular de mejorar la velocidad de conjugación, se llevó a cabo la conjugación con **3a** con otros azúcares. En las mismas condiciones de reacción 5-FDR **1b** reaccionó significativamente más rápido que la correspondiente D-ribosa no fluorada (Entrada 1 y 2), y mucho más rápidamente que la D-glucosa (entrada 3). La conjugación de **3a** con 2-FDG (**1b**) fue bastante lenta, siendo la conversión del 48 % durante 18 horas de reacción, condiciones que no se pueden usar para experimentos de marcaje en caliente debido a esta baja eficacia.

15

Tabla 2. Conjugación entre **3a** (20 mM) y azúcares (20 mM) a pH 4,6 a 25 °C (6-FDG = 6-fluoro-6-desoxi-D-glucosa)

Entrada	Azúcar	Tiempo de reacción (min)	Conversión (%)
1	FDR (1b)	7	>98
2	D-ribosa	7 60	17 60
3	D-glucosa	7 60	2 14
4	2-FDG (1a)	7 60 1080	1 7 48
5	6-FDG	60	25

20 Para establecer si la presencia de una secuencia de péptido influye en el producto de conjugación, se preparó el conjugado exento de proteína **7**



Conjugado 7

como se representa en la Fig. 8. Se llevó a cabo la siguiente preparación:

25 Se incubó una solución de enlazador **2** (12,4 mg, 50,0 μmol) y FDR **1b** (7,6 mg, 50,0 μmol) en tampón de acetato de sodio (1 ml, pH = 4,6, 0,25 M) en un tubo Eppendorf durante 7 minutos a 25 °C. El análisis por HPLC indicó que se había alcanzado una conversión completa. Se hizo pasar la mezcla de reacción obtenida por una columna RP C18 (Alltech, High Capacity C18). Se lavó la columna con agua (5 ml, que contenía ácido fórmico al 0,1 %). Se eluyó el Compuesto **7** de la columna con un tampón (CH₃CN al 10 %, ácido fórmico al 0,1 %). Se combinaron las fracciones que contenían **7** y se liofilizaron durante la noche, proporcionando el producto en forma de un semisólido. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,44 (d, J = 6,8 Hz, 0,8H, N=CH, isómero E), 6,78 (d, J = 6,0 Hz, 0,2H, N=CH, isómero Z), 6,72 (s, 2H, maleimida), 4,93 (dd, J = 6,0 Hz, 3,0 Hz, 0,2H, N=CHCH, isómero

30

Z), 4,58 (d, J = 3,1 Hz, 1H) , 4,46 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 4,36 (dd, J = 6,8 Hz, 4,1 Hz, 0,8H, N=CHCH, isómero E), 3,98 (t, J = 6,6 Hz, 2H, CH₂ON), 3,76, (m, 1H), 3,73 (m, 1H), 3,39 (t, J = 7,0 Hz, 2H, NCH₂), 1,55 (m, 4H), 1,20 (m, 4H). RMN de ¹⁹F (376 MHz, D₂O) δ -234,70 (dt, J = 47,4 Hz, 24,4 Hz), -235,38 (dt, J = 47,5 Hz, 25,5 Hz).

- 5 El análisis de RMN indicó una proporción del isómero E con respecto al Z similar a **4a**. Por lo tanto, dicho experimento muestra que la conjugación eficaz de compuesto aminooxi **3a** con el Compuesto **1b** no era atribuible al compuesto que contiene aminooxi específico usado.

Preparación de conjugados que contienen ¹⁸F

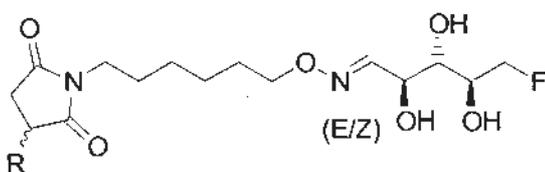
- 10 Se puede usar una metodología análoga a la descrita anteriormente en relación con la síntesis de conjugados que contienen 5-¹⁹flúor para preparar los conjugados que contienen 3-¹⁹F y ¹⁸F de la invención. Por ejemplo, se puede producir FDR fría de la manera habitual de acuerdo con un método enzimático ((véase Onega *et al.* (*infra*) y las referencias citadas en el mismo, el documento WO 03/020945 y el documento WO 2004/078914 A2), como se
- 15 representa esquemáticamente en la Fig. 9. Por otra parte, el experto en la materia es perfectamente capaz de fabricar otras desoxipentosas que contienen ¹⁸F por síntesis química.

- En la Fig. 10, se representa un ejemplo del marcaje con ¹⁸F de glutatión con una Affibody. Como el experto apreciará, la química implicada es completamente análoga a la descrita anteriormente en relación con la preparación
- 20 de los conjugados fríos.

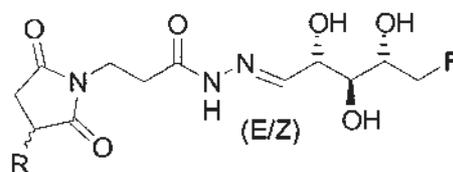
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de una molécula biológicamente activa y una 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosa o una 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosa, en el que la molécula biológicamente activa se selecciona del grupo que consiste en proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, oligosacáridos y polisacáridos; y la 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosa o 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosa es opcionalmente una 5-¹⁸F-fluoro-2,5-didesoxi-pentosa, 3-¹⁸F-fluoro-2,3-didesoxi-pentosa, 5-¹⁸F-fluoro-2,3,5-tridesoxi-pentosa o 3-¹⁸F-fluoro-2,3,5-tridesoxi-pentosa, en donde las posiciones 2 de cada una de entre la 5-¹⁸F-fluoro-2,5-didesoxi-pentosa, 3-¹⁸F-fluoro-2,3-didesoxi-pentosa, 5-¹⁸F-fluoro-2,3,5-tridesoxi-pentosa y 3-¹⁸F-fluoro-2,3,5-tridesoxi-pentosa, la posición 3 de las 5-¹⁸F-fluoro-2,3,5-tridesoxi-pentosas y la posición 5 de las 3-¹⁸F-fluoro-2,3,5-tridesoxi-pentosas tienen un sustituyente seleccionado, independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo, alquenilo, alquinilo, amino, dialquilamino y alcoxi.
2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosa o la 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosa es una aldodesoxipentosa y/o es una 2-desoxipentosa.
3. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosa o la 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosa es una desoxi-D-ribosa.
4. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula biológicamente activa está conjugada a la desoxipentosa a través de un resto enlazador.
5. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula biológicamente activa está conjugada a la desoxipentosa a través de un enlace de oxima, hidrazona o tiosemicarbazona, opcionalmente, en donde la molécula biológicamente activa está conjugada con la desoxipentosa a través de un enlace de oxima, por ejemplo, que tiene una de las siguientes estructuras:

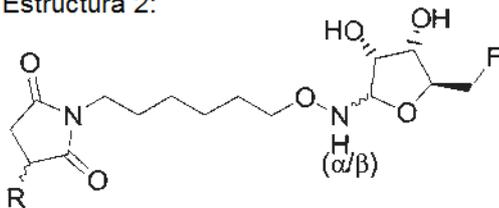
Estructura 1:



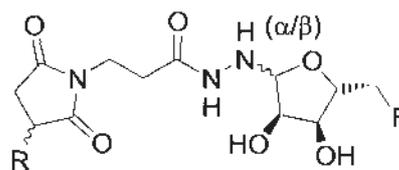
Estructura 3:



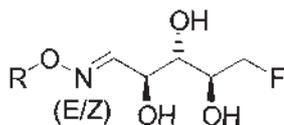
Estructura 2:



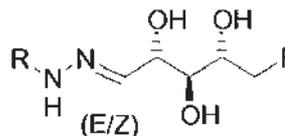
Estructura 4:



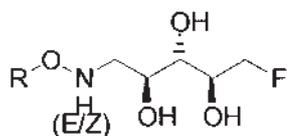
Estructura 11:



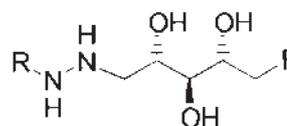
Estructura 14:



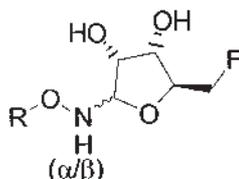
Estructura 12:



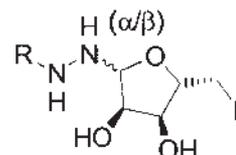
Estructura 15:



Estructura 13:



Estructura 16:



en las que R indica la molécula biológicamente activa.

- 5 6. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula biológicamente activa es una proteína o un péptido.
7. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosa o la 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosa es una 5-desoxi-5-¹⁸F-fluoro-D-ribosa o una 3-desoxi-3-¹⁸F-fluoro-D-ribosa, tal como 5-desoxi-5-¹⁸F-fluoro-D-ribosa o 3-desoxi-3-¹⁸F-fluoro-D-ribosa.
- 10 8. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosa o la 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosa es una 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosa.
- 15 9. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosa o la 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosa es 5-desoxi-5-¹⁸F-fluoro-D-ribosa.
10. Un método de preparación de un conjugado según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende hacer reaccionar una molécula biológicamente activa con una 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosa o una 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosa; y la 5-¹⁸F-fluoro-5-desoxipentosa o la 3-¹⁸F-fluoro-3-desoxipentosa es opcionalmente una 5-¹⁸F-fluoro-2,5-didesoxi-pentosa, 3-¹⁸F-fluoro-2,3-didesoxi-pentosa, 5-¹⁸F-fluoro-2,3,5-tridesoxi-pentosa o 3-¹⁸F-fluoro-2,3,5-tridesoxi-pentosa.
- 20 11. El método de la reivindicación 10, en el que la molécula biológicamente activa que se ha hecho reaccionar se derivatiza con un resto enlazador, opcionalmente, en donde el resto enlazador muestra un resto amino nucleófilo tal como un grupo con funcionalidad amino, aminooxi, hidrazido o tiosemicarbazido, por ejemplo, en el que la molécula biológicamente activa comprende un grupo funcional aminooxi.
- 25 12. Una composición que comprende un conjugado según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 30 13. Un conjugado de una ¹⁸F-desoxipentosa según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método de diagnóstico practicado sobre el cuerpo humano o animal.
- 35 14. Un conjugado de una ¹⁸F-desoxipentosa según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición según lo definido en la reivindicación 12 para su uso en un método de diagnóstico de una enfermedad o afección, en el que el conjugado o la composición se administran a un sujeto, se forman imágenes de la distribución del ¹⁸F en el sujeto y, si está presente en el sujeto, se diagnostica la enfermedad o la afección.
- 40 15. Un conjugado de una ¹⁸F-desoxipentosa según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición según lo definido en la reivindicación 12 para su uso en un método de formación de imágenes en un sujeto, que comprende administrar por administración parenteral, por ejemplo, por inyección, un conjugado o una composición de la invención al sujeto, y la formación de imágenes de la distribución del ¹⁸F en el sujeto, normalmente, usando una PET.

45

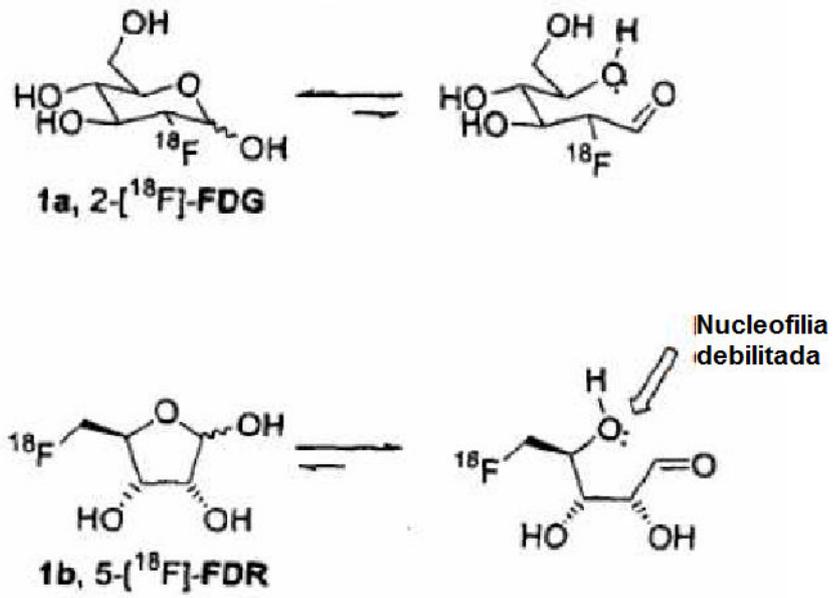


Fig. 1

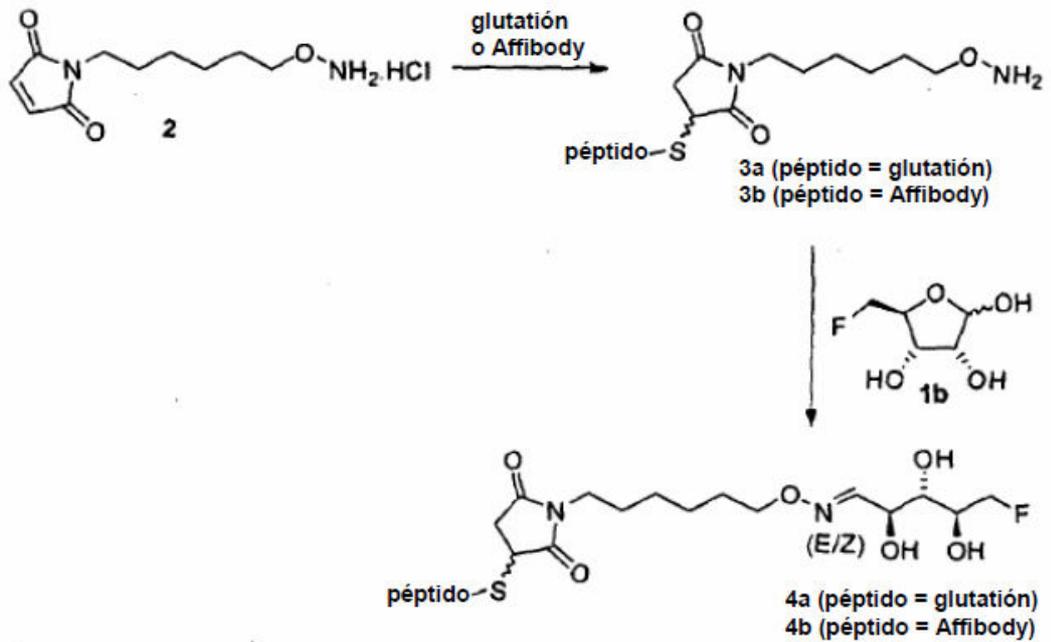


Fig. 2

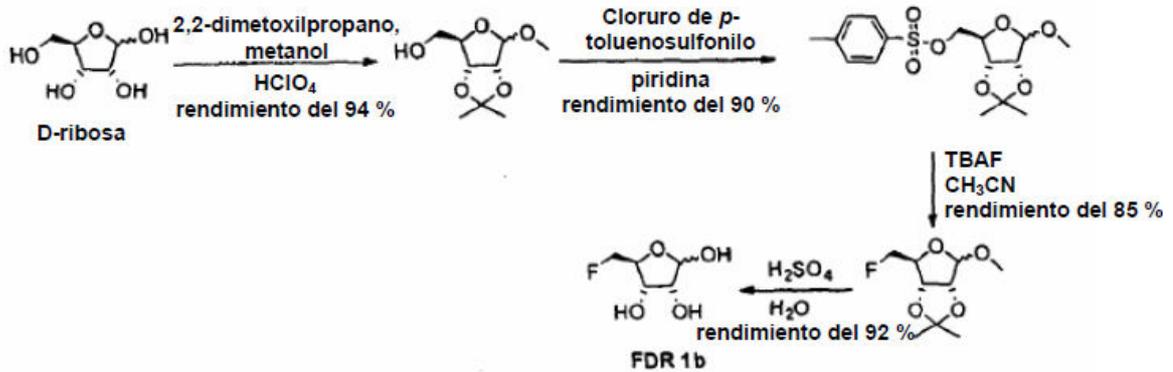


Fig. 3

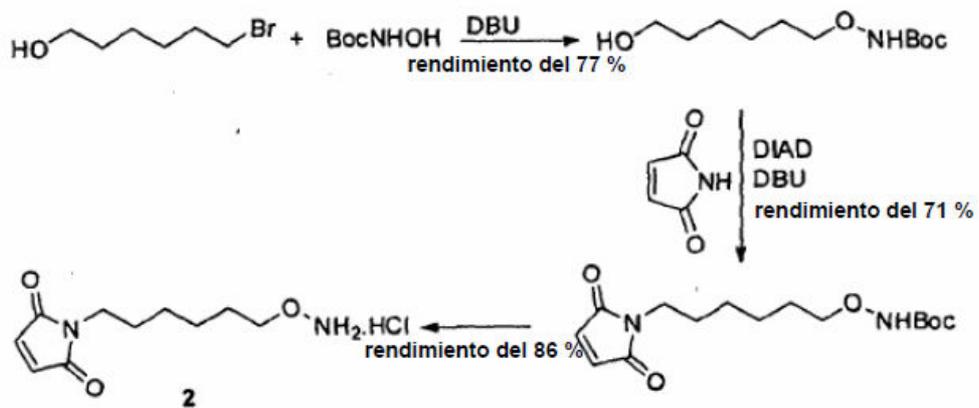


Fig. 4

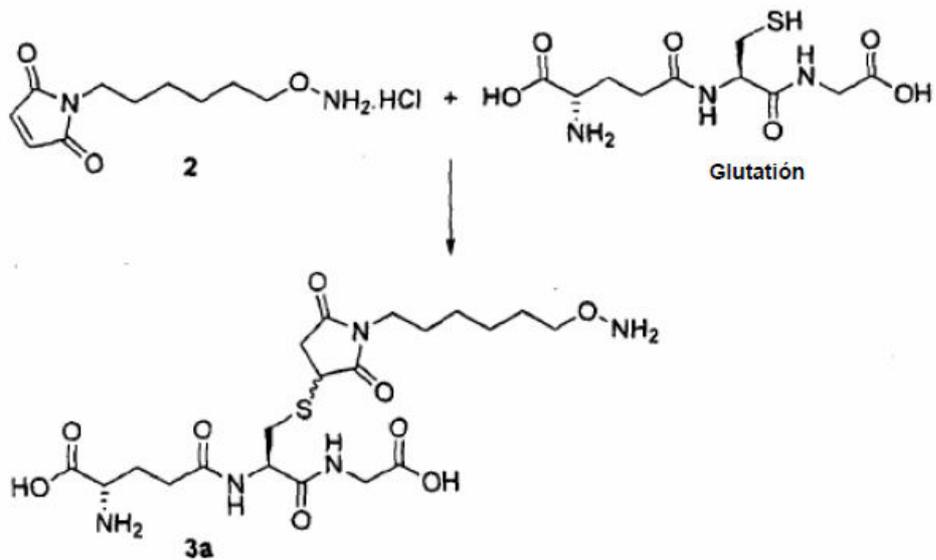


Fig. 5

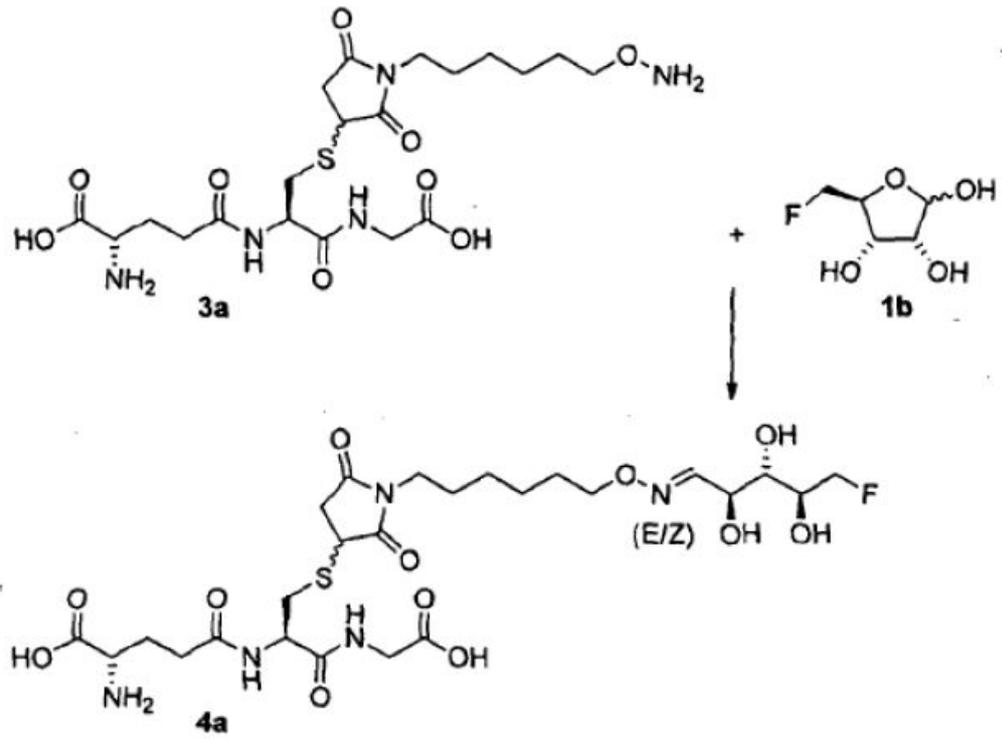


Fig. 6

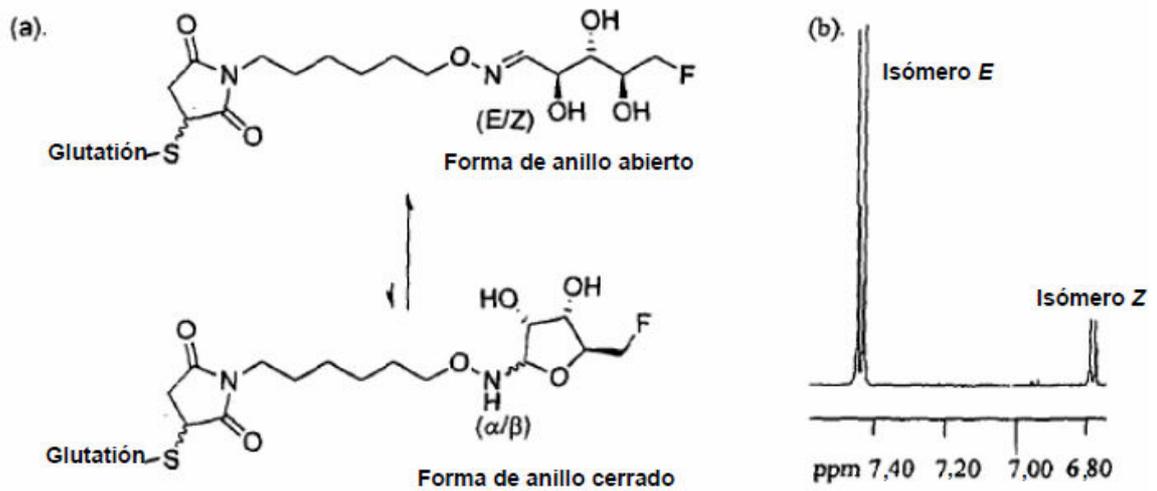


Fig. 7

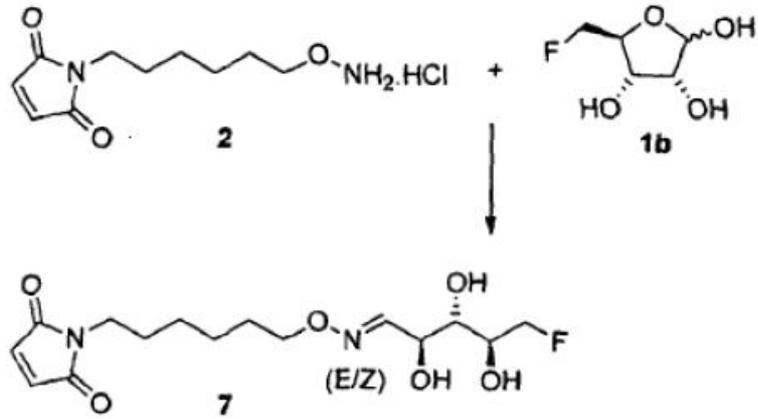


Fig. 8

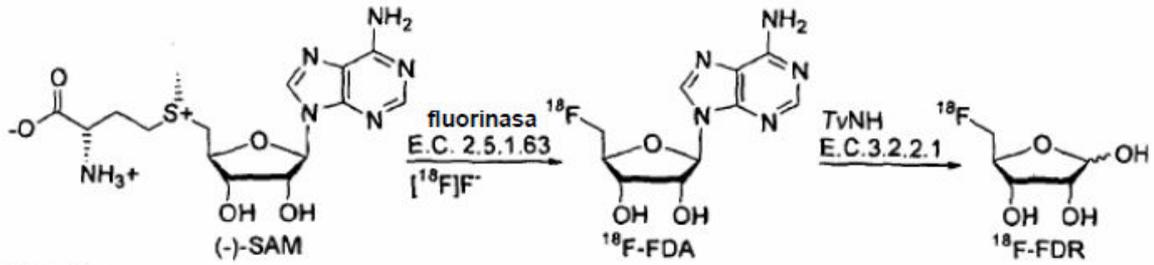


Fig. 9

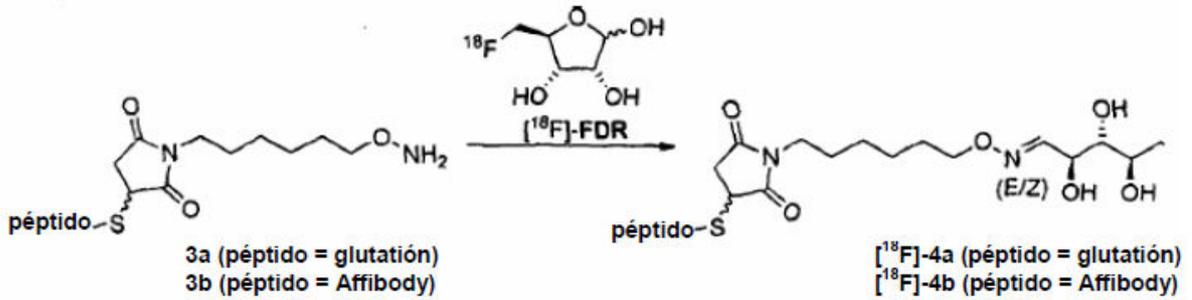


Fig. 10