

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 410**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2011 PCT/EP2011/063890**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12022676**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2011 E 11744007 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2605802**

54 Título: **Composiciones de radiotrazadores peptídicos**

30 Prioridad:

**18.08.2010 GB 201013808**

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

**25.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**IVESON, PETER, BRIAN;  
BHALLA, RAJIV;  
INDREVOLL, BARD y  
GETVOLDSEN, GARETH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 626 410 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

Composiciones de radiotrazadores peptídicos

La presente invención se refiere a composiciones de agentes formadores de imágenes que comprenden péptidos de unión a c-Met radiomarcados adecuados para la formación de imágenes *in vivo* por tomografía por emisión de positrones (PET). Los péptidos de unión a c-Met se marcan con el radioisótopo  $^{18}\text{F}$ . También se describen composiciones farmacéuticas, métodos de preparación de los agentes y las composiciones, más métodos de formación de imágenes *in vivo* utilizando las composiciones, especialmente para su uso en el diagnóstico de cáncer.

#### Antecedentes de la invención.

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor de dispersión (SF), es un factor de crecimiento que está implicado en diversos procesos fisiológicos, tales como cicatrización de heridas y angiogénesis. La alta interacción de afinidad de la interacción del HGF con su receptor (c-Met) está implicada en el crecimiento, invasión y metástasis de tumores.

Knudsen *et al.*, han revisado el papel del HGF y el c-Met en el cáncer de próstata, con posibles implicaciones en la formación de imágenes y en la terapia [*Adv. Cancer Res.*, 91, 31-67 (2004)]. Los anticuerpos anti-met marcados para diagnóstico y terapia están descritos en el documento WO 03/057155.

Se ha demostrado que c-Met está implicado en el crecimiento, invasión y metástasis tumoral en muchos cánceres humanos de origen epitelial. c-Met se expresa en la mayoría de los carcinomas y su elevada expresión con relación al tejido normal se ha detectado en cánceres de: pulmón, mama, colorrectal, de páncreas, cabeza y cuello, gástrico, hepatocelular, de ovarios, renal, glioma, melanoma y una serie de sarcomas. En el carcinoma colorrectal (CRC), se ha detectado una sobreexpresión de c-Met en los focos de criptas aberrantes displásicas, las lesiones pre-neoplásicas más tempranas de la enfermedad. En el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, c-Met se expresa o sobreexpresa según está documentado en aproximadamente el 80% de los tumores primarios. En la metástasis a huesos del cáncer de próstata, está documentado que c-Met se sobreexpresaba en más del 80% de las metástasis óseas.

En condiciones normales, c-Met se expresa en células epiteliales y es activado de manera paracrina, por HGF derivado mesenquimamente. La activación de c-Met en células normales es un episodio transitorio y está muy regulado. En las células tumorales, sin embargo, c-Met puede ser constitutivamente activo. En el cáncer, la estimulación anómala de c-Met puede ser conseguida por la amplificación/sobreexpresión de c-Met, activando las mutaciones de c-Met (por ejemplo, alteraciones estructurales) y la consecución del control del crecimiento autónomo mediante la creación de bucles de señalización autocrina. Además, una sub-regulación defectuosa del receptor c-Met también contribuirá a la expresión anómala de c-Met en la membrana celular. Aunque la sobre-expresión de c-Met es dependiente de HGF (autocrina/paracrina), las alteraciones estructurales causadas por mutaciones son independientes de HGF (por ejemplo, pérdida del dominio extracelular).

El documento WO 2004/078778 describe polipéptidos o construcciones peptídicas multímeras que unen c-Met o un complejo que comprende c-Met y HGF. Se describen aproximadamente 10 clases estructurales diferentes de péptidos. El documento WO 2004/078778 describe que los péptidos se pueden marcar con un marcador detectable para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, o con un fármaco para aplicaciones terapéuticas. El marcador detectable puede ser: una enzima, un compuesto fluorescente, un colorante óptico, un ion metálico paramagnético, un agente de contraste de ultrasonidos o un radionúclido. Se establece que los marcadores preferidos del documento WO 2004/078778 son radiactivos o paramagnéticos, y comprenden más preferiblemente un metal que esté quelado por un quelante metálico. El documento WO 2004/078778 establece que los radionúclidos se pueden seleccionarse de:  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{141}\text{Ce}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{168}\text{Yb}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{103}\text{Ru}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{211}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{214}\text{Bi}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{198}\text{Au}$  y  $^{199}\text{Au}$ . El documento WO 2004/078778 establece (en la página 62) que los radionúclidos preferidos para fines de diagnóstico son:  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y  $^{111}\text{In}$ , siendo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  particularmente preferido.

El documento WO 2008/139207 describe péptidos cíclicos de unión a c-Met de 17 a 30 aminoácidos que están marcados con un resto óptico formador de imágenes informador adecuado para la formación de imágenes del cuerpo de un mamífero *in vivo* usando luz de la longitud de onda del verde al infrarrojo cercano de 600-1200 nm. Los péptidos de unión a c-Met comprenden la secuencia de aminoácidos:



en donde  $\text{X}^1$  es Asn, His o Tyr;

$\text{X}^2$  es Gly, Ser, Thr o Asn;

$\text{X}^3$  es Thr o Arg;

$\text{X}^4$  es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

$\text{X}^5$  es Ser o Thr;

X<sup>6</sup> es Asp o Glu;

y Cys<sup>a-d</sup> son cada uno residuos de cisteína, de tal modo que los residuos a y b, así como c y d, están ciclizados formando dos enlaces disulfuro separados. El informador óptico del documento WO 2008/139207 es preferiblemente un colorante de cianina.

- 5 El documento WO 2009/016180 describe péptidos cíclicos de unión a c-Met análogos a los del documento WO 2008/139207, en el que el informador óptico es un colorante de benzopirilio. Se establece que los agentes de los documentos WO 2008/139207 y WO 2009/016180 son útiles para aplicaciones ópticas *in vitro* e *in vivo*, especialmente imágenes ópticas *in vivo* del cuerpo humano. Una aplicación preferida es la imagen óptica del cáncer colorrectal.

La presente invención.

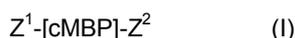
- 10 La presente invención se refiere a composiciones de agentes formadores de imágenes que comprenden péptidos de unión a c-Met (c-MBP, del inglés *c-Met Binding Peptide*) radiomarcados con <sup>18</sup>F adecuados para formación de imágenes *in vivo* por tomografía por emisión de positrones (PET). Los péptidos de unión a c-Met se marcan por medio de un residuo de lisina (Lys).

- 15 Las composiciones de agentes formadores de imágenes suprimen preferiblemente el nivel de péptido cíclico de unión a c-Met no marcado presente. Esto es ventajoso debido a que el cMBP marcado con <sup>18</sup>F es un radiotrazador, presente y administrado a una concentración química extremadamente baja - por tanto, si no se elimina, el cMBP no marcado estaría de otro modo presente en un gran exceso químico. Se ha establecido que esto es importante para las aplicaciones de formación de imágenes *in vivo* por PET, ya que de lo contrario el cMBP no marcado compite eficazmente con el cMBP marcado con <sup>18</sup>F por los sitios de unión a c-Met *in vivo*. Por tanto, tiene un efecto perjudicial sobre la absorción y por consiguiente sobre la relación señal/fondo *in vivo*. Este problema no se planteó en la técnica anterior, puesto que, por ejemplo, cuando los péptidos de unión a c-Met están marcados con colorantes ópticos informadores, las cantidades químicas de péptido marcado implicadas son sustancialmente mayores que para la PET, y por lo tanto no surge el problema de la competición.

- 25 Las composiciones de agentes formadores de imágenes de la presente invención también superan un problema previamente no reconocido en el que los péptidos cMBP radiomarcados presentan problemas de adhesión a diversos materiales, incluyendo filtros. Se proporcionan composiciones solubilizadas, lo que significa que se pueden preparar radiotrazadores de cMBP marcados con <sup>18</sup>F y ser sometidos a filtración estéril sin pérdida significativa del radiotrazador debido a su adsorción por el filtro.

Descripción detallada de la invención.

- 30 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un agente formador de imágenes que comprende un péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con <sup>18</sup>F, en el que dicho péptido cíclico unido a c-Met es un péptido cíclico de 18 a 30 meros de Fórmula I:



en donde:

- 35 cMBP tiene la Fórmula II:



en donde Q es la secuencia de aminoácidos (SEQ-1):



en donde X<sup>1</sup> es Asn, His o Tyr;

- 40 X<sup>2</sup> es Gly, Ser, Thr o Asn;

X<sup>3</sup> es Thr o Arg;

X<sup>4</sup> es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X<sup>5</sup> es Ser o Thr;

X<sup>6</sup> es Asp o Glu;

- 45 y Cys<sup>a-d</sup> son cada uno residuos de cisteína, de tal modo que los residuos a y b, así como c y d están ciclizados para formar dos enlaces disulfuro separados;

A y A' son independientemente cualquier aminoácido distinto de Cys, con la condición de que al menos uno de A y A' esté presente y sea Lys;

x e y son independientemente números enteros de valor 0 a 13, y se eligen de tal manera que  $[x + y] = 1$  a 13;

$Z^1$  está unido al extremo N de cMBP y es H o  $M^{IG}$ ;

$Z^2$  está unido al extremo C de cMBP y es OH,  $OB^c$  o  $M^{IG}$ ,

donde  $B^c$  es un catión biocompatible;

5 cada  $M^{IG}$  es independientemente un grupo inhibidor del metabolismo que es un grupo biocompatible que inhibe o suprime *in vivo* el metabolismo del péptido cMBP;

en donde cMBP está marcado en el residuo de Lys de los grupos A o A' con  $^{18}F$ .

10 Por la expresión "agente formador de imágenes" se entiende un compuesto adecuado para la formación de imágenes del cuerpo de un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un cuerpo de mamífero intacto *in vivo*, y más preferiblemente es un sujeto humano. Preferiblemente, el agente formador de imágenes se puede administrar al cuerpo del mamífero de una manera mínimamente invasiva, es decir, sin riesgo sustancial para la salud del sujeto mamífero cuando es realizada por un experto médico profesional. Dicha administración mínimamente invasiva es preferiblemente la administración intravenosa en una vena periférica de dicho sujeto, sin necesidad de anestesia local ni general.

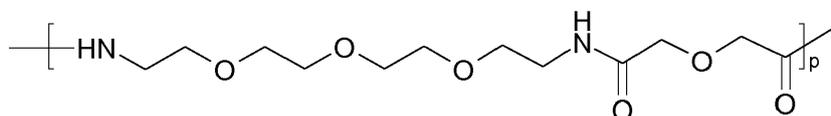
15 La expresión "formación de imágenes *in vivo*", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a las técnicas que producen imágenes no invasivas de todo o parte de un aspecto interno de un sujeto mamífero.

20 Por la expresión "péptido cíclico de unión a c-Met" se entiende un péptido que se une al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, también conocido como c-Met (o simplemente MET). Dichos péptidos adecuados de la presente invención son péptidos cíclicos de 18 a 30 aminoácidos de Fórmula I. Dichos péptidos tienen una  $K_D$  aparente para c-Met menor que 20 nM. La secuencia de cMBP de dichos péptidos comprende residuos de prolina, y se sabe que dichos residuos pueden presentar isomerización *cis/trans* del enlace amida de la cadena principal. Los péptidos cMBP de la presente invención incluyen cualquiera de dichos isómeros.

25 El grupo  $Z^1$  sustituye al grupo amino del último residuo de aminoácidos del cMBP, es decir, el extremo amino. Así, cuando  $Z^1$  es H, el extremo amino del cMBP termina en un grupo  $NH_2$  libre del último residuo de aminoácidos. El grupo  $Z^2$  sustituye al grupo carbonilo del último resto de aminoácidos del cMBP, es decir el extremo carboxi. Así, cuando  $Z^2$  es OH, el extremo carboxi del cMBP termina en el grupo  $CO_2H$  libre del último residuo de aminoácidos, y cuando  $Z^2$  es  $OB^c$  dicho grupo carboxi terminal está ionizado como un grupo  $CO_2B^c$ .

30 Por la expresión "catión biocompatible" ( $B^c$ ) se entiende un contraión cargado positivamente que forma una sal con un grupo ionizado, cargado negativamente, donde dicho contraión cargado positivamente es también no tóxico y por tanto adecuado para su administración al cuerpo de un mamífero, especialmente al cuerpo humano. Ejemplos de cationes biocompatibles adecuados incluyen: los metales alcalinos, sodio o potasio; los metales alcalinotérreos, calcio y magnesio; y el ion amonio. Los cationes biocompatibles preferidos son sodio y potasio, más preferiblemente sodio.

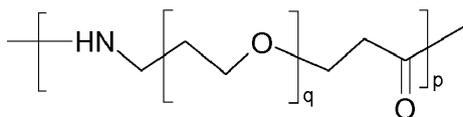
35 El "grupo inhibidor del metabolismo" ( $M^{IG}$ ) de la invención es un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido cMBP en el extremo amino ( $Z^1$ ) o el extremo carboxi ( $Z^2$ ) elegido, para el extremo amino del péptido, de: grupos *N*-acilados,  $-NH(C=O)R^G$ , donde en el grupo acilo  $-(C=O)R^G$  el  $R^G$  se elige de: grupos alquilo de  $C_{1-6}$  o arilo de  $C_{3-10}$  o comprende un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG). Para el extremo carboxi del péptido se elige de: carboxamida, éster *terc*-butílico, éster bencílico, éster ciclohexílico, aminoalcohol o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG). Los grupos PEG preferidos son los biomodificadores de Fórmula IA o IB:



(IA)

40 ácido 17- amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de Fórmula IA

en donde p es un número entero de 1 a 10. Alternativamente, se puede usar una estructura similar a PEG basada en un derivado de ácido propiónico de Fórmula IB:



(IB)

donde p es como se ha definido para la Fórmula IA y q es un número entero de 3 a 15.

En la Fórmula IB, p es preferiblemente 1 ó 2 y q es preferiblemente de 5 a 12.

- 5 Dichos grupos M<sup>G</sup> en el extremo amino preferidos son acetilo, benciloxicarbonilo o trifluoroacetilo, más preferiblemente acetilo.

Por la expresión "radiomarcado con <sup>18</sup>F" se entiende que el péptido cíclico de unión a c-Met tiene conjugado covalentemente el radioisótopo <sup>18</sup>F. El <sup>18</sup>F está unido adecuadamente por medio de un enlace de fluoroalquilo o fluoroarilo C-F, puesto que dichos enlaces son relativamente estables *in vivo*, y por tanto confieren resistencia a la escisión metabólica del radiomarcador <sup>18</sup>F del péptido cMBP. El <sup>18</sup>F está unido preferiblemente por medio de un enlace de fluoroarilo C - F. El <sup>18</sup>F puede estar unido directamente a uno de los aminoácidos del cMBP, pero preferiblemente está conjugado como parte de un sustituyente radiofluorado en el cMBP. Dichos sustituyentes tienen preferiblemente la fórmula:



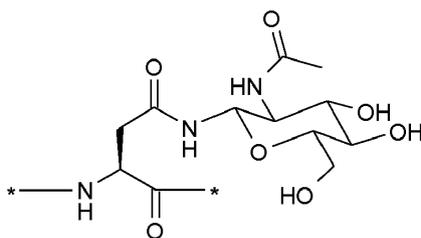
donde:

- 15 L es un grupo enlazador sintético de fórmula -(A)<sub>m</sub>-, en donde cada A es independientemente -CR<sub>2</sub>-, -CR=CR-, -C≡C-, -CR<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-, -CO<sub>2</sub>CR<sub>2</sub>-, -NR(C=O)-, -(C=O)NR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO<sub>2</sub>NR-, -NRSO<sub>2</sub>-, -CR<sub>2</sub>OCR<sub>2</sub>-, -CR<sub>2</sub>SCR<sub>2</sub>-, -CR<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>CR<sub>2</sub>-, -CR<sub>2</sub>-O-N=, -CR<sub>2</sub>-O-NR-, -CR<sub>2</sub>-O-NH(CO)-, un grupo cicloheteroalquileo de C<sub>4-8</sub>, un grupo cicloalquileo de C<sub>4-8</sub>, un grupo arileno de C<sub>5-12</sub> o un grupo heteroarileno de C<sub>3-12</sub>, un aminoácido, un azúcar o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG) monodisperso;
- 20 cada R se elige independientemente entre H, alquilo de C<sub>1-4</sub>, alqueno de C<sub>2-4</sub>, alquino de C<sub>2-4</sub>, alcoxilquilo de C<sub>1-4</sub> o hidroxialquilo de C<sub>1-4</sub>;
- m es un número entero de valor 1 a 20;
- n es un entero de valor 0 ó 1.

25 Por el término "aminoácido" se entiende un L- o D-aminoácido, un análogo de aminoácido (por ejemplo, naftilalanina) o un compuesto mimético de aminoácido que puede ser de origen natural o exclusivamente sintético, y puede ser ópticamente puro, es decir, un único enantiómero, y por tanto quiral, o una mezcla de enantiómeros. En la presente memoria se usan para los aminoácidos las abreviaturas convencionales de 3 letras o de una sola letra. Preferiblemente, los aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros. Por la expresión "compuestos miméticos de aminoácidos" se entienden análogos sintéticos de aminoácidos naturales que son isómeros, es decir, han sido diseñados para imitar la estructura estérica y electrónica del compuesto natural. Dichos isómeros son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen depsipéptidos, péptidos retro-inversos, tioamidas, cicloalcanos o tetrazoles disustituídos en 1,5 [véase M. Goodman, *Biopolymers*, 24, 137, (1985)].

35 Por el término "péptido" se entiende un compuesto que comprende dos o más aminoácidos, como se ha definido anteriormente, unidos por un enlace peptídico (es decir, un enlace amida que une la amina de un aminoácido con el carboxilo de otro).

40 Por el término "azúcar" se entiende un mono-, di- o tri-sacárido. Los azúcares adecuados incluyen: glucosa, galactosa, maltosa, manosa y lactosa. Opcionalmente, el azúcar puede estar funcionalizado para permitir el acoplamiento fácil a los aminoácidos. Así, por ejemplo, un derivado de glucosamina de un aminoácido puede conjugarse con otros aminoácidos por medio de enlaces peptídicos. El derivado de glucosamina de asparagina (comercialmente disponible de NovaBiochem) es un ejemplo de esto:

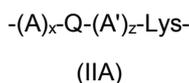


5 Cuando A y A' son "cualquier aminoácido distinto de Cys" se entiende que el aminoácido adicional de los grupos A y A' carece de grupos tiol libres, en particular residuos de Cys. Esto se debe a que un residuo de Cys adicional tendría el riesgo de perturbar los puentes disulfuro con los puentes disulfuro Cys<sup>a</sup>-Cys<sup>b</sup> y Cys<sup>c</sup>-Cys<sup>d</sup> de la secuencia Q, con la consecuente pérdida o reducción de la afinidad de unión a c-Met.

Características preferidas.

10 Los péptidos cMBP preferidos de la presente invención tienen una K<sub>D</sub> para la unión de c-Met al complejo c-Met/HGF inferior a aproximadamente 10 nM (basado en mediciones del ensayo por polarización de fluorescencia), más preferiblemente en el intervalo de 1 a 5 nM, siendo el ideal inferior a 3 nM.

El péptido cMBP de Fórmulas I y II tiene preferiblemente la Fórmula IIA:



donde A es como se ha definido para la Fórmula II,

15 z es un número entero de valor 0 a 12 y [x + z] = 0 a 12,

y el cMBP comprende sólo un residuo de Lys.

Por tanto, en la Fórmula IIA el residuo de Lys solo se localiza específicamente en el extremo C del cMBP. Lo que a su vez significa que el radiomarcador <sup>18</sup>F está situado preferiblemente en la posición del extremo C.

Q comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos SEQ-2 o SEQ-3:

20 Ser-Cys<sup>a</sup>-X<sup>1</sup>-Cys<sup>c</sup>-X<sup>2</sup>-Gly-Pro-Pro-X<sup>3</sup>-Phe-Glu-Cys<sup>d</sup>-Trp-Cys<sup>b</sup>-Tyr-X<sup>4</sup>-X<sup>5</sup>-X<sup>6</sup> (SEQ-2);

Ala-Gly-Ser-Cys<sup>a</sup>-X<sup>1</sup>-Cys<sup>c</sup>-X<sup>2</sup>-Gly-Pro-Pro-X<sup>3</sup>-Phe-Glu-Cys<sup>d</sup>-Trp-Cys<sup>b</sup>-Tyr-X<sup>4</sup>-X<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>-Gly-Thr (SEQ-3).

En SEQ-1, SEQ-2 y SEQ-3, X<sup>3</sup> es preferiblemente Arg. En la Fórmula I y la Fórmula II, los grupos -(A)<sub>x</sub>- o -(A')<sub>z</sub>- comprenden preferiblemente un péptido enlazador que se elige entre:

-Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4),

25 -Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5) o

-Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6).

El péptido cMBP del primer aspecto tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos (SEQ-7):

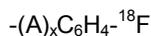
Ala-Gly-Ser-Cys<sup>a</sup>-Tyr-Cys<sup>c</sup>-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys<sup>d</sup>-Trp-Cys<sup>b</sup>-

Tyr-Glu-Thr-Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Lys.

30 Los agentes formadores de imágenes preferidos de la presente invención tienen ambos extremos del péptido cMBP protegidos por grupos M<sup>IG</sup>, es decir, preferiblemente tanto Z<sup>1</sup> como Z<sup>2</sup> son M<sup>IG</sup>, que normalmente serán diferentes. Tener ambos extremos del péptido protegidos de esta manera es importante para aplicaciones de formación de imágenes *in vivo*, puesto que de otro modo se esperaría un rápido metabolismo peptídico con la pérdida consiguiente de la afinidad de unión selectiva para c-Met. Cuando tanto Z<sup>1</sup> como Z<sup>2</sup> son M<sup>IG</sup>, preferiblemente Z<sup>1</sup> es acetilo y Z<sup>2</sup> es una amida primaria. Más preferiblemente, Z<sup>1</sup> es acetilo y Z<sup>2</sup> es una amida primaria y el resto <sup>18</sup>F está unido a la amina en épsilon de la cadena lateral de un residuo de lisina de cMBP.

35 El sustituyente radiofluorado -(L)<sub>n</sub>-<sup>18</sup>F puede estar unido al grupo amino *alfa* del extremo N del péptido de unión a c-Met, o alternativamente a la amina de la cadena lateral de cualquiera de los aminoácidos sustituidos en amino (por ejemplo, residuos de Lys). Preferiblemente, está unido al grupo amino épsilon (ε) del residuo de Lys del cMBP.

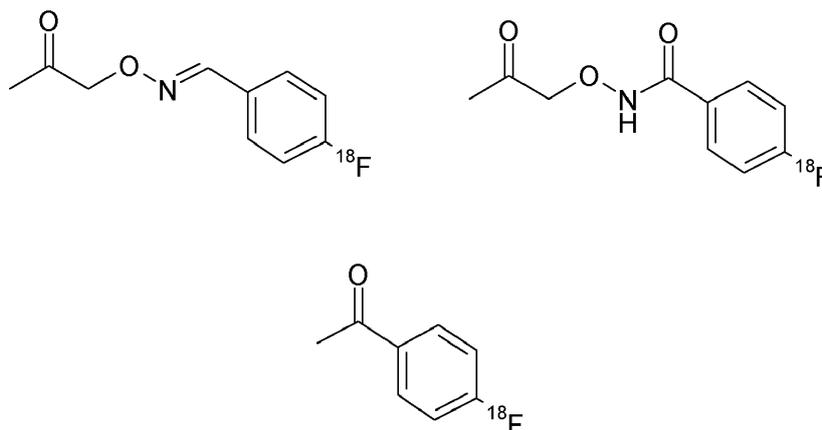
Los sustituyentes radiofluorados preferidos  $-(L)_n-^{18}\text{F}$  tienen  $n = 1$ , es decir, está presente un grupo enlazador sintético como se ha definido anteriormente. Dichos sustituyentes más preferidos comprenden el radiomarcador  $^{18}\text{F}$  unido a un grupo fenilo, es decir, el sustituyente tiene la fórmula:



- 5 donde: A es como se ha definido anteriormente,  
x es un número entero de valor 0 a 5.

Dichos sustituyentes más preferidos provienen de la acilación en N del residuo amino de Lys con un éster activo fluorado, o de la condensación de un derivado aminooxi del residuo amino de Lys con un benzaldehído fluorado, y tienen las fórmulas:

10



15

Los agentes formadores de imágenes del primer aspecto se pueden preparar como se describe en el quinto aspecto (más adelante).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición de un agente formador de imágenes que comprende:

- (i) el péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con  $^{18}\text{F}$  del primer aspecto;
- (ii) un péptido cíclico de unión a c-Met no marcado;

20

donde: dicho péptido cíclico de unión a c-Met tiene la misma secuencia de aminoácidos en (i) y (ii)

y en donde el péptido cMBP no marcado está presente en dicha composición en no más de 50 veces la cantidad molar de dicho péptido cMBP marcado con  $^{18}\text{F}$ .

Las realizaciones preferidas del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con  $^{18}\text{F}$  en el segundo aspecto es como se ha descrito en el primer aspecto (anteriormente).

25

El término "composición" tiene su significado convencional, es decir, una mezcla de los componentes especificados. La composición puede estar en forma sólida o líquida/en solución.

30

Por el término "no marcado" se entiende que el péptido cíclico de unión a c-Met es no radiactivo, es decir no está radiomarcado con  $^{18}\text{F}$ , o cualquier otro radioisótopo. Uno o más de dichos péptidos pueden estar presentes en la composición, y dichos péptidos no marcados incluyen principalmente los precursores no radiactivos del cuarto aspecto (más adelante). El término "no marcado" excluye el péptido cíclico de unión a c-Met marcado con  $^{19}\text{F}$ , donde dicho  $^{19}\text{F}$  está presente en el fluoruro con  $^{18}\text{F}$  usado para radiomarcado dicho péptido cíclico de unión a c-Met y es, por tanto, un producto de la misma reacción de radiomarcado. Como es sabido en la técnica, si dos compuestos sustituidos con flúor difieren solamente en los isótopos del átomo de flúor, se comportarán químicamente de una manera casi idéntica, y por tanto su separación será extremadamente difícil. El péptido o precursor cíclico de unión a c-Met no marcado tiene preferiblemente los grupos  $Z^1$  y/o  $Z^2$  ya incluidos. Los autores de la presente invención han encontrado que, cuando un aldehído marcado con  $^{18}\text{F}$  se usa para ser conjugado con un precursor del péptido cMBP funcionalizado con aminooxi, las impurezas aldehídicas no radiactivas son las principales fuentes de productos secundarios. Una impureza aldehídica importante del  $^{18}\text{F}$ -benzaldehído es DMAP (es decir, (4-dimetilamino)benzaldehído). Por tanto, los productos de conjugación de aldehídos no radiactivos (tales como DMAP) con el péptido cMBP funcionalizado con aminooxi están también dentro del alcance de la expresión "péptido cíclico de unión a c-Met no marcado".

40

Preferiblemente, el péptido cíclico de unión a c-Met no marcado está presente en dicha composición hasta 30, más preferiblemente hasta 20, más preferiblemente menos de 10 veces la cantidad molar del péptido marcado con  $^{18}\text{F}$  correspondiente.

5 La composición del segundo aspecto está preferiblemente en forma de solución, en donde los componentes (i) y (ii) están ambos presentes en solución. Más preferiblemente, la solución es un disolvente biocompatible, o una mezcla de dos o más de dichos disolventes. Los disolventes biocompatibles preferidos se describen en el tercer aspecto (más adelante), y preferiblemente comprenden un disolvente acuoso.

10 Los autores de la presente invención han encontrado que, a concentraciones de radiotrazadores - un intervalo de concentración aproximado de 1 a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  - el péptido cMBP marcado con  $^{18}\text{F}$  de la invención presenta una unión no deseada a una variedad de materiales. Puesto que el radiotrazador está presente a tan baja concentración, incluso una pequeña cantidad química de adsorción puede representar un porcentaje significativo del radioisótopo presente. Esa concentración de radiotrazador debe compararse, por ejemplo, con los péptidos de unión a c-Met marcados con colorante de cianina correspondientes, donde la concentración sería de aproximadamente 2 a 10  $\text{mg}/\text{mL}$ , un factor casi mil veces mayor. En dichos casos, la pérdida de cantidades en  $\mu\text{g}$  de material por adsorción sería un porcentaje insignificante de los péptidos marcados con colorante todavía en solución. Los materiales en los que se ha observado la adherencia del radiotrazador incluyen plásticos, vidrio y sílice. En el caso de los filtros, esto puede significar un alto porcentaje de pérdidas de radiactividad cuando se realiza una filtración estéril.

15 Los autores de la presente invención han encontrado que el fenómeno de adherencia anterior proviene del hecho de que el péptido cMBP precipita en condiciones ácidas (particularmente a temperaturas menores). Por tanto, se prefiere mantener la composición a un pH de 7,5 o superior, más preferiblemente a pH 8,0 o superior con el fin de mantener el péptido de unión a c-Met marcado con  $^{18}\text{F}$  deseado en solución y evitar así la pérdida de material. Como alternativa, o además del uso de pH controlado, se puede incluir un solubilizante.

20 Por el término "solubilizante" se entiende un aditivo presente en la composición que aumenta la solubilidad del agente formador de imágenes en el disolvente. Dicho disolvente preferido es un medio acuoso, y por tanto el solubilizante mejora preferiblemente la solubilidad en agua. Dichos solubilizantes adecuados incluyen: alcoholes de  $\text{C}_{1-4}$ ; glicerina; polietilenglicol (PEG); propilenglicol; monooleato de sorbitán polioxi-etileno; monooleato de sorbitán; polisorbatos; copolímeros de bloques poli(oxi-etileno)poli(oxi-propileno)poli(oxi-etileno) (Pluronic<sup>™</sup>); ciclodextrinas (por ejemplo, ciclodextrina alfa, beta o gamma, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina o hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina) y lecitina.

25 Los solubilizantes preferidos son ciclodextrinas, alcoholes de  $\text{C}_{1-4}$  y Pluronic<sup>™</sup>, más preferiblemente ciclodextrinas y alcoholes de  $\text{C}_{2-4}$ . Cuando el solubilizante es un alcohol, es preferiblemente etanol o propanol, más preferiblemente etanol. El etanol tiene un doble papel potencial, puesto que también puede actuar como radioprotector. Cuando el solubilizante es una ciclodextrina, es preferiblemente una ciclodextrina, más preferiblemente hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HPCD). La concentración de ciclodextrina puede ser de 0,1 a 40  $\text{mg}/\text{mL}$ , preferiblemente entre 5 y 35  $\text{mg}/\text{mL}$ , más preferiblemente de 20 a 30  $\text{mg}/\text{mL}$ , lo más preferiblemente 25  $\text{mg}/\text{mL}$ . Cuando se utiliza un único solubilizante, es preferiblemente etanol o hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, más preferiblemente etanol. Cuando se usa una combinación de solubilizantes, es preferiblemente etanol e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

30 Preferiblemente, la composición del segundo aspecto se mantiene a un pH igual o superior a 7,5, opcionalmente con 5-10% v/v de etanol como solubilizante.

35 La composición de agente formador de imágenes del segundo aspecto comprende además preferiblemente uno o más radioprotectores. Por el término "radioprotector" se entiende un compuesto que inhibe las reacciones de degradación, tales como procesos redox, atrapando radicales libres altamente reactivos, tales como radicales libres que contienen oxígeno que surgen de la radiólisis del agua. Se puede utilizar una combinación de dos o más radioprotectores diferentes. Los radioprotectores de la presente invención se eligen adecuadamente entre: etanol; ácido ascórbico; ácido *para*-aminobenzoico (es decir, ácido 4-aminobenzoico o pABA); ácido gentísico (es decir, ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y, cuando sea aplicable, sales de dichos ácidos con un catión biocompatible como se ha definido anteriormente. El radioprotector de la presente invención comprende preferiblemente ácido *para*-aminobenzoico o *para*-aminobenzoato de sodio.

40 Una composición de agente formador de imágenes más preferida de la presente invención comprende el péptido cMBP de SEQ-7 que tiene unidos  $\text{Z}^1 = \text{Z}^2 = \text{M}^{\text{IG}}$  y una combinación del radioprotector ácido *para*-aminobenzoico y el radioprotector/solubilizante etanol en tampón acuoso. Un péptido preferido de SEQ-7 en dichas composiciones preferidas es el Péptido 1 y un péptido cMBP marcado con  $^{18}\text{F}$  preferido es el Compuesto 3. La concentración radiactiva es preferiblemente inferior a 350  $\text{MBq}/\text{mL}$ , con una concentración de pABA de 2  $\text{mg}/\text{mL}$  y etanol a 5-10% vol/vol, preferiblemente 6,5-7,5% vol/vol.

45 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el agente formador de imágenes del primer aspecto, o la composición de agente formador de imágenes del segundo aspecto, junto con un vehículo biocompatible, en una forma estéril adecuada para la administración a mamíferos.

50 Los aspectos preferidos del agente y la composición formadores de imágenes en el tercer aspecto son como se han definido en los aspectos primero y segundo, respectivamente.

El "vehículo biocompatible" es un fluido, especialmente un líquido, en el que el agente formador de imágenes puede estar en suspensión o preferiblemente disuelto, de manera que la composición sea fisiológicamente tolerable, es decir, se pueda administrar al cuerpo de un mamífero sin toxicidad ni malestar indebidos. El vehículo biocompatible es adecuadamente un vehículo líquido inyectable, tal como agua estéril, exenta de pirógenos, para inyección; una solución acuosa, tal como una solución salina (que se puede equilibrar ventajosamente de modo que el producto final para inyección sea isotónico); una solución tampón acuosa que comprende un agente tamponador biocompatible (por ejemplo, tampón de fosfato); una solución acuosa de una o más sustancias ajustadoras de la tonicidad (por ejemplo, sales de cationes del plasma con contraiones biocompatibles), azúcares (por ejemplo, glucosa o sacarosa), azúcar-alcoholes (por ejemplo, sorbitol o manitol), glicoles (por ejemplo, glicerol) u otros materiales de poliol no iónicos (por ejemplo, poli-etilenglicoles, propilenglicoles). Preferiblemente, el vehículo biocompatible es agua exenta de pirógenos para inyección, solución salina isotónica o tampón de fosfato. Se prefiere el uso de un tampón con el fin de controlar el pH.

Los agentes formadores de imágenes y el vehículo biocompatible se suministran cada uno en viales o envases adecuados que comprenden un recipiente herméticamente cerrado que permite mantener la integridad estéril y/o la seguridad radiactiva, más opcionalmente un gas inerte en el espacio en cabeza (por ejemplo nitrógeno o argón), que permite mientras la adición y retirada de soluciones por jeringa o cánula. Dicho recipiente preferido es un vial sellado con una membrana, en el que el cierre hermético a los gases es ajustado con un precinto (típicamente de aluminio). El cierre es adecuado para punción única o múltiple con una aguja hipodérmica (por ejemplo, un cierre hermético con una membrana ajustada) mientras se mantiene la integridad estéril. Dichos recipientes tienen la ventaja adicional de que el cierre puede soportar el vacío si se desea (por ejemplo, para cambiar el gas del espacio en cabeza o las soluciones de desgasificación) y resistir los cambios de presión, tales como reducciones de la presión sin permitir la entrada de gases atmosféricos externos, tal como oxígeno o vapor de agua.

Los recipientes de dosis múltiples preferidos comprenden un único vial (por ejemplo con un volumen de 10 a 30 cm<sup>3</sup>) que contiene dosis para múltiples pacientes, con lo que se pueden retirar dosis para un solo paciente por jeringas de calidad clínica a diversos intervalos de tiempo durante la vida útil viable de la preparación para adaptarse a la situación clínica. Las jeringas precargadas están diseñadas para que contengan una sola dosis para un ser humano, o "unidosis" y por consiguiente son preferiblemente una jeringa desechable u otra jeringa adecuada para uso clínico. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención tienen preferiblemente una dosificación adecuada para un solo paciente y se proporcionan en una jeringa o recipiente adecuado, como se ha descrito anteriormente.

La composición farmacéutica puede contener otros excipientes adicionales, tales como: un conservante antimicrobiano, un agente ajustador del pH, una carga, un radioprotector, un solubilizante o un agente ajustador de la osmolalidad. Los términos "radioprotector" y "solubilizante" y sus realizaciones preferidas son como se ha descrito en el segundo aspecto (anteriormente). Por la expresión "conservante antimicrobiano" se entiende un agente que inhibe el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos, tales como bacterias, levaduras o mohos. El conservante antimicrobiano también puede presentar algunas propiedades bactericidas, dependiendo de la dosificación empleada. El papel principal del (de los) conservante(s) antimicrobiano(s) de la presente invención es inhibir el crecimiento de cualquier microorganismo en la composición farmacéutica. Sin embargo, el conservante antimicrobiano también se puede usar opcionalmente para inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos en uno o más componentes de los kits utilizados para preparar dicha composición antes de su administración. El(los) conservante(s) antimicrobiano(s) adecuado(s) incluye(n): los parabenos, es decir, metil-, etil-, propil- o butil-parabeno o sus mezclas; alcohol bencílico; fenol; cresol; cetrimida y tiomersal. El (los) conservante(s) antimicrobiano(s) preferido(s) son los parabenos.

La expresión "agente ajustador del pH" significa un compuesto o mezcla de compuestos útiles para asegurar que el pH de la composición está dentro de límites aceptables (pH 4,0 a 10,5) para administración a seres humanos o a mamíferos. Dichos agentes ajustadores del pH adecuados incluyen tampones farmacéuticamente aceptables, tales como tricina, fosfato o TRIS [es decir, *tris*(hidroximetil)aminometano], y bases farmacéuticamente aceptables, tales como carbonato de sodio, bicarbonato de sodio o sus mezclas. Cuando la composición se emplea en forma de kit, el agente ajustador del pH se puede proporcionar opcionalmente en un vial o recipiente separado, de modo que el usuario del kit pueda ajustar el pH como parte de un procedimiento de múltiples etapas.

Por el término "carga" se entiende un agente de carga farmacéuticamente aceptable que puede facilitar la manipulación del material durante su producción y liofilización. Cargas adecuadas incluyen sales inorgánicas, tal como cloruro de sodio, y azúcares solubles en agua o azúcar-alcoholes, tales como sacarosa, maltosa, manitol o trehalosa.

Las composiciones farmacéuticas del tercer aspecto se pueden preparar bajo condiciones de fabricación asépticas (es decir, una sala blanca) para proporcionar el producto no pirógeno estéril deseado. Se prefiere que los componentes clave, especialmente los reactivos asociados más las partes del aparato que van a estar en contacto con el agente formador de imágenes (por ejemplo, los viales) sean estériles. Los componentes y reactivos se pueden esterilizar por métodos conocidos en la técnica, que incluyen: filtración estéril, esterilización terminal usando por ejemplo irradiación gamma, tratamiento en autoclave, calor seco o tratamiento químico (por ejemplo, con óxido de etileno). Se prefiere esterilizar algunos componentes con antelación, de manera que se realice el número mínimo de manipulaciones necesarias. Como precaución, sin embargo, se prefiere incluir como etapa final al menos una etapa de filtración estéril en la preparación de la composición farmacéutica.

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se mantienen preferiblemente a pH 7,5 o superior y/o comprenden un solubilizante, de modo que se pueda usar una etapa de filtración estéril sin pérdida indebida de la radiactividad adsorbida por el material filtrante. Consideraciones similares se aplican a manipulaciones de las composiciones farmacéuticas por jeringas de calidad clínica, o la utilización de tubos de plástico, donde la adsorción puede causar pérdida de radiactividad sin el uso de un solubilizante.

La composición farmacéutica se prepara preferiblemente como se describe en el sexto aspecto (más adelante).

La composición farmacéutica del tercer aspecto se puede preparar opcionalmente a partir de un kit. Dichos kits comprenden el péptido de unión a c-Met de Fórmula I como se ha descrito en el primer aspecto o el precursor del cuarto aspecto en forma apirógena estéril, de tal modo que, por reacción con un suministro estéril del radioisótopo  $^{18}\text{F}$  en un disolvente adecuado, se produzca un radiomarcaje para obtener el péptido de unión al c-Met marcado con  $^{18}\text{F}$  deseado.

Para el kit, el péptido o precursor de unión a c-Met, más otros excipientes opcionales como se ha descrito anteriormente, se proporcionan preferiblemente como un polvo liofilizado en un vial o recipiente adecuado. A continuación se diseña el agente para que sea reconstituido bien directamente con  $^{18}\text{F}$  en un vehículo biocompatible (es decir, como una reconstitución), o se realiza una primera reconstitución del kit con un vehículo biocompatible, seguido por la reacción con un suministro de  $^{18}\text{F}$ .

Una forma estéril preferida del péptido o precursor de unión a c-Met es un sólido liofilizado. La forma sólida estéril se suministra preferiblemente en un recipiente de calidad farmacéutica, como se ha descrito para la composición farmacéutica (anteriormente). Cuando el kit se liofiliza, la formulación puede comprender opcionalmente un crioprotector seleccionado entre un sacárido, preferiblemente manitol, maltosa o tricina.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un precursor, útil en la preparación del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con  $^{18}\text{F}$  del tercer aspecto, o de la composición del primer o segundo aspectos, que comprende:

(i) el péptido cíclico de unión a c-Met de Fórmula I como se ha definido en el primer aspecto, en donde  $Z^1 = Z^2 = M^{\text{G}}$ , o

(ii) un péptido cíclico de unión a c-Met funcionalizado con aminooxi.

Por la expresión "péptido cíclico de unión a c-Met funcionalizado con aminooxi" se entiende el péptido cíclico de unión a c-Met de Fórmula I que tiene conjugado covalentemente un grupo funcional aminooxi. Dichos grupos aminooxi son de fórmula  $-\text{O}-\text{NH}_2$ , preferiblemente  $-\text{CH}_2\text{O}-\text{NH}_2$  y tienen la ventaja de que la amina del grupo aminooxi es más reactiva que un grupo amino de Lys en reacciones de condensación con aldehídos para formar éteres de oxima. Dichos grupos aminooxi se unen adecuadamente al residuo Lys del cMBP, como se describe más adelante.

El precursor es no radiactivo y está diseñado para que se pueda obtener en un alto grado de pureza química. También está diseñado de manera que, por reacción con una fuente adecuada de  $^{18}\text{F}$ , se produzca la reacción eficazmente con una pureza radioquímica satisfactoria (PRQ). La "fuente adecuada de  $^{18}\text{F}$ " depende de la naturaleza del precursor. Cuando el precursor comprende el péptido de unión a c-Met no marcado de Fórmula I, el grupo amino del residuo lisina (Lys) del péptido no marcado está diseñado para que sea el sitio de radiomarcaje. Los extremos del péptido cMBP están protegidos, puesto que  $Z^1 = Z^2 = M^{\text{G}}$ . Dichos péptidos de unión a c-Met y los grupos  $Z^1/Z^2$  preferidos son como se han descrito en el primer aspecto. Así, la fuente adecuada de  $^{18}\text{F}$  está diseñada para que reaccione tan eficazmente como sea posible con el grupo amino de lisina, preferiblemente el grupo amino épsilon de Lys.

Para la preparación de la composición farmacéutica del tercer aspecto, el precursor está preferiblemente en forma estéril, más preferiblemente un sólido liofilizado.

El precursor del cuarto aspecto es preferiblemente un péptido de unión a c-Met funcionalizado con aminooxi.

Los péptidos de unión a c-Met de Fórmula I, es decir,  $Z^1$ -[cMBP]- $Z^2$  de la presente invención se pueden obtener por un método de preparación que comprende:

(i) síntesis de péptidos en fase sólida de un péptido lineal que tenga la misma secuencia peptídica que el péptido cMBP deseado y en el que los residuos  $\text{Cys}^a$  y  $\text{Cys}^b$  estén sin proteger y los residuos  $\text{Cys}^c$  y  $\text{Cys}^d$  tengan grupos protectores tiol;

(ii) tratamiento del péptido de la etapa (i) con una base acuosa en solución para obtener un péptido monocíclico con un primer enlace disulfuro que una  $\text{Cys}^a$  y  $\text{Cys}^b$ ;

(iii) eliminación de los grupos protectores tiol de  $\text{Cys}^c$  y  $\text{Cys}^d$  y ciclización para obtener un segundo enlace disulfuro que una  $\text{Cys}^c$  y  $\text{Cys}^d$ , que es el producto peptídico bicíclico deseado,  $Z^1$ -[cMBP]- $Z^2$ .

Por el término "grupo protector" se entiende un grupo que inhibe o suprime las reacciones químicas indeseables, pero que está diseñado para ser suficientemente reactivo para que se pueda escindir del grupo funcional en cuestión en condiciones suficientemente suaves que no modifiquen el resto de la molécula. Después de la desprotección se obtiene el producto deseado. Los grupos protectores de amina son bien conocidos por los expertos en la técnica y se seleccionan

adecuadamente entre: Boc (donde Boc es *terc*-butiloxycarbonilo), Fmoc (donde Fmoc es fluorenilmetoxycarbonilo), trifluoroacetilo, aliloxycarbonilo, Dde [es decir, 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo] o Npys (es decir, 3-nitro-2-piridina-sulfenilo). Los grupos protectores tiol adecuados son Trt (Tritilo), Acn (acetamidometilo), *t*-Bu (*terc*-butilo), *terc*-butiltio, metoxibencilo, metilbencilo o Npys (3-nitro-2-piridina-sulfenilo). El uso de otros grupos protectores está descrito en '*Protective Groups in Organic Synthesis*', 4<sup>th</sup> Edition, Theodor W. Greene and Peter G. M. Wuts, [Wiley Blackwell, (2006)]. Los grupos protectores de amina preferidos son Boc y Fmoc, más preferiblemente Boc. Los grupos protectores de amina preferidos son Trt y Acn.

Los ejemplos 1 y 2 proporcionan otros detalles específicos. Otros detalles de la síntesis de péptidos en fase sólida están descritos por P. Lloyd-Williams, F. Albericio and E. Girald; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, 1997. Los péptidos cMBP se almacenan mejor en atmósfera inerte y se mantienen en un congelador. Cuando se usan en solución, es mejor evitar un pH por encima de 7 ya que se corre el riesgo de perturbar los puentes disulfuro.

Los péptidos de unión a c-Met funcionalizados con aminooxi se pueden preparar por los métodos de Poethko *et al.*, [*J. Nucl. Med.*, 45, 892-902 (2004)], Schirmacher *et al.*, [*Bioconj. Chem.*, 18, 2085-2089 (2007)], Solbakken *et al.*, [*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 6190-6193 (2006)] o Glaser *et al.*, [*Bioconj. Chem.*, 19, 951-957 (2008)]. El grupo aminooxi se puede conjugar opcionalmente en dos etapas. En primer lugar, se conjuga el ácido aminooxi-carboxílico protegido en N o el éster activado con aminooxi protegido en N con el péptido de unión a c-Met. En segundo lugar, se desprotege el péptido de unión a c-Met funcionalizado con aminooxi protegido en N intermedio para obtener el producto deseado [véanse los documentos de Solbakken y Glaser citados anteriormente]. Los ácidos aminooxi-carboxílicos protegidos en N, tales como Boc-NH-O-CH<sub>2</sub>(C=O)OH están comercialmente disponibles, por ejemplo de Novabiochem.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con <sup>18</sup>F del primer aspecto, que comprende:

(i) la provisión del precursor del cuarto aspecto;

(ii) cuando dicho precursor comprende un péptido cíclico de unión a c-Met no marcado de Fórmula I, en donde Z<sup>1</sup> = Z<sup>2</sup> = M<sup>16</sup>, la reacción bien con un éster activado marcado con <sup>18</sup>F o con un ácido carboxílico marcado con <sup>18</sup>F en presencia de un agente activante, para obtener el péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con <sup>18</sup>F conjugado por medio de un enlace amida en el residuo Lys del cMBP de dicho péptido cíclico;

(iii) cuando dicho precursor comprende un péptido cíclico de unión a c-Met funcionalizado con aminooxi, la reacción bien con:

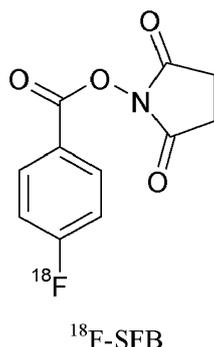
(a) un éster activado marcado con <sup>18</sup>F o un ácido marcado con <sup>18</sup>F en presencia de un agente activante, para obtener el péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con <sup>18</sup>F conjugado por medio de un enlace amida en la posición aminooxi de dicho péptido funcionalizado; o

(b) un aldehído marcado con <sup>18</sup>F para obtener el péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con <sup>18</sup>F conjugado por medio de un enlace éter de oxima en la posición aminooxi de dicho péptido funcionalizado.

Por la expresión "éster activado" o "éster activo" se entiende un derivado éster del ácido carboxílico asociado que está diseñado para que sea un mejor grupo eliminable y por tanto permita una reacción más fácil con nucleófilos, tales como aminas. Ejemplos de ésteres activos adecuados son: *N*-hidroxisuccinimida (NHS); éster sulfo-succinimidílico; pentafluorofenol; pentafluorotiofenol; *para*-nitrofenol; hidroxibenzotriazol y PyBOP (es decir, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio). Los ésteres activos preferidos son *N*-hidroxisuccinimida o ésteres de pentafluorofenol, especialmente ésteres de *N*-hidroxisuccinimida.

Por el término "agente activante" se entiende un reactivo usado para facilitar el acoplamiento entre una amina y un ácido carboxílico para generar una amida. Dichos agentes activantes adecuados son conocidos en la técnica e incluyen carbodiimidas, tal como EDC [*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida] y *N,N*'-dialquilcarbodiimidas, tal como dicitoclohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida; y triazoles, tales como HBTU [hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio], HATU [hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio] y PyBOP [hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio]. Se dan más detalles en "*March's Advanced Organic Chemistry*", 5<sup>th</sup> Edition, pages 508-510, Wiley Interscience (2001). Dicho agente activante preferido es EDC.

Los ésteres activados marcados con <sup>18</sup>F, tal como [<sup>18</sup>F]SFB se pueden preparar por el método de Glaser *et al.*, y las referencias contenidas en dicho documento [*J. Lab. Comp. Radiopharm.*, 52, 327-330 (2009)], o el método automatizado de Marik *et al.*, [*Appl. Rad. Isot.*, 65 (2), 199-203 (2007)]:



5 Los ácidos carboxílicos marcados con  $^{18}\text{F}$  se pueden obtener por el método de Marik *et al.*, citado anteriormente. Los aldehídos alifáticos marcados con  $^{18}\text{F}$  de fórmula  $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_2\text{O}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_q\text{CH}_2\text{CHO}$ , donde q es 3, se pueden obtener por el método de Glaser *et al.*, [*Bioconj. Chem.*, 19(4), 951-957 (2008)]. El  $^{18}\text{F}$ -fluorobenzaldehído se puede obtener por el método de Glaser *et al.*, [*J. Lab. Comp. Radiopharm.*, 52, 327-330 (2009)]. El precursor  $\text{Me}_3\text{N}^+-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CHO}.\text{CF}_3\text{SO}_3^-$  se obtiene por el método de Haka *et al.*, [*J. Lab. Comp. Radiopharm.*, 27, 823-833 (1989)].

10 La conjugación de los aldehídos marcados con  $^{18}\text{F}$  a los péptidos c-Met funcionalizados con aminooxi se realiza preferiblemente en presencia de un catalizador de anilina, como ha sido descrito por Flavell *et al.*, [*J. Am. Chem. Soc.*, 130(28), 9106 - 9112 (2008)]. Aunque es posible utilizar como precursores péptidos c-Met con aminooxi protegido (tal como el Compuesto 1), se prefiere el derivado aminooxi libre (tal como el Compuesto 2). Esto se debe a que toda la síntesis es más susceptible a la automatización, mientras que con el precursor protegido, se requiere típicamente una etapa de desprotección manual.

15 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de la composición del agente formador de imágenes del segundo aspecto, o su composición farmacéutica del tercer aspecto, que comprende:

(i) la preparación del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con  $^{18}\text{F}$  como se ha definido en el método de preparación del quinto aspecto;

(ii) la separación cromatográfica del péptido cíclico de unión a c-Met no marcado del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con  $^{18}\text{F}$ .

20 Los aspectos preferidos de la composición del agente formador de imágenes y de la composición farmacéutica en el sexto aspecto son los descritos en el segundo y tercer aspectos, respectivamente.

25 La separación cromatográfica de la etapa (ii) puede ser realizada por HPLC o SPE (extracción en fase sólida) usando uno o más cartuchos de SPE. Se prefiere la SPE cuando se utiliza un sintetizador automatizado y se prefiere la HPLC en otras circunstancias. El Ejemplo 5 proporciona un método de HPLC adecuado para el Compuesto 3 de la presente invención.

El método del sexto aspecto se usa preferiblemente para obtener la composición farmacéutica del tercer aspecto. Cuando el método se utiliza para preparar la composición farmacéutica del tercer aspecto, el método de preparación se realiza preferiblemente usando un aparato sintetizador automatizado.

30 Por la expresión "sintetizador automatizado" se entiende un módulo automatizado basado en el principio de operaciones unitarias, como ha sido descrito por Satyamurthy *et al.*, [*Clin. Positr. Imag.*, 2(5), 233-253 (1999)]. La expresión "operaciones unitarias" significa que los procesos complejos se reducen a una serie de operaciones o reacciones simples, que se pueden aplicar a una gama de materiales. Dichos sintetizadores automatizados se prefieren para el método de la presente invención especialmente cuando se desea una composición radiofarmacéutica. Están comercialmente disponibles en una gama de proveedores [Satyamurthy *et al.*, anteriormente citado], que incluyen: GE Healthcare; CTI Inc; Ion Beam Applications S.A. (Chemin du Cyclotron 3, B-1348 Louvain-La-Neuve, Bélgica); Raytest (Alemania) y Bioscan (EE.UU.).

40 Los sintetizadores automatizados comerciales también proporcionan recipientes adecuados para los desechos radiactivos líquidos generados como resultado de la preparación radiofarmacéutica. Los sintetizadores automatizados generalmente no están provistos de protección frente a la radiación, puesto que están diseñados para ser empleados en una celda de trabajo radiactivo configurada adecuadamente. La celda de trabajo radiactivo proporciona una protección frente a la radiación adecuada para proteger al operador de la posible dosis de radiación, así como ventilación para eliminar vapores químicos y/o radiactivos. El sintetizador automatizado comprende preferiblemente un casete. Por el término "casete" se entiende una pieza de un aparato diseñada para encajar de forma amovible e intercambiable en un aparato sintetizador automatizado (tal como se define más adelante), de tal modo que el movimiento mecánico de las partes móviles del sintetizador controla el funcionamiento del casete desde el exterior del casete, es decir, externamente. Los

5 cassetes adecuados comprenden una disposición lineal de válvulas, cada una unida a un puerto donde se pueden sujetar reactivos o viales, ya sea por punción con aguja de un vial invertido cerrado herméticamente con una membrana, o por juntas de empalme herméticas a los gases. Cada válvula tiene una unión machihembrada que está conectada con un brazo móvil correspondiente del sintetizador automatizado. La rotación externa del brazo controla así la apertura o el cierre de la válvula cuando el casete está unido al sintetizador automatizado. Las partes móviles adicionales del sintetizador automatizado están diseñadas para sujetarse a las puntas del émbolo de la jeringa y, por tanto, elevar o descender los cilindros de la jeringa.

10 El casete es versátil, teniendo típicamente varias posiciones donde se pueden fijar los reactivos y varias adecuadas para la sujeción de viales de jeringas de reactivos o cartuchos de cromatografía (por ejemplo, SPE). El casete comprende siempre un vaso de reacción. Dichos vasos de reacción tienen preferiblemente un volumen de 1 a 10 cm<sup>3</sup>, lo más preferiblemente de 2 a 5 cm<sup>3</sup> y están configurados de manera que 3 o más puertos del casete estén conectados a él, para permitir la transferencia de reactivos o disolventes desde varios puertos al casete. Preferiblemente, el casete tiene de 15 a 40 válvulas en una disposición lineal, lo más preferiblemente de 20 a 30, siendo especialmente preferido 25. Las válvulas del casete son preferiblemente idénticas, y lo más preferiblemente son válvulas de 3 vías. Los cassetes están diseñados para que sean adecuados para la fabricación de radiofármacos y por tanto fabricados a partir de materiales que son de calidad farmacéutica e idealmente también son resistentes a la radiólisis.

20 Los sintetizadores automatizados preferidos de la presente invención son los que comprenden un casete desechable o de uso único que contiene todos los reactivos, vasos de reacción y aparatos necesarios para realizar la preparación de un lote dado de radiofármacos radiofluorados. El término casete se refiere a que el sintetizador automatizado tiene la flexibilidad de ser capaz de preparar una variedad de diferentes radiofármacos con un riesgo mínimo de contaminación cruzada, simplemente cambiando el casete. El empleo de un casete también tiene las ventajas de: un equipo simplificado y por tanto un riesgo reducido de error del operador; mejor cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación (GMP); capacidad multitrazadora; cambio rápido entre las fases de producción; chequeo de diagnóstico automatizado previo a la operación del casete y los reactivos; chequeo adicional automatizado de los códigos de barras de los reactivos químicos con relación a la síntesis que se ha de realizar; trazabilidad de los reactivos; un único uso y por tanto sin riesgo de contaminación cruzada, alteración y resistencia al mal uso.

Se incluye en este aspecto de la invención, el uso de un aparato sintetizador automatizado para preparar la composición farmacéutica del segundo aspecto.

30 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para la formación de imágenes del cuerpo de un mamífero *in vivo* para obtener imágenes de sitios de sobreexpresión o localización de c-Met, comprendiendo dicho método la formación de imágenes de dicho cuerpo al que se había administrado previamente el agente formador de imágenes del primer aspecto, la composición del agente formador de imágenes del segundo aspecto o la composición farmacéutica del tercer aspecto.

35 Los aspectos preferidos del agente formador de imágenes, la composición del agente formador de imágenes y la composición farmacéutica del séptimo aspecto son los descritos en los aspectos primero, segundo y tercero, respectivamente.

40 Preferiblemente, el mamífero es el cuerpo de un mamífero intacto *in vivo*, y más preferiblemente es un ser humano. El agente formador de imágenes se puede administrar al cuerpo del mamífero de una manera mínimamente invasiva, es decir, sin riesgo sustancial para la salud del sujeto mamífero, incluso cuando lo realiza un experto médico profesional. Dicha administración mínimamente invasiva es preferiblemente una administración intravenosa en una vena periférica de dicho sujeto, sin necesidad de anestesia local ni general.

45 Preferiblemente, se utiliza la composición farmacéutica del tercer aspecto. En el método para la formación de imágenes del séptimo aspecto, el sitio de sobreexpresión o localización de c-Met es preferiblemente un tumor canceroso o metástasis. Se pretende que el agente sirva para uso en la formación de imágenes de la expresión de c-Met tanto en tumores precancerosos como cancerosos o metástasis, permitiendo potencialmente la selección de la terapia. Además, la formación de imágenes repetida con dicho agente formador de imágenes tiene también la posibilidad de monitorizar rápida y eficazmente la respuesta individual de un sujeto a pautas terapéuticas nuevas y establecidas, permitiendo con ello la interrupción de un tratamiento ineficaz. Además, como la sobreexpresión de c-Met es un atributo potencial de los tumores agresivos, se prevé que el agente formador de imágenes c-Met tiene la posibilidad de ser usado en la diferenciación entre los cánceres agresivos y menos agresivos en una etapa temprana de su desarrollo.

Se incluye en este aspecto el agente formador de imágenes para uso en un método de diagnóstico de sitios de sobreexpresión o localización de c-Met dentro del cuerpo de un mamífero *in vivo*, que comprende el método para la formación de imágenes del séptimo aspecto.

55 La invención es ilustrada por los Ejemplos detallados a continuación. El Ejemplo 1 proporciona la síntesis de un péptido cMBP de la invención que tiene grupos inhibidores del metabolismo ( $Z^1 = Z^2 = M^{16}$ ) en ambos extremos (Péptido 1). El Ejemplo 2 proporciona la síntesis de un precursor protegido de la invención (Compuesto 1). El Ejemplo 3 proporciona la síntesis del homólogo fluorado (es decir, <sup>19</sup>F) no radiactivo del péptido c-Met marcado con flúor (Compuesto 3A). El

Ejemplo 4 proporciona la síntesis de un péptido c-Met radiofluorado con  $^{18}\text{F}$  de la invención (Compuesto 3B). El Ejemplo 5 proporciona las condiciones de la HPLC para la separación de péptidos de unión a c-Met marcados y no marcados.

5 El Ejemplo 6 proporciona la biodistribución de un péptido marcado con  $^{18}\text{F}$  de la invención (Compuesto 3B) en un modelo de tumor en un animal. Los resultados muestran la unión al receptor c-Met humano expresado en los tumores HT-29, y por tanto la utilidad para la formación de imágenes de tumores. El Ejemplo 7 demuestra que la absorción por los tumores del Ejemplo 6 es específica, puesto que la absorción puede ser inhibida por la administración conjunta de péptido de unión a c-Met marcado con  $^{19}\text{F}$  no radiactivo (Compuesto 3A). El Ejemplo 8 también demuestra una reducida absorción por el hígado de aproximadamente 40% en primates cuando se administra conjuntamente el péptido de unión a c-Met marcado con  $^{19}\text{F}$ . La administración conjunta de una versión perturbada marcada con  $^{19}\text{F}$  del péptido, que no tiene afinidad por el receptor c-Met, no redujo significativamente la absorción por el hígado. El hígado tiene un alto nivel de expresión de c-Met, y por consiguiente se cree que la reducción de la absorción después de la competencia con cMBP marcado con  $^{19}\text{F}$  representa la prueba de la unión específica a c-Met *in vivo*.

10 El Ejemplo 9 muestra que el solubilizante ciclodextrina no tiene efecto significativo sobre la biodistribución del Compuesto 3B *in vivo*. El Ejemplo 10 compara la síntesis totalmente automatizada del Compuesto 3B (que parte del Compuesto 2), con la síntesis parcialmente automatizada que parte del Compuesto 1. Se prefiere el uso del Compuesto 2 debido a que se obtienen mayores rendimientos y la desprotección del Compuesto 1 tiene las desventajas de:

(i) dificultad para establecer el grado de desprotección antes del radiomarcaje;

(ii) el TFA usado para desproteger el péptido no es compatible con el plástico del aparato sintetizador automatizado.

20 El Ejemplo 11 proporciona la síntesis automatizada del Compuesto 3B, que incluye además el uso automatizado de la purificación del cartucho de la SPE. Los resultados muestran que el Compuesto 3B se puede obtener con alta pureza y rendimiento radioquímico satisfactorio usando este procedimiento. El Ejemplo 12 proporciona la liofilización de un precursor de la invención. El Ejemplo 13 demuestra el efecto del pH sobre un agente formador de imágenes de la invención. El Ejemplo 14 describe imágenes humanas usando un agente formador de imágenes de la invención.

## 25 **Abreviaturas.**

Se usan las abreviaturas convencionales de los aminoácidos de una sola letra o de 3 letras.

% di: porcentaje de dosis inyectada

Ac: Acetilo

Acm: Acetamidometilo

30 ACN: Acetonitrilo

Boc: *tert*-butiloxicarbonilo

DCM: Diclorometano

DIPEA: *N,N*-Diisopropil-etil-amina

DMF: Dimetilformamida

35 DMSO: Dimetilsulfóxido

EDC: *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida

Fmoc: 9-Fluorenilmetoxicarbonilo

HBTU: Hexafluorofosfato de *O*-benzotriazol-1-il-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

40 HSPyU Hexafluorofosfato de *O*-(*N*-succinimidil)-*N,N,N',N'*-tetrametilenuronio

NHS: *N*-Hidroxi-succinimida

NMM: *N*-Metilmorfolina

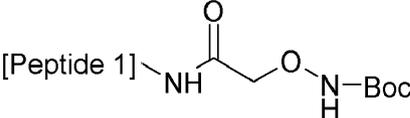
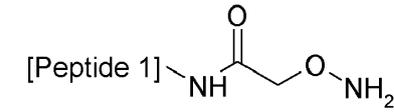
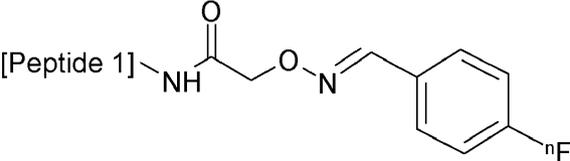
NMP: 1-Metil-2-pirrolidinona

pABA: ácido *para*-aminobenzoico

45 Pbf: 2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo

- PBS: Solución salina tamponada con fosfato  
 p.i.: post-inyección  
 PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio  
*t*Bu: *terc*-butilo  
 5 TFA: Ácido trifluoroacético  
 TIS: Triisopropilsilano  
 Trt: Tritilo.

Compuestos de la invención.

Nombre	Estructura
Péptido 1	Puentes disulfuro en Cys 4-16 y Cys 6-14;  Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH <sub>2</sub>  o Ac - AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK - NH <sub>2</sub>
Compuesto 1	
Compuesto 2	
Compuesto 3	 <p>n = 19 Compuesto 3A;                      n = 18 Compuesto 3B.</p>

donde:

- 10 los Compuestos 1, 2 y 3 están funcionalizados en el grupo amina en épsilon de Lys del extremo carboxi del Péptido 1;  
 Boc = *terc*-butiloxicarbonilo.

**Ejemplo 1: Síntesis del Péptido 1.**

Etapa (a): Síntesis del péptido lineal precursor protegido.

El péptido lineal precursor tiene la estructura:

Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-

5 Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly- Gly-Gly-Lys-NH<sub>2</sub>

La resina de peptidilo H-Ala-Gly-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Cys(Acm)-Ser(tBu)-Gly-Pro-Pro-Arg(Pbf)-Phe-Glu(OtBu)-Cys(Acm)-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$  pro)-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Gly-Gly-Gly-Lys(Boc)-polímero se montó en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433A usando la química Fmoc a partir de 0,1 mmol de la resina Rink Amide Novagel. Se aplicó un exceso de 1 mmol de aminoácidos preactivados (usando HBTU) en las etapas de acoplamiento. Se incorporó a la secuencia pseudoprolina Glu-Thr (Novabiochem 05-20-1122). La resina se transfirió a un aparato de burbujeo de nitrógeno y se trató con una solución de anhídrido acético (1 mmol) y NMM (1 mmol) disuelto en DCM (5 mL) durante 60 minutos. La solución de anhídrido se separó por filtración y la resina se lavó con DCM y se secó bajo una corriente de nitrógeno.

15 La eliminación simultánea de los grupos protectores de las cadenas secundarias y la escisión del péptido de la resina se realizó en TFA (10 mL) que contenía TIS al 2,5%, 4-tiocresol al 2,5% y agua al 2,5% durante 2 horas y 30 min. La resina se separó por filtración, se eliminó a vacío el TFA y se añadió al residuo éter dietílico. El precipitado formado se lavó con éter dietílico y se secó al aire proporcionando 264 mg de péptido en bruto.

20 La purificación por HPLC preparativa (gradiente: B al 20-30% durante 40 minutos, donde A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 10 mL/min, columna: Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 30 min) del péptido en bruto proporcionó 100 mg de precursor lineal del Péptido 1 puro. El producto puro se analizó por HPLC analítica (gradiente: B al 10-40% durante 10 minutos, donde A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 0,3 mL/min, columna: Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 6,54 min). Se realizó otra caracterización del producto usando espectrometría de masas con electropulverización (MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> calculado: 1464,6, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> encontrado: 1465,1).

25 Etapa (b): Formación del puente disulfuro de Cys 4-16 monocíclico.

Cys 4-16; Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH<sub>2</sub>.

30 El precursor lineal de la etapa (a) (100 mg) se disolvió en DMSO al 5%/agua (200 mL) y la solución se ajustó a pH 6 usando amoniaco. La mezcla de reacción se agitó durante 5 días. La solución se ajustó luego a pH 2 usando TFA y la mayor parte del disolvente se separó por evaporación a vacío. El residuo (40 mL) se inyectó en porciones en una columna de HPLC preparativa para la purificación del producto.

35 La purificación por HPLC preparativa (gradiente: B al 0% durante 10 minutos, luego B al 0-40% durante 40 minutos, donde A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 10 mL/min, columna: Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 44 min) del residuo proporcionó 72 mg de precursor monocíclico del Compuesto 1 puro.

40 El producto puro (como una mezcla de los isómeros P1 a P3) se analizó por HPLC analítica (gradiente: B al 10-40% durante 10 minutos, donde A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 0,3 mL/min, columna: Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 5,37 min (P1); 5,61 min (P2); 6,05 min (P3)). Se realizó otra caracterización del producto usando espectrometría de masas con electropulverización (MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> calculado: 1463,6, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> encontrado: 1464,1 (P1); 1464,4 (P2); 1464,3 (P3)).

Etapa (c): Formación del segundo puente disulfuro Cys 6-14 (Péptido 1).

45 El precursor monocíclico de la etapa (b) (72 mg) se disolvió en AcOH al 75%/agua (72 mL) bajo un manto de nitrógeno. Se añadieron HCl 1 M (7,2 mL) e I<sub>2</sub> 0,05 M en AcOH (4,8 mL) en ese orden y la mezcla se agitó durante 45 minutos. Se añadió ácido ascórbico 1 M (1 mL) obteniéndose una mezcla incolora. La mayoría de los disolventes se evaporaron a vacío y el residuo (18 mL) se diluyó con agua/TFA al 0,1% (4 mL) y el producto se purificó usando HPLC preparativa.

50 La purificación por HPLC preparativa (gradiente: B al 0% durante 10 minutos, luego B al 20-30% durante 40 minutos, donde A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 10 mL/min, columna: Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 43-53 min) del residuo dio 52 mg del Péptido 1 puro. El producto puro se analizó por HPLC analítica (gradiente: B al 10-40% durante 10 minutos, donde A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = ACN/TFA al 0,1%, caudal: 0,3 mL/min, columna: Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 6,54 min). Se realizó otra caracterización del producto usando espectrometría de masas con electropulverización (MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> calculado: 1391,5, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> encontrado: 1392,5).

**Ejemplo 2: Síntesis del Compuesto 1.**

5 Se disolvieron ácido (Boc-aminooxi)acético (Sigma-Aldrich, 138 mg, 0,72 mmol), EDC (138 mg, 0,72 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (83 mg, 0,72 mmol) en DMF (1 mL). La solución se agitó durante 25 minutos y a continuación se añadió a una solución del Péptido 1 (1,0 g, 0,36 mmol) en DMF (5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 2 minutos. Se añadió entonces sim-colidina (239  $\mu$ L, 1,80 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua (5 mL) y el producto se purificó por RP-HPLC preparativa.

Condiciones de HPLC: Waters Prep 4000 System, disolvente A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y disolvente B = ACN/TFA al 0,1%; gradiente: B al 20-40% durante 60 min; caudal = 50 mL/min; columna: Phenomenex Luna 10  $\mu$ m C18 (2) 250 x 50 mm; detección: UV 214 nm.

Rendimiento del Compuesto 1 purificado: 690 mg (65%); m/z encontrado: 1478,4, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> esperado: 1478,1.

### 10 Ejemplo 3 Síntesis del Compuesto 3A.

Etapa (a): Preparación de ácido *N*-(4-fluorobencilideno)aminoxiacético.

Se disolvieron ácido (Boc-aminooxi)acético (96 mg, 0,50 mmol) y 4-fluorobenzaldehído (53  $\mu$ L, 0,50 mmol) en ácido fórmico (0,5 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 135 minutos. A continuación se diluyó la mezcla de reacción con ACN al 20%/agua/TFA al 0,1% (7 mL) y el producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa.

15 Condiciones de HPLC: Beckman System Gold; disolvente A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y disolvente B = ACN/TFA al 0,1%; gradiente: B al 25-35% durante 40 min; caudal = 10 mL/min; columna: Phenomenex Luna 5  $\mu$ m C18 (2) 250 x 21,2 mm; detección: UV 214 nm.

Rendimiento 92 mg (93%).

Etapa (b): Preparación del Compuesto 3A.

20 Se disolvieron ácido *N*-(4-fluorobencilideno)aminoxiacético [de la etapa (a), 43 mg, 0,22 mmol] y PyBOP (112 mg, 0,22 mmol) en DMF (2 mL). Se añadió una solución de DIPEA (157  $\mu$ L, 0,90 mmol) en DMF (10 mL) y la mezcla se agitó durante 1 minuto. A continuación se añadió la solución a una solución del Péptido 1 (500 mg, 0,18 mmol) en DMF (10 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. La mezcla de reacción se diluyó entonces con agua (20 mL) y el producto se purificó por HPLC preparativa.

25 Las condiciones de HPLC son como las del Ejemplo 2, excepto: disolvente A = H<sub>2</sub>O/acetato de amonio al 0,1% y disolvente B = ACN. Rendimiento 291 mg (55%) de material puro; m/z encontrado: 988,6, MH<sub>3</sub><sup>3+</sup> esperado: 987,7.

### Ejemplo 4: Síntesis del Compuesto 3B a partir del Compuesto 1.

Etapa (a): Desprotección del Compuesto 1 para obtener el Compuesto 2.

30 El Compuesto 1 (7 mg, 2,37  $\mu$ M) en un vial de reacción de 5 mL se trató con agua (10  $\mu$ L) y ácido trifluoroacético (190  $\mu$ L) y a continuación se sumergió dentro de un vial cerrado herméticamente en un baño sónico durante 10 minutos. A continuación se retiró a vacío el TFA acuoso (aproximadamente 30 minutos) y el residuo se reconstituyó en tampón de citrato (pH 2,6, 1,7 mL) y se cargó en un casete de sintetizador automatizado (FastLab™, GE Healthcare Ltd) en la posición 14.

Etapa (b): Síntesis y purificación de <sup>18</sup>F-benzaldehído.

35 Se produjo [<sup>18</sup>F]-fluoruro utilizando un ciclotrón GEMS PETtrace con una diana de plata por medio de la reacción nuclear [<sup>18</sup>O](p, n)[<sup>18</sup>F]. Se utilizaron volúmenes totales de la diana de 1,5 - 3,5 mL. El radiofluoruro fue atrapado en un cartucho QMA de Waters (pre-acondicionado con carbonato) y el fluoruro se eluyó con una solución de Kryptofix<sub>2.2.2</sub> (4 mg, 10,7  $\mu$ M) y carbonato de potasio (0,56 mg, 4,1  $\mu$ M) en agua (80  $\mu$ L) y acetonitrilo (320  $\mu$ L). Se usó nitrógeno para conducir la solución del cartucho QMA al recipiente de reacción. El [<sup>18</sup>F]-fluoruro se secó durante 9 minutos a 120°C bajo una corriente estacionaria de nitrógeno y vacío. Se añadió triflato de trimetilamonio-benzaldehído, [Haka *et al.*, *J. Lab. Comp. Radiopharm.*, 27, 823-833 (1989)] (3,3 mg, 10,5  $\mu$ M) en dimetilsulfóxido (1,1 mL) a [<sup>18</sup>F]-fluoruro secado y la mezcla se calentó a 105°C durante 7 minutos para producir 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzaldehído. La eficiencia del marcaje fue 69  $\pm$  3% de desintegración corregida.

45 A continuación se diluyó la mezcla de marcaje en bruto con solución de hidróxido de amonio y se cargó en un cartucho MCX+ SPE (preacondicionado con agua como parte de la secuencia FASTlab). El cartucho se lavó con agua, se secó con nitrógeno gaseoso antes de la elución de 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzaldehído de vuelta al recipiente de reacción en etanol (1 mL). Aproximadamente el 13% (desintegración corregida) de [<sup>18</sup>F]fluorobenzaldehído permaneció atrapado en el cartucho.

Etapa (c): Condensación del aldehído con derivado de aminooxi (Compuesto 2).

Se transfirió el Compuesto 2 (5 mg, 1,8  $\mu\text{mol}$ ) al recipiente de reacción FASTlab antes de que la elución de 4- $^{18}\text{F}$ fluorobenzaldehído fuera devuelta desde el cartucho MCX+. La mezcla se calentó luego a 70°C durante 17 minutos. La HPLC analítica confirmó que la RCP del producto del compuesto 3B era  $63 \pm 9\%$ .

- 5 La mezcla de reacción en bruto se diluyó con agua (10 mL) y se cargó en HPLC preparativa. Un sistema de acetato de amonio 10 mM frente a acetonitrilo proporcionó una separación completa entre los 3 posibles componentes radiactivos de la mezcla de reacción en bruto, a saber  $^{18}\text{F}$ -fluoruro ( $T_R = 0,5$  min),  $^{18}\text{F}$ -Compuesto 3B ( $T_R = 6$  min) y 4- $^{18}\text{F}$ -fluorobenzaldehído ( $T_R = 9$  min). La recuperación de la radiactividad del sistema de HPLC fue buena, con una eficacia de recuperación del 97%. El producto purificado se obtuvo con un tiempo de retención de aproximadamente 6 minutos.

**Ejemplo 5: Separación por HPLC de un péptido cíclico c-Met marcado con  $^{18}\text{F}$  a partir de un péptido no marcado.**

- 10 El Compuesto 3A se preparó de acuerdo con el Ejemplo 3.

(i) Condiciones analíticas de la HPLC.

Columna:	XBridge Shield RP 18 (4,6x50) mm, 2,5 $\mu\text{m}$
Fase móvil acuosa A:	$\text{NH}_4\text{Ac}$ 10 mM (tampón) pH aprox. 6,8
Fase móvil orgánica B:	Acetonitrilo
Temperatura de la columna:	25°C
Caudal:	1,2 mL/min

Gradiente:

Minutos	0	1	16	19	22	22,1	26
% de B	20	20	40	100	100	20	20

- 15 (ii) Condiciones de la HPLC preparativa

Columna:	XBridge Shield RP 18 (10x100) mm, 5 $\mu\text{m}$
Fase móvil acuosa A:	$\text{NH}_4\text{Ac}$ 10 mM (tampón) pH aprox. 6,8
Fase móvil orgánica B:	Etanol (90%) Fase móvil A (10%).
Temperatura de la columna:	25°C
Caudal:	4 mL/min

Gradiente:

Minutos	0	1	16	20	25	26
% de B	15	15	40	100	100	15

(iii) Resultados de las HPLC analítica y preparativa.

Compuesto	HPLC analítica	HPLC preparativa
	Tiempo de retención (minutos)	Tiempo de retención (minutos)
Hidrocloreto de anilina	1,8	3
Fluorobenzaldehído	4,3	13
Compuesto 2	4,8	no definido
Péptido 1	5,1	no definido
Compuesto 3A	8,8	19

**Ejemplo 6: Biodistribución del péptido c-Met marcado con  $^{18}\text{F}$  (Compuesto 3B) en ratones atómicos portadores de tumores.**

5 Se alojaron ratones atómicos machos CD-1 (de aproximadamente 20 g) en jaulas individuales ventiladas, con acceso ad libitum a alimentos y agua. Se desarrollaron células HT-29 (ATCC, nº de Cat. HTB-38) en un medio 5a de McCoy (Sigma nº M8403) suplementado con suero fetal de bovino al 10% y penicilina/estreptomicina. Las células se dividieron 1:3 dos veces por semana, a una confluencia de 70-80% usando tripsina al 0,25% y se incubaron en  $\text{CO}_2$  al 5% a 37°C. A los ratones se le inyectó por vía s.c. bajo anestesia con gas ligero (isoflurano) la suspensión de células HT-29 en un sitio (nuca) con una dosis nominal de  $10^6$  células por inyección en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  utilizando una aguja de calibre fino (25 G). A continuación se dejó que los tumores se desarrollaran durante 20 días, o hasta un volumen de al menos 200  $\text{mm}^3$  (para su inclusión en el estudio).

10 Después de un tiempo de desarrollo de 20 días, se inyectó a los animales el Compuesto 3B (0,1 mL, 1-5 MBq/animal) en forma de un bolo intravenoso a través de la vena de la cola. En varios momentos después de la inyección los animales se sacrificaron, disecaron y extrajeron los siguientes órganos y tejidos:

15 La absorción por el tumor fue 2,3% de dosis inyectada (di)/g a los 2 minutos, alcanzando un máximo a los 30 minutos (3,8% di/g) y disminuyendo con el tiempo hasta 1,9% di/g a 120 minutos p.i. La retención global dentro del tumor fue 83%. Se observó una eliminación razonablemente rápida en la sangre con el tiempo (en la sangre inicial a los 2 minutos era 9,2% di/g disminuyendo hasta 0,81% di/g a los 120 minutos p.i.). El tejido fundamental clave (por ejemplo, pulmones e hígado) siguió el perfil de la eliminación en sangre con el tiempo, con absorción a 120 min p.i. de 1,1% di/g (hígado) y 1,56% di/g (pulmones).

**Ejemplo 7: Estudio del bloqueo del receptor del Compuesto 3B en ratones atómicos portadores de tumores.**

25 El estudio del Ejemplo 6 se repitió con una inyección conjunta de un exceso de 100 y 1000 veces del análogo no radiactivo, Compuesto 3A, (exceso de  $\sim 1,5 \mu\text{g}$  y  $15 \mu\text{g}$  por animal), a animales disecados a los 120 minutos post-inyección. Todos los animales de este estudio tenían un peso similar (intervalo de 25 a 30 g). Los datos demostraron que se logró una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) en la absorción por el tumor del Compuesto 3B con un exceso de 1000 veces a la del péptido no marcado (la absorción por el tumor HT-29 descendió de 1,9 a 1,1% di/g; una reducción del 40%).

**Ejemplo 8: Formación de imágenes por PET de primates con el Compuesto 3B.**

30 La biodistribución del Compuesto 3B en tres monos cinomolgos hembras se midió por PET. En cada ocasión se realizaron dos inyecciones del trazador:

(a) 3 MBq/kg de trazador solo (Compuesto 3B) (estudio en el punto de partida);

(b) 9 MBq/kg de trazador con una inyección conjunta de 0,15 mg/kg del Compuesto 3A (estudio de bloqueo) cuatro horas después de la inyección en el punto de partida.

35 El trazador se inyectó como una dosis en forma de bolo en 1-3 mL seguido de 1 mL de solución salina.

Se tomaron muestras de sangre (0,2 mL) para la determinación de la radiactividad a intervalos de hasta 210 minutos después de la administración. En los estudios dinámicos se señalaron regiones de interés en hueso, corazón, riñón,

pulmón, hígado y músculos. En los estudios de todo el cuerpo, se señalaron las regiones de interés en hueso, cerebro, colon, corazón, riñón, pulmón, hígado, músculo, páncreas, intestino delgado, bazo y vejiga. Se generaron datos de tiempo-actividad expresados como valores estándar de absorción (SUV).

5 Se observó una unión específica (~ 40%) *in vitro* en el hígado de mono Rhesus utilizando autorradiografías de cortes congelados. No se observó que el músculo del mono Rhesus tuviera ninguna unión específica. Estudios *in vivo* en monos cinomolgos mostraron una rápida absorción por el hígado que se redujo en >40% después de la inyección conjunta de 0,15 mg/kg del Compuesto 3A. No se observó ninguna unión específica a los músculos *in vivo*.

#### Ejemplo 9: Efecto de la ciclodextrina sobre la biodistribución del Compuesto 3B.

10 Se compararon la biodistribución del Compuesto 3B y el Compuesto 3B formulado con el solubilizador hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HPCD). No se encontraron diferencias significativas.

#### Ejemplo 10: Síntesis totalmente automatizada del Compuesto 3B.

Se realizó una síntesis análoga a la del Ejemplo 4, utilizando el Compuesto 2 disuelto en solución tampón o de anilina y cargado en el casete FastLab para su uso inmediato.

15 La siguiente tabla resume la cantidad de cada uno de los constituyentes radiomarcados principales, calculada por pureza radioquímica de la HPLC analítica:

	Producto	Precursor del Compuesto 1	Precursor del Compuesto 2
T = 0 min	Compuesto 3B	63±9%	75±3%
	[ <sup>18</sup> F]Fluorobenzaldehído	28±15%	20±3%
T = 60min	Compuesto 3B	76±20%	92±2%
	[ <sup>18</sup> F]Fluorobenzaldehído	20±15%	2±1%

#### Ejemplo 11: Síntesis automatizada del Compuesto 3B usando purificación por SPE.

La síntesis del Ejemplo 4 se realizó usando un aparato sintetizador automatizado FastLab™ (GE Healthcare Ltd). El casete estaba configurado con reactivos, jeringas y cartuchos para la SPE como se muestra en la Figura 1.

20 Los cartuchos para SPE: QMA (tratamiento con agua con metilamonio cuaternario), MCX+ (intercambio catiónico mixto) y C2 (baja hidrofobicidad) se obtuvieron todos de Waters.

25 Durante la secuencia de FASTlab los cartuchos se acondicionaron (en tándem) con etanol. Inmediatamente antes de su uso, los cartuchos se imprimaron con ácido fosfórico diluido (0,2%). La mezcla de reacción en bruto se diluyó con ácido fosfórico al 1% y se cargó en el aparato de SPE. Dicho aparato de SPE se lavó con agua antes de que el producto se eluyera en 6 mL de agua (80% de etanol) y se analizó la pureza radioquímica (RCP) por HPLC analítica.

Los resultados, basados en la cantidad de partida del <sup>18</sup>F-fluoruro utilizado, fueron los siguientes:

Actividad inicial (MBq)	Rendimiento al final de la síntesis (%)	RCP
493	21	>99%
750	25	>99%
1.000	26	>99%
49.000	19	94%
61.000	18	98%
67.400	21	96%

**Ejemplo 12: Formulación y liofilización del precursor.**

5 El precursor peptídico, Compuesto 2 (2,5 ó 5 mg), se mezcló con un tampón de formulación (hidrogenofosfato disódico dihidrato y ácido cítrico monohidrato, pH 2,8) y se agitó hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. Cada uno de los viales de 13 mm de un aparato sintetizador automatizado FASTlab™ (GE Healthcare Ltd) con tapones para liofilización se rellenaron con 1 mL de suspensión. A continuación se congelaron los viales en la unidad de liofilización y se sometieron a un ciclo de liofilización de 4 días.

Todos los viales que contenían péptido proporcionaban tortas liofilizadas satisfactorias. Se encontró que el precursor liofilizado se disolvía mucho más rápidamente que el Compuesto 2 distribuido en seco.

**10 Ejemplo 13: Efecto del pH sobre la solubilidad.**

El Compuesto 3B se preparó en un sintetizador FASTlab™ y se recogió el eluyente del producto (~ 6 mL) en un vial que contenía 2 mL de tampón de formulación (pABA, tampón cítrico, pH 7). Se observó una solución turbia. La solución (8 mL) se filtró fácilmente por un pre-filtro (filtro Pall de 25 mm con membrana Supor de 0,2 µm con banda repelente hidrófoba, nº de pieza 6124211), obteniéndose una solución transparente.

15 La solución filtrada se dividió en 4 muestras de 2 mL y el pH de las 4 muestras se ajustó con fosfato (sólido, de modo que no cambie el volumen) como sigue:

Vial 1	pH 7,5 (solución original, sin ajustes)
Vial 2	pH 6,1
Vial 3	pH 8,6
Vial 4	pH 9,1

Todas las muestras se conservaron en la oscuridad a temperatura ambiente. Para evaluar la agregación/precipitación potencial, las 4 muestras fueron sometidas a dispersión con luz estática durante 28 días. Se observó lo siguiente:

- 20 - a pH 6,1 mostró precipitado visual el día 10;  
 - no se observó ninguna indicación de agregación a pH ≥ 7,5 después de 28 días.

**Ejemplo 14: Estudios en seres humanos.**

25 La formación de imágenes con el Compuesto 3B se estudió en 6 pacientes humanos a los que se había diagnosticado previamente carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. El agente fue bien tolerado (sin efectos adversos). 5 de los 6 pacientes tuvieron una absorción moderada/alta del trazador y 1 paciente la tuvo baja (similar al lado contralateral). Esto coincide con los informes de la bibliografía del 80% de los pacientes que sobreexpresan c-Met.

LITA DE SECUENCIAS

<110> GE Healthcare Limited

5 <120> Composiciones de radiotrazadores peptídicos

<130> PZ1058 WO

<160> 7

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

20 <220>

<221> DISULFURO

<222> (1) .. (13)

<220>

25 <221> VARIANTE

<222> (2) .. (2)

<223> N, H o Y

<220>

30 <221> DISULFURO

<222> (3) .. (11)

<220>

<221> VARIANTE

35 <222> (4) .. (4)

<223> G, S, T o N

<220>

<221> VARIANTE

40 <222> (8) .. (8)

<223> T o R

<220>

<221> VARIANTE

45 <222> (15)..(15)

<223> A, D, E, G o S

<220>

<221> VARIANTE

50 <222> (16)..(16)

<223> S o T

<220>

<221> VARIANTE

55 <222> (17)..(17)

<223> D o E

<400> 1

**Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys Tyr Xaa Xaa**

**1 5 10 15**

**Xaa**

60 <210> 2

<211> 18

<212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> péptido sintético

10 <220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (2)..(14)

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> N, H o Y

20 <220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (4) .. (12)

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> G, S, T o N

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> T o R

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> A, D, E, G o S

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (17)..(17)  
 <223> S o T

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (18) .. (18)  
 <223> D o E

45 <400> 2  
**Ser Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys Tyr Xaa**  
 1 5 10 15

**Xaa Xaa**

50 <210> 3  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

55 <220>  
 <223> péptido sintético  
 <220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (4) .. (16)

60 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> N, H o Y

<220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (6)..(14)  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> G, S, T o N  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (11) .. (11)  
 <223> T o R  
 15  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (18) .. (18)  
 <223> A, D, E, G o S  
 20  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (19) .. (19)  
 <223> S o T  
 25  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> D o E  
 30  
 <400> 3  
**Ala Gly Ser Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys**  
 1 5 10 15  
  
**Tyr Xaa Xaa Xaa Gly Thr**  
  
**20**  
 35  
 <210> 4  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
  
 <400> 4  
**Gly Gly Gly Lys**  
 45  
 1  
 <210> 5  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
  
 <400> 5  
**Gly Ser Gly Lys**  
 55  
 1  
 <210> 6

<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> péptido sintético

<400> 6  
**Gly Ser Gly Ser Lys**  
**1 5**

10 <210> 7  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> péptido sintético

20 <220>  
<221> DISULFURO  
<222> (4) .. (16)

25 <220>  
<221> DISULFURO  
<222> (6) .. (14)

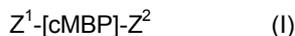
<400> 7  
**Ala Gly Ser Cys Tyr Cys Ser Gly Pro Pro Arg Phe Glu Cys Trp Cys**  
**1 5 10 15**

**Tyr Glu Thr Glu Gly Thr Gly Gly Gly Lys**  
**20 25**

30

## REIVINDICACIONES

1. Un agente formador de imágenes que comprende un péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con  $^{18}\text{F}$ , en donde dicho péptido cíclico unido a c-Met es un péptido cíclico de 18 a 30 meros de Fórmula I:



5 en donde:

cMBP tiene la Fórmula II:



en donde Q es la secuencia de aminoácidos (SEQ-1):



10 en donde  $\text{X}^1$  es Asn, His o Tyr;

$\text{X}^2$  es Gly, Ser, Thr o Asn;

$\text{X}^3$  es Thr o Arg;

$\text{X}^4$  es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

$\text{X}^5$  es Ser o Thr;

15  $\text{X}^6$  es Asp o Glu;

y  $\text{Cys}^{a-d}$  son cada uno residuos de cisteína, de tal modo que los residuos a y b, así como c y d están ciclizados formando dos enlaces disulfuro separados;

A y A' son independientemente cualquier aminoácido distinto de Cys, con la condición de que al menos uno de A y A' esté presente y sea Lys;

20 x e y son independientemente números enteros de valor 0 a 13, y se eligen de tal manera que  $[x + y] = 1$  a 13;

$\text{Z}^1$  está unido al extremo N de cMBP y es H o  $\text{M}^{\text{IG}}$ ;

$\text{Z}^2$  está unido al extremo C de cMBP y es OH,  $\text{OB}^c$  o  $\text{M}^{\text{IG}}$ ,

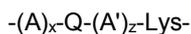
donde  $\text{B}^c$  es un catión biocompatible;

25 cada  $\text{M}^{\text{IG}}$  es independientemente un grupo inhibidor del metabolismo que es un grupo biocompatible que inhibe o suprime *in vivo* el metabolismo del péptido cMBP, bien en el extremo amino ( $\text{Z}^1$ ) o en el extremo carboxi ( $\text{Z}^2$ ) y que se elige de:

30 para el extremo amino del péptido: grupos N-acilados,  $\text{-NH(C=O)R}^G$ , donde el grupo acilo  $\text{-(C=O)R}^G$  tiene  $\text{R}^G$  elegido de: grupos alquilo de  $\text{C}_{1-6}$  o arilo de  $\text{C}_{3-10}$  o comprende un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG); para el extremo carboxi del péptido: carboxamida, éster *terc*-butílico, éster bencílico, éster ciclohexílico, aminoalcohol o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG);

en donde cMBP está marcado en el residuo Lys de los grupos A o A' con  $^{18}\text{F}$ .

2. El agente formador de imágenes de la reivindicación 1, en donde cMBP tiene la fórmula IIA:



35 (IIA)

en donde:

z es un número entero de valor 0 a 12 y  $[x + z] = 0$  a 12,

y cMBP comprende sólo un residuo de Lys.

3. La composición del agente formador de imágenes de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde Q comprende la secuencia de aminoácidos SEQ-2 o SEQ-3:



Ala-Gly-Ser-Cys<sup>a</sup>-X<sup>1</sup>-Cys<sup>c</sup>-X<sup>2</sup>-Gly-Pro-Pro-X<sup>3</sup>-Phe-Glu-Cys<sup>d</sup>-Trp-Cys<sup>b</sup>-Tyr-X<sup>4</sup>-X<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>- Gly-Thr (SEQ-3).

4. El agente formador de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde X<sup>3</sup> es Arg.
5. El agente formador de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde cualquiera de los grupos -(A)<sub>x</sub>- o -(A')<sub>y</sub>- comprende un péptido enlazador que se elige entre:
- 5                    -Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4),  
                       -Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5) o  
                       -Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6).
6. El agente formador de imágenes de la reivindicación 5, en donde cMBP tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ-7):
- 10                   Ala-Gly-Ser-Cys<sup>a</sup>-Tyr-Cys<sup>c</sup>-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys<sup>d</sup>-Trp-Cys<sup>b</sup>-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys.
7. El agente formador de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde tanto Z<sup>1</sup> como Z<sup>2</sup> son independientemente M<sup>IG</sup>.
8. El agente formador de imágenes de la reivindicación 7, en donde Z<sup>1</sup> es acetilo y Z<sup>2</sup> es una amida primaria.
- 15    9. Una composición de agente formador de imágenes que comprende:
- (i) el péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con <sup>18</sup>F de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;
- (ii) un péptido cíclico de unión a c-Met no marcado;
- en donde: dicho péptido cíclico de unión a c-Met tiene la misma secuencia de aminoácidos en (i) y (ii)
- y en donde el péptido cMBP no marcado está presente en dicha composición en no más de 50 veces la cantidad
- 20                   molar de dicho péptido cMBP marcado con <sup>18</sup>F.
10. La composición de agente formador de imágenes de la reivindicación 9, que está mantenida a pH 7,5 o superior y/o comprende además un solubilizante.
11. La composición de agente formador de imágenes de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que comprende además uno o más radioprotectores.
- 25    12. Una composición farmacéutica que comprende el agente formador de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición del agente formador de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, junto con un vehículo biocompatible, en una forma estéril adecuada para administración a un mamífero.
13. Un precursor, útil en la preparación del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con <sup>18</sup>F de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende:
- 30                   (i) el péptido cíclico de unión a c-Met de Fórmula I como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde Z<sup>1</sup> = Z<sup>2</sup> = M<sup>IG</sup>; o
- (ii) un péptido cíclico de unión a c-Met funcionalizado con aminooxi.
14. Un método de preparación del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con <sup>18</sup>F de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende:
- 35                   (i) la provisión del precursor de la reivindicación 13;
- (ii) cuando dicho precursor comprende un péptido cíclico de unión a c-Met no marcado de Fórmula I, en donde Z<sup>1</sup> = Z<sup>2</sup> = M<sup>IG</sup>, la reacción bien con un éster activado marcado con <sup>18</sup>F o con un ácido carboxílico marcado con <sup>18</sup>F en presencia de un agente activante, para obtener el péptido cíclico unido a c-Met radiomarcado con <sup>18</sup>F conjugado por medio de un enlace amida en el residuo Lys del cMBP de dicho péptido cíclico;
- 40                   (iii) cuando dicho precursor comprende un péptido cíclico de unión a c-Met funcionalizado con aminooxi, la reacción bien con:
- (a) un éster activado marcado con <sup>18</sup>F o un ácido carboxílico marcado con <sup>18</sup>F en presencia de un agente activante, para obtener el péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con <sup>18</sup>F conjugado por medio de un enlace amida en la posición aminooxi de dicho péptido funcionalizado; o

(b) un aldehído marcado con  $^{18}\text{F}$  para obtener el péptido cíclico unido a c-Met radiomarcado con  $^{18}\text{F}$  conjugado por medio de un enlace éter de oxima en la posición aminooxi de dicho péptido funcionalizado.

15. El método de la reivindicación 14, en donde se utiliza el péptido cíclico de unión a c-Met funcionalizado con aminooxi.

5 16. Un método de preparación de la composición del agente formador de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, o una de sus composiciones farmacéuticas de la reivindicación 12, que comprende:

(i) la preparación del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con  $^{18}\text{F}$  utilizando el método de la reivindicación 14 o la reivindicación 15; y

10 (ii) la separación cromatográfica de un péptido cíclico de unión a c-Met no marcado del péptido cíclico de unión a c-Met radiomarcado con  $^{18}\text{F}$ .

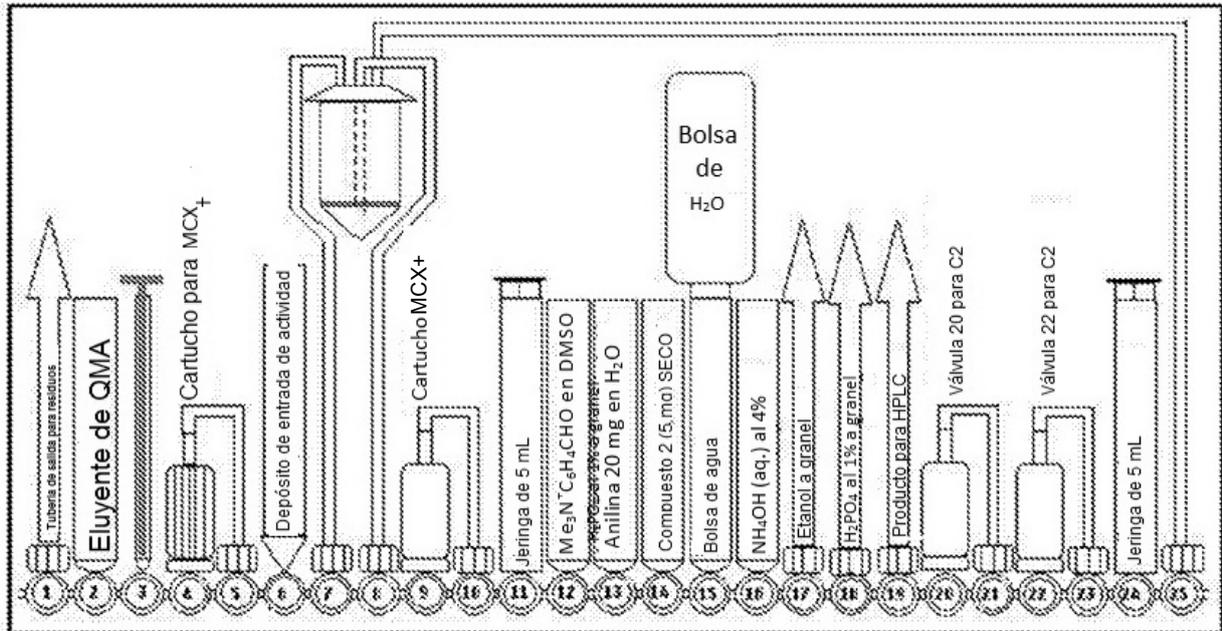
17. El método de la reivindicación 16, en donde se obtiene la composición farmacéutica de la reivindicación 12 y dicho método se realiza utilizando un aparato sintetizador automatizado.

15 18. Un método de formación de imágenes *in vivo* del cuerpo de un mamífero para obtener imágenes de sitios de sobreexpresión o localización de c-Met, comprendiendo dicho método la formación de imágenes de dicho cuerpo al que había sido administrado previamente el agente formador de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, la composición del agente formador de imágenes de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 12.

19. El método de formación de imágenes de la reivindicación 18, en donde el sitio de sobreexpresión o localización de c-Met es un tumor canceroso o metástasis.

20

Figura 1: Configuración del casete FasLab<sup>TM</sup> para el Ejemplo 11



donde:

QMA = cartucho para SPE para tratamiento con agua con metilamonio cuaternario

MCX+ = cartucho para SPE de intercambio catiónico mixto

C2 = cartucho para SPE basado en sílice de baja hidrofobicidad