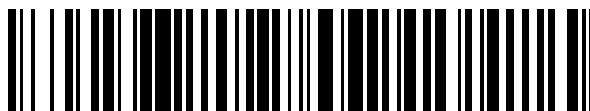


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 803**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)
C07K 1/13 (2006.01)
C07C 247/16 (2006.01)
C07D 249/06 (2006.01)
C07D 261/08 (2006.01)
C07D 207/452 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)
C07C 291/06 (2006.01)
C07D 231/12 (2006.01)
C07K 5/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2010 PCT/EP2010/069341**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011 WO11070136**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10788337 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2509638**

54 Título: **Método de radiomarcado de yodo**

30 Prioridad:

10.12.2009 GB 0921573
10.12.2009 US 285199 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

AVORY, MICHELLE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 627 803 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de radiomarcado de yodo

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona un método nuevo de marcaje de moléculas biológicas diana (BTMs del inglés "biological targeting molecules") de interés con radioyodo. También se describen BTMs radioyodadas preparadas usando el método, así como composiciones radiofarmacéuticas que comprenden dichas BTMs radioyodadas. También se describen intermedios radioyodados útiles en el método, así como como métodos de obtención de imágenes *in vivo* usando BTMs radioyodadas.

Antecedentes de la invención

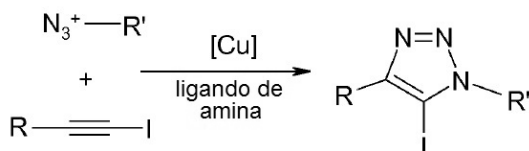
10 Los métodos para incorporar radiohalógenos en moléculas orgánicas son conocidos [Bolton, J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002)]. Para el caso de radiofármacos marcados con ^{123}I , Eersels *et al* [J. Lab. Comp. Radiopharm., 48, 241-257 (2005)] han comparado las 4 rutas sintéticas principales:

- (i) radioyodación oxidativa;
- (ii) intercambio isotópico nucleofílico;
- 15 (iii) intercambio no isotópico nucleofílico;
- (iv) marcaje electrofílico.

La ruta (iv) habitualmente implica el uso de precursores organometálicos, tales como trialquilina, trialquilsililo o un derivado de organomercurio o de organotalio. Entre éstos, la ruta de radioyododesestañado ha sido reconocida como método de marcaje electrofílico preferido, debido a la posibilidad de radioyodación a temperatura ambiente. Sin embargo, Eersels *et al* concluyeron que no existía un método de radioyodación general preferido, ya que la elección depende de la naturaleza del compuesto que se pretende radioyodar.

El uso de intermedios de organoestaño en síntesis radiofarmacéutica ha sido revisado por Ali *et al* [Synthesis, 423-445 (1996)]. Kabalka *et al* han publicado extensivamente sobre el uso de precursores de organoborano para permitir el marcaje de radioisótopos y radiohalógenos [véase, p.ej., J. Lab. Comp. Radiopharm., 50, 446-447 y 888-894 (2007)].

La química "click" es un área en crecimiento en investigación biotecnológica ["Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science", J. Lahann (Ed.), Wiley, (2009)]. Hein *et al* han publicado que los 1-yodoalquinos sufren reacciones de ciclación click con azidas como se indica a continuación [Ang. Chem. Int. Ed. Engl., 48, 8018-8021 (2009)]:

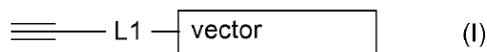


30 Hein se ocupa de alquinos internos (es decir, R no es H), y no menciona la radioquímica.

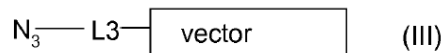
Las aplicaciones de la química click en investigación biomédica, que incluye la radioquímica, han sido revisadas por Nwe *et al* [Cancer Biother. Radiopharm., 24(3), 289-302 (2009)]. Tal como se indica en dicho trabajo, el principal interés ha sido el radioisótopo PET ^{18}F (y en menor medida el ^{11}C), más estrategias "click a quelato" para radiometales adecuadas para obtención de imágenes SPECT tales como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{111}In . Glaser y Robins han revisado el uso de química click en reacciones de marcaje radioquímico PET, poniendo el foco en los radioisótopos ^{18}F y ^{11}C [J. Lab. Comp. Radiopharm., 52, 407-414 (2009)].

El marcaje click con ^{18}F de péptidos diana, que proporciona productos que incorporan un triazol sustituido con fluoroalquilo ^{18}F ha sido publicado por Li *et al* [Bioconj. Chem., 18(6), 1987-1994 (2007)], y Hausner *et al* [J. Med. Chem., 51(19), 5901-5904 (2008)].

40 La patente WO 2006/067376 describe un método para marcar un vector que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (I) con un compuesto de fórmula (II):



o, un compuesto de fórmula (III) con un compuesto de fórmula (IV):

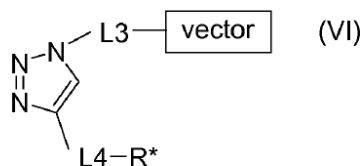
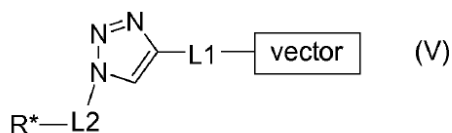


5 en presencia de un catalizador de Cu(I), en donde:

L1, L2, L3 y L4 son todos grupos de enlace;

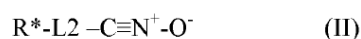
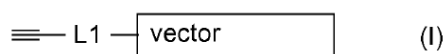
R* es un resto indicador que comprende un radionucleido;

para producir un conjugado de fórmula (V) o (VI), respectivamente:

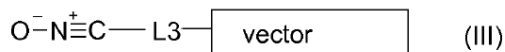


10 R* en el documento WO 2006/067376 es un resto indicador que comprende un radionucleido, p.ej., un radionucleido emisor de positrones. Los radionucleidos emisores de positrones adecuados para este fin se considera que incluyen ^{11}C , ^{18}F , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{124}I , ^{82}Rb , ^{68}Ga , ^{64}Cu y ^{62}Cu , de los cuales se prefieren ^{11}C y ^{18}F . Se afirma que otros radionucleidos incluyen ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{211}At , ^{99m}Tc y ^{111}In .

15 La patente WO 2007/148089 describe un método para radiomarcarse un vector que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (I) con un compuesto de fórmula (II):



o, un compuesto de fórmula (III) con un compuesto de fórmula (IV):

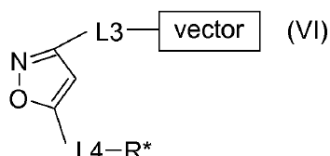
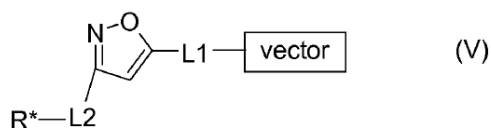


en presencia de un catalizador de Cu(I), en donde:

20 L1, L2, L3 y L4 son todos grupos de enlace;

R* es un resto indicador que comprende un radionucleido;

para producir un conjugado de fórmula (V) o (VI), respectivamente:



5 En ambos documentos, WO 2006/067376 y WO 2007/148089, se indica que los radionucleidos se incorporan de forma adecuada en un agente quelante, por ejemplo por incorporación directa mediante métodos conocidos por el especialista en la técnica. Ni la patente WO 2006/067376 ni la WO 2007/148089 describen ninguna metodología específica para radioyodación click – en particular qué combinación de compuestos de las fórmulas (I)-(IV), junto con qué combinaciones de grupos de enlace L1, L2, L3 y L4, y qué tipo de grupo R*, serían adecuados.

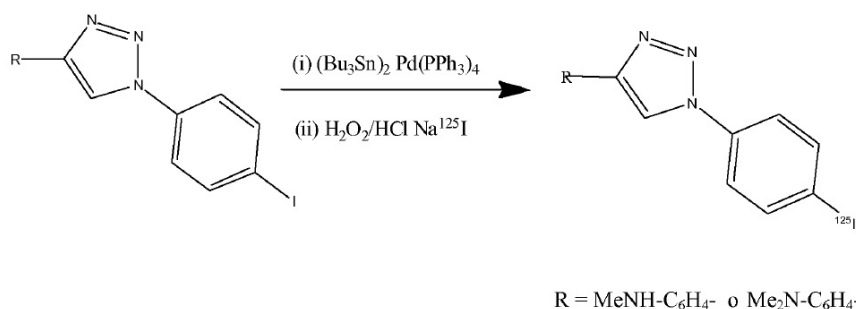
La patente WO 2006/116629 (Siemens Medical Solutions USA, Inc.) describe un método de preparación de un ligando o sustrato radiomarcado que presenta afinidad por una biomacromolécula diana, método que comprende:

- (a) hacer reaccionar un primer compuesto que comprende
- 10 (i) una primera estructura molecular;
- (ii) un grupo saliente;
- (iii) un primer grupo funcional capaz de participar en una reacción de química click; y opcionalmente,
- (iv) un ligando entre el primer grupo funcional y la estructura molecular,
- 15 con un reactivo radioactivo en condiciones suficientes para desplazar el grupo saliente con un componente radioactivo del reactivo radioactivo para formar un primer compuesto radioactivo;
- (b) proporcionar un segundo compuesto
- (i) una segunda estructura molecular;
- (ii) un segundo grupo funcional complementario capaz de participar en una reacción de química click con el primer grupo funcional, en donde el segundo compuesto comprende opcionalmente un ligando entre el segundo compuesto y el segundo grupo funcional;
- 20 (c) hacer reaccionar el primer grupo funcional del primer compuesto radioactivo con el grupo funcional complementario del segundo compuesto a través de una reacción de química click para formar el ligando o sustrato radioactivo; y
- (d) aislar el ligando o sustrato radioactivo.

25 El documento WO 2006/116629 manifiesta que el método descrito en él es adecuado para uso con los radioisótopos: ^{124}I , ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N y ^{15}O , siendo los radioisótopos preferidos: ^{18}F , ^{11}C , ^{123}I , ^{124}I , ^{127}I , ^{131}I , ^{76}Br , ^{64}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y , ^{67}Ga , ^{51}Cr , ^{192}Ir , ^{99}Mo , ^{153}Sm y ^{201}Tl . La patente WO 2006/116629 describe que otros isótopos que se pueden emplear incluyen: ^{72}As , ^{74}As , ^{75}Br , ^{55}Co , ^{61}Cu , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{68}Ge , ^{125}I , ^{132}I , ^{111}In , ^{52}Mn , ^{203}Pb y ^{97}Ru . Sin embargo, la patente WO 2006/116629 no proporciona ninguna información sobre cómo aplicar el método a la radioyodación de moléculas biológicas.

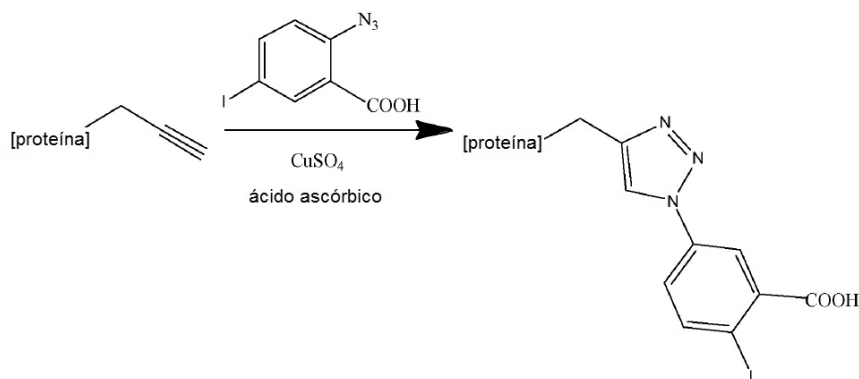
30

Qu *et al* [J. Med. Chem., 50(14), 3380-3387 (2007)] describen la preparación de aminas marcadas con ^{125}I :



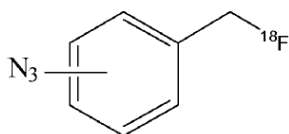
El precursor de yodofenil-triazol no radioactivo se prepara mediante ciclación click de R-≡-H y de I-C₆H₄-N₃. El documento WO 2008/131148 es una solicitud de patente correspondiente a nombre de Qu *et al* que describe una química similar.

- 5 Dong *et al* [ChemBioChem, 10, 1149-1151 (2009)] describen un método para yodar proteínas usando química click:



- 10 Dong *et al* introdujeron el grupo alquino en la proteína usando el aminoácido sintético homopropargilglicina en lugar del residuo Met del extremo N. La proteína estudiada está modificada para no presentar cisteínas, y consta de 90 aminoácidos. Dong *et al* sugieren que el método podría ser aplicado con éxito en radioinmunoensayos usando el radioisótopo ¹²⁵I, pero no se describe ninguna química radioactiva.

El documento 2010/131745 describe fenilazidas marcadas con ¹⁸F de la fórmula mostrada a continuación, y su uso para radiomarcas oligonucleótidos funcionalizados con alquino mediante cicloadición click, formando anillos de triazol:



- 15 Por lo tanto, todavía existe una necesidad de métodos de radioyodación alternativos, que proporcionen moléculas diana biológicas radioyodadas adecuadas para la obtención de imágenes *in vivo*, con la marca de yodo en una forma química que sea resistente a una desyodación metabólica *in vivo*.

La presente invención

- 20 La presente invención proporciona la metodología para la radioyodación de moléculas diana biológicas (BTMs), usando radioyodación click. El método presenta la ventaja de que puede llevarse a cabo en condiciones suaves, y por lo tanto es compatible con una variedad de moléculas biológicas – que potencialmente incluyen moléculas en las que los métodos de radioyodación directa convencionales pueden no ser viables debido a inestabilidad de la BTM en las condiciones de reacción de radioyodación. Los ejemplos de dicha sensibilidad incluyen incompatibilidad o inestabilidad en las condiciones oxidantes necesarias la radioyodación convencional. El presente método
- 25 proporciona una metodología de radioyodación que puede ser llevado a cabo en condiciones no oxidantes, y por tanto es particularmente ventajoso para el marcaje de BTMs que son susceptibles a la oxidación.

La ciclación click usada en el presente método es altamente selectiva, por tanto el marcaje con radioyodo se produce regioselectivamente en el grupo alquino de la BTM funcionalizada de Fórmula I. El método proporciona productos en los que el radioyodo está enlazado directamente a un grupo (Y¹), que se elige para ser resistente al

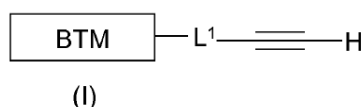
metabolismo *in vivo* del enlace carbono-yodo. De esta manera, se espera que los productos radioyodados exhiban una buena estabilidad con respecto a la desyodación metabólica *in vivo*, con la consiguiente captación indeseada de radioyodo en el estómago y/o la tiroides. Por lo tanto, los productos son adecuados para uso como radiofármacos en la obtención de imágenes *in vivo*, lo cual supone una importante ventaja.

- 5 La metodología de radioyodación click es fácilmente adaptable al uso con un aparato sintetizador automatizado. Debido a su selectividad, también puede permitir el marcaje de BTM sin la necesidad de usar grupos protectores. Adicionalmente, el marcaje tiene el potencial de alcanzar mayores rendimientos de radiomarcado que las reacciones de conjugación convencionales que usan, p.ej., el acoplamiento de éster activo.

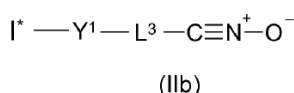
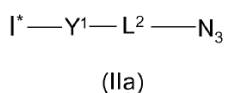
Descripción detallada de la invención

- 10 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la radioyodación de un resto diana biológico, comprendiendo dicho método:

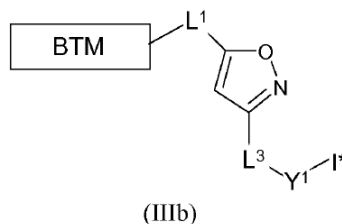
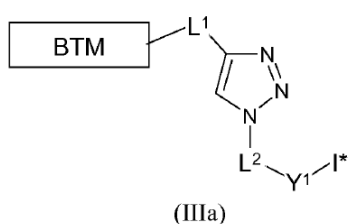
- (i) la provisión de un compuesto de Fórmula (I):



- (ii) la reacción de dicho compuesto de Fórmula (I) con un compuesto de Fórmula (IIa) o de Fórmula (IIb):



- 15 en presencia de un catalizador de cicloadición click, para producir un conjugado de Fórmula (IIIa) o (IIIb), respectivamente:



en donde:

- 20 I* es un radioisótopo de yodo, adecuado para la obtención de imágenes *in vivo*, elegido entre ¹²³I, ¹²⁴I o ¹³¹I;

L¹, L² y L³ son cada uno de forma independiente un grupo ligando que puede estar presente o ausente;

Y¹ es -Ar¹- o -X¹-;

en donde -Ar¹- es arileno C₃₋₁₀, y

-X¹- es -CH=CH-(CH₂)_n-(Ar¹)_j- o -CH=CH-(Ar¹)_j-(CH₂)_n-

- 25 en donde j es 0 ó 1, y n es un número entero de valor 0 a 4,

en donde cuando Y¹ es -X¹-, I* está unido al extremo -CH=CH de X¹;

BTM es el resto diana biológico.

El término “radioyodación” tiene su significado convencional, es decir, un proceso de radiomarcado en el que el radioisótopo usado para el radiomarcado es un radioisótopo de yodo.

- 30 Cuando el grupo ligando (L¹) está ausente, significa que el grupo alquino de Fórmula (I) está enlazado directamente al BTM. Eso podría significar, por ejemplo, que el alquino está conjugado a la cadena lateral de un aminoácido de un péptido o proteína BTM, o directamente al extremo N o C de un péptido BTM. Cuando está presente, cada grupo ligando (L¹) comprende independientemente un grupo de fórmula -(A)_m- en donde

- 35 cada A es de forma independiente -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NR₂CR₂-, un grupo

cicloheteroalquileo C₄₋₈, un grupo cicloalquileo C₄₋₈, un grupo arileno C₅₋₁₂, o un grupo heteroarileno C₃₋₁₂, un aminoácido, un azúcar o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG) monodisperso;

en donde cada R se elige de forma independiente entre: H, alquilo C₁₋₄, alqueno C₂₋₄, alquino C₂₋₄, alcoxilquilo C₁₋₄ o hidroxialquilo C₁₋₄;

5 y m es un número entero de valor 1 a 20.

Con el término “resto diana biológico” (BTM) se entiende un compuesto que, tras ser administrado, es asimilado selectivamente o se localiza en una zona concreta del cuerpo del mamífero *in vivo*. Dichas zonas pueden estar implicadas, por ejemplo, en un estado de enfermedad particular, o ser indicativas de cómo está funcionando un órgano o un proceso metabólico.

10 El término radioisótopo de yodo tiene su significado convencional, es decir, un isótopo del elemento yodo que es radioactivo. Los radioisótopos que son adecuados para la obtención de imágenes *in vivo* son: ¹²³I, ¹²⁴I y ¹³¹I. El ¹²⁵I no es adecuado para la obtención de imágenes *in vivo*, y por tanto queda fuera del alcance de las presentes reivindicaciones. El producto radioyodado es útil como radiofármaco para el diagnóstico por imagen o para aplicaciones terapéuticas *in vivo*. Dichas aplicaciones terapéuticas incluyen radioinmunoterapia cuando el BTM es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. El ¹³¹I es un radioisótopo preferido para aplicaciones terapéuticas *in vivo*.

20 Con el término “catalizador de cicloadición click” se pretende indicar un catalizador conocido por catalizar la reacción de cicloadición click (alquino más azida) o click (alquino más óxido de isonitrilo) del primer aspecto. En la técnica se conocen dichos catalizadores adecuados para uso en reacciones de cicloadición click. Tales catalizadores preferidos incluyen Cu(I) y se describen a continuación. Se describen más detalles de catalizadores adecuados en Wu y Fokin [Aldrichim. Acta, 40(1), 7-17 (2007)] y Meldal y Tornøe [Chem. Rev., 108, 2952-3015 (2008)].

25 Con el término “arileno C₃₋₁₀” se pretende indicar un radical arilo bivalente que tiene de 3 a 10 átomos de carbono. El término abarca grupos que contienen carbono y heteroarilos. Los grupos heteroarilo adecuados incluyen anillos de piridina, indol o imidazol. En las Fórmulas (IIa) o (IIb) el isótopo radioyodo (I*) se enlaza directamente al anillo arilo o al grupo vinilo de Y¹.

Cuando Y¹ es X¹, la frase “I* está unido al extremo -CH=CH de X¹” significa que el compuesto de Fórmula (IIa) es: I*-CH=CH-(CH₂)_n-(Ar¹)_m-N₃ ó I*-CH=CH-(Ar¹)_m-(CH₂)_n-N₃, en donde m es 0 ó 1, y n es un número entero de valor 0 a 4. Una lógica similar se aplica a los compuestos (IIb), (IIIa) y (IIIb).

Aspectos preferidos

30 Un precursor preferido para uso en el método del primer aspecto es la azida de Fórmula (IIa), y por tanto un producto preferido es el triazol de Fórmula (IIIa).

Los radioisótopos preferidos de yodo para uso en la presente invención son aquellos adecuados para la obtención de imágenes médicas *in vivo* usando PET o SPECT. De esta manera, I* es preferiblemente ¹²³I o ¹²⁴I, en donde ¹²³I es adecuado para imágenes SPECT y ¹²⁴I para imágenes PET. I* es en su forma más preferible ¹²³I.

35 El grupo Y¹ está conjugado directamente a I*, y el enlace Y¹-I* es parte del producto de Fórmula (IIIa) o (IIIb). Los grupos Y¹ de la presente invención se diseñan por tanto para proporcionar productos en los que la marca de radioyodo (es decir, I*) no es susceptible a la desyodación *in vivo*. Cuando Y¹ es Ar¹, un grupo Ar¹ preferido es arileno C₄₋₆, que más preferiblemente comprende un anillo fenilo o piridina sustituido o sin sustituir, lo más preferiblemente un anillo fenileno. Cuando Y¹ es X¹, el grupo vinilo puede estar en la orientación E- o Z-, es decir, ambos diastereómeros entran dentro del alcance de la presente invención. X¹ se elige preferiblemente de tal modo que n es de 1 a 4, más preferiblemente n es de 1 a 4 y j es 0. Y¹ preferiblemente es Ar¹, que incluye los grupos Ar¹ preferidos definidos anteriormente.

45 El BTM puede tener origen natural o sintético, pero preferiblemente es sintético. El término “sintético” tiene su significado convencional, es decir, preparado por el hombre, en contraposición con ser aislado de fuentes naturales, p.ej., del cuerpo de un mamífero. Dichos componentes presentan la ventaja de que su fabricación y se perfil de impurezas puede ser controlado completamente. Los anticuerpos monoclonales y los fragmentos de los mismos de origen natural quedan por tanto fuera del alcance del término “sintético” tal como se usa en la presente memoria. El BTM preferiblemente es de naturaleza no proteica, es decir no comprende una proteína.

50 El peso molecular del BTM es preferiblemente de hasta 10.000 Daltons. Más preferiblemente, el peso molecular está en el rango de 200 a 9.000 Daltons, lo más preferiblemente de 300 a 8.000 Daltons, siendo especialmente preferible de 400 a 6.000 Daltons. Cuando el BTM no es un péptido, el peso molecular del BTM es preferiblemente de hasta 3.000 Daltons, más preferiblemente de 200 a 2.500 Daltons, lo más preferiblemente de 300 a 2.000 Daltons, siendo especialmente preferible de 400 a 1.500 Daltons.

El resto diana biológico comprende: un péptido, análogo de péptido, peptoide o mimético de péptido de 3-80 unidades, que puede ser un péptido lineal o cíclico o combinaciones de los mismos; un aminoácido individual; un sustrato enzimático, antagonista de enzima, agonista de enzima (que incluye agonista parcial) o inhibidor enzimático; un compuesto de unión a receptor (que incluye un sustrato receptor, un antagonista, un agonista o un sustrato); oligonucleótidos, o fragmentos de oligo-ADN u oligo-ARN.

Con el término "péptido" se pretende indicar un compuesto que comprende dos o más aminoácidos, tal como se define más adelante, ligado mediante un enlace peptídico (es decir, un enlace de amida que une la amina de un aminoácido con el carboxilo de otro). El término "mimético de péptido" o "mimético" se refiere a compuestos biológicamente activos que imitan la actividad biológica de un péptido o una proteína, pero que no ya no presentan naturaleza química peptídica, es decir, ya no contienen ningún enlace peptídico (es decir, enlaces de amida entre aminoácidos). Aquí, el término mimético de péptido se usa en un sentido más amplio para incluir moléculas que ya no son de naturaleza completamente peptídica, tales como pseudo-péptidos, semi-péptidos y peptoides. El término "análogo de péptido" se refiere a péptidos que comprende uno o más análogos de aminoácido, tal como se describe más adelante. Véase también *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, M. Goodman *et al*, Houben-Weyl Vol. E22c en "Methods in Organic Chemistry", Thieme (2004).

Con el término "aminoácido" se pretende indicar un amino ácido *L* o *D*, un análogo de aminoácido (p.ej., naftilalanina) o un mimético de aminoácido que pueda existir de forma natural o que sea de origen puramente sintético, y opcionalmente puede ser puro, es decir, un único enantiómero y por tanto quiral, o una mezcla de enantiómeros. En la presente memoria se usan las abreviaturas convencionales de 3 letras o de una sola letra para los aminoácidos. Preferiblemente, los aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros. Con el término "mimético de aminoácido" se pretenden indicar análogos sintéticos de aminoácidos naturales que son isoésteres, es decir, que han sido diseñados para imitar la estructura estérica y electrónica del compuesto natural. Dichos isoésteres son bien conocidos para los especialistas en la técnica e incluyen depsi-péptidos, retro-inverso péptidos, tioamidas, cicloalcanos o tetrazoles 1,5-disustituidos [véase M. Goodman, *Biopolymers*, 24, 137, (1985)]. Se sabe que los aminoácidos radiomarcados tales como tirosina, histidina, metionina o prolina son útiles como agentes en la obtención de imágenes *in vivo*.

Cuando el BTM es un sustrato enzimático, un antagonista de enzima, un agonista de enzima, un inhibidor enzimático o un compuesto de unión a receptor, preferiblemente es un no péptido, y más preferiblemente es sintético. Con el término "no péptido" se pretende indicar un compuesto que no comprende ningún enlace peptídico, es decir, un enlace amida entre dos residuos de aminoácido. Los sustratos, antagonistas, agonistas o inhibidores enzimáticos adecuados incluyen glucosa y análogos de glucosa tales como fluorodesoxiglucosa; ácidos grasos, o elastasa, Angiotensina II o inhibidores de metaloproteinasa. Un no péptido preferido de tipo antagonista Angiotensina II es Losartan. Los compuestos de unión a receptor sintéticos adecuados incluyen estradiol, estrógeno, progestina, progesterona y otras hormonas esteroideas; ligandos para el receptor de dopamina D-1 o D-2, o transportadores de dopamina tales como tropanos; y ligandos para el receptor de serotonina.

Cuando el BTM es un péptido, preferiblemente es un péptido de 4-30 unidades, y lo más preferiblemente un péptido de 5 a 28 unidades.

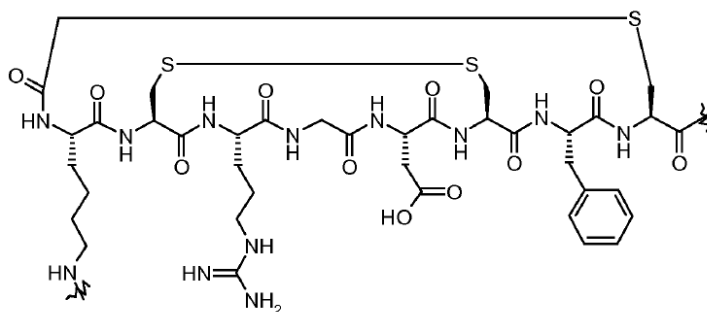
Cuando el BTM es un sustrato enzimático, un antagonista de enzima, un agonista de enzima o un inhibidor enzimático, dichas moléculas diana biológicas preferidas de la presente invención son moléculas pequeñas de tipo fármaco, sintéticas, es decir, moléculas farmacéuticas. Los ligandos transportadores de dopamina preferidos son tropanos; ácidos grasos; ligandos de receptor de dopamina D-2; benzamidas; anfetaminas; bencilguanidinas, iomazenil, benzofurano (IBF) o ácido hipúrico. Los derivados de tropano son ¹²³I-CIT (DopascanTM), ¹²³I-CIT-FP (DaTSCANTM) y el isómero E de ¹²³I-2β-carbometoxi-3 β-(4-fluorofenil)-N-(1-yodoprop-1-en-3-il)nortropano (AltropaneTM). El DopascanTM y el DaTSCANTM son especialmente preferidos. Éstos y otros agentes de tropano se describen en Morgan y Nowotnik [*Drug News Perspect.*, 12(3), 137-145 (1999)]. Los ácidos grasos preferidos son ¹²³I-BMIPP y ¹²³I-IPPA. Los derivados de anfetamina preferidos son ¹²³I-IMP. Una bencilguanidina preferida es *meta*-yodobencilguanidina (MIBG), es decir ¹²³I-MIBG.

Cuando el BTM es un péptido, dichos péptidos preferidos incluyen:

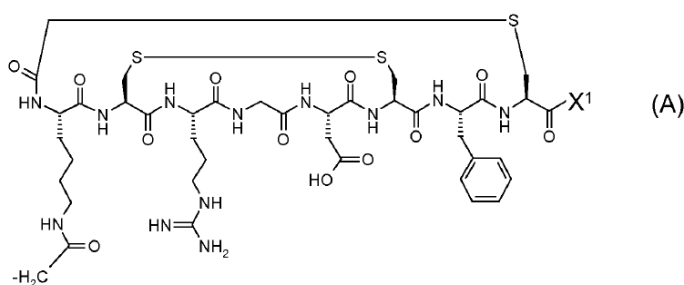
- somatostatina, octreotide y análogos,
- péptidos que se unen al receptor ST, en donde ST se refiere a la toxina termoestable producida por *E. coli* y otros microorganismos;
- bombesina;
- péptido intestinal vasoactivo;
- neurotensina;
- fragmentos de laminina, p.ej., YIGSR, PDSGR, IKVAV, LRE y KCQAGTFALRGDPQG,

- péptidos quimiotácticos de N-formilo para atacar sitios de acumulación de leucocitos,
 - factor plaquetario 4 (PF4) y fragmentos del mismo,
 - péptidos que contienen RGD (Arg-Gly-Asp), que pueden, p. ej., estar dirigidos a angiogénesis [R. Pasqualini *et al.*, Nat. Biotechnol. 1997 Jun; 15(6): 542-6]; [E. Ruoslahti, Kidney Int. 1997 May; 51(5): 1413-7].
- 5
- fragmentos de péptido de α_2 -antiplasmina, fibronectina o beta-caseína, fibrinógeno o trombospondina. Las secuencias de aminoácido de α_2 -antiplasmina, fibronectina, beta-caseína, fibrinógeno y trombospondina pueden encontrarse en las siguientes referencias: precursor de α_2 -antiplasmina [M. Tone *et al.*, J. Biochem, 102, 1033, (1987)]; beta-caseína [L. Hansson *et al.*, Gene, 139, 193, (1994)]; fibronectina [A. Gutman *et al.*, FEBS Lett., 207, 145, (1996)]; precursor de trombospondina-1 [V. Dixit *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83, 5449, (1986)]; R. F. Doolittle, Ann. Rev. Biochem., 53, 195, (1984);
- 10
- péptidos que son sustratos o inhibidores de angiotensina, tales como:
 - angiotensina II Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (E. C. Jorgensen *et al.*, J. Med. Chem., 1979, Vol. 22, 9, 1038-1044)
 - [Sar, Ile] Angiotensina II: Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile (R.K. Turker *et al.*, Science, 1972, 177, 1203).
- 15
- Angiotensina I: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu.

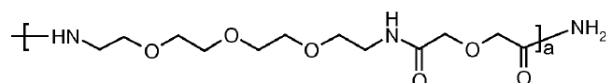
Los péptidos BTM preferidos son péptidos RGD. Un péptido RGD de este tipo más preferido comprende el fragmento:



- 20 El péptido RGD de este tipo más preferido es cuando el BTM es un péptido de fórmula (A):



en donde X1 es -NH₂ o



en donde a es un número entero entre 1 y 10.

- 25 En la Fórmula A, a es preferiblemente 1.

Cuando el BTM es un péptido, uno o ambos extremos del péptido, preferiblemente ambos, llevan conjugado un grupo inhibidor de metabolismo (M^G). El hecho de tener ambos extremos del péptido protegidos de este modo es importante para las aplicaciones de obtención de imágenes *in vivo*, ya que de otro modo sería de esperar un metabolismo rápido con la consiguiente pérdida de afinidad de unión selectiva por el péptido BTM. Con el término "grupo inhibidor de metabolismo" (M^G) se pretende indicar un grupo biocompatible que inhibe o suprime el

30

metabolismo por parte de una enzima, especialmente una peptidasa tal como la carboxipeptidasa, del péptido BTM en su extremo amino o en su extremo carboxi. Dichos grupos son particularmente importantes para aplicaciones *in vivo*, y son bien conocidos por los especialistas en la técnica y son elegidos de forma adecuada entre, para el extremo amino del péptido:

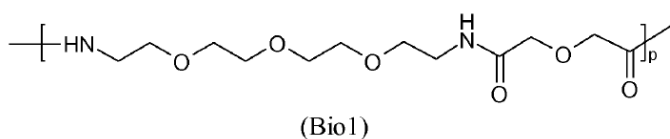
- 5 Grupos N-acilados -NH(C=O)R^G en donde el grupo acilo -(C=O)R^G tiene un R^G elegido entre: grupos alquilo C_{1-6} , arilo C_{3-10} o comprende una unidad de construcción de polietilenglicol (PEG). Más adelante se describen grupos PEG adecuados para el grupo ligando (L^1). Dichos grupos PEG preferidos son los biomodificadores de las Fórmulas Bio1 o Bio2 (ver más adelante). Los grupos M^G de extremo amino preferidos son acetilo, benciloxycarbonilo o trifluoroacetilo, lo más preferiblemente acetilo.

- 10 Los grupos inhibidores de metabolismo adecuados para el extremo carboxilo del péptido incluyen:

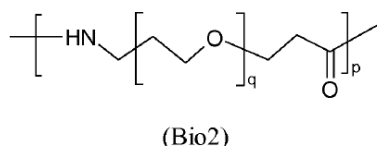
Carboxamida, *tert*-butil éster, bencil éster, ciclohexil éster, amino alcohol o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG). Un grupo M^G adecuado para el residuo de aminoácido carboxi terminal del péptido BTM es aquel en el que la amina terminal del residuo de aminoácido está *N*-alquilada con un grupo alquilo C_{1-4} , preferiblemente un grupo metilo. Los grupos M^G preferidos son carboxamida o PEG, los más preferidos son carboxamida.

- 15 En el método del primer aspecto, el grupo ligando L^1 preferiblemente está ausente. Los grupos ligando L^2 y L^3 son opcionales, pero preferiblemente están ausentes. Cuando el grupo ligando comprende un grupo heteroarileno C_{3-12} , los heteroátomos se eligen de forma adecuada entre N, O y S; preferiblemente N y O.

- 20 Cuando L^1 comprende una cadena peptídica de 1 a 10 residuos de aminoácido, los residuos de aminoácido se eligen preferiblemente entre glicina, lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico o serina. Cuando L^1 comprende un resto PEG, preferiblemente comprende unidades derivadas de la oligomerización de las estructuras monodispersas de tipo PEG de las Fórmulas Bio1 o Bio2:



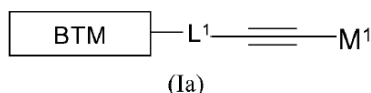
- 25 Ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de Fórmula Bio1 en donde p es un número entero entre 1 y 10. Alternativamente, se puede usar una estructura de tipo PEG basada en un derivado de ácido propiónico de Fórmula Bio2:



donde p es tal como se define en la Fórmula Bio1 y q es un número entero entre 3 y 15. En la Fórmula Bio2, p es preferiblemente 1 ó 2, y q es preferiblemente de 5 a 12.

- 30 Cuando el grupo ligando no comprende PEG o una cadena peptídica, los grupos L^1 preferidos presentan una cadena principal de átomos unidos que constituyen el resto -(A)_m - de 2 a 10 átomos, los más preferiblemente de 2 a 5 átomos, siendo especialmente preferido 2 ó 3 átomos. Los péptidos BTM que no se encuentran disponibles comercialmente pueden sintetizarse mediante síntesis en fase sólida tal como se describe en P. Lloyd-Williams, F. Albericio y E. Girald; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, 1997.

- 35 En el método del primer aspecto, el compuesto de Fórmula (I) se genera mediante desprotección de un compuesto de Fórmula (Ia):



en donde M^1 es un grupo protector de alquino.

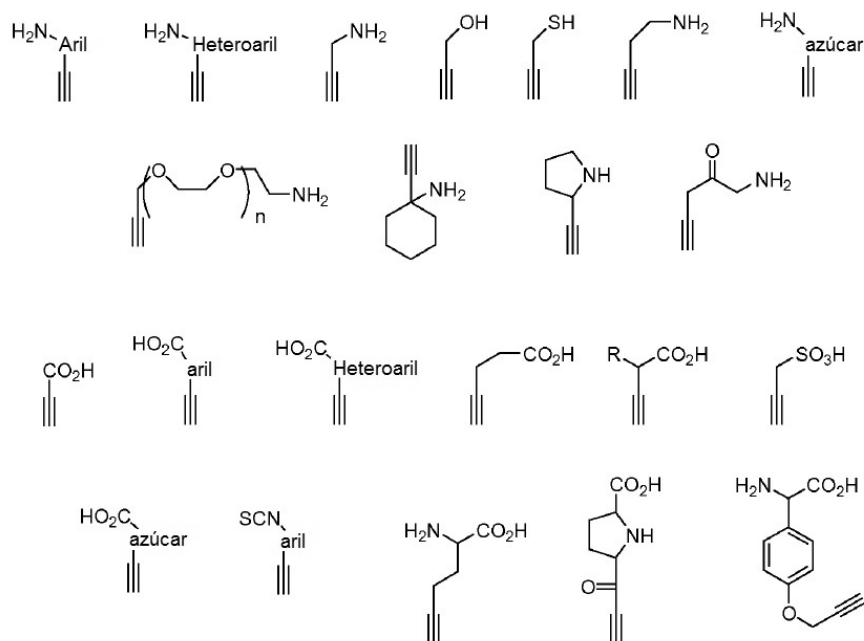
- 40 Los aspectos preferidos de L^1 en la Fórmula (Ia), son como se describe en la Fórmula (I).

El método de la presente invención tolera un amplio rango de grupos funcionales en el BTM. Sin embargo, cuando el BTM comprende grupos tiol libres (p.ej., un péptido de que contiene cisteína reducida), siendo dichos grupos tiol preferiblemente protegidos antes de que se lleve a cabo la reacción del primer aspecto. De forma similar, cualesquier funcionalidades o grupos quelantes que se coordinen bien con cobre(I) pueden requerir protección.

5 Mediante el término “grupo protector” se pretende indicar un grupo que inhibe o suprime reacciones químicas no deseadas, pero que está diseñado para ser suficientemente reactivo como para ser escindido del grupo funcional en cuestión en condiciones suficientemente suaves para que no se modifique el resto de la molécula. Tras la desprotección se obtiene el producto deseado. Los grupos protectores adecuados se describen en “Protective Groups in Organic Synthesis”, Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, 4ª edición (John Wiley & Sons, 2007). Los grupos protectores de alquino se describen en el Capítulo 8, páginas 927-933, e incluyen: un grupo trialkylsilylo en el que cada grupo alquilo es de forma independiente alquilo C₁₋₄; un grupo arildialkylsilylo en el que el grupo arilo es preferiblemente bencilo o bifenilo y los grupos alquilo son cada uno de forma independiente alquilo C₁₋₄; hidrometil o 2-(2-hidroxipropil). Un grupo protector de alquino preferido es trimethylsilylo. Los alquinos protegidos de Fórmula (Ia) presentan la ventaja de que el alquino deseado de Fórmula (I) puede generarse de un modo controlado, de tal modo que se puede maximizar la eficiencia de la reacción de cicloadición click con el compuesto de Fórmula (IIa) o (IIb). El método de radioyodación click del primer aspecto puede efectuarse en un disolvente adecuado, por ejemplo acetonitrilo, un alcohol alquílico C₁₋₄, dimetilformamida, tetrahidrofurano o dimetilsulfóxido, o mezclas acuosas de cualquiera de los mismos, o en agua. Se pueden usar tampones acuosos en el rango de pH de 4-8, más preferiblemente 5-7. La temperatura de reacción preferiblemente es de 5 a 100°C, más preferiblemente de 75 a 85°C, lo más preferiblemente temperatura ambiente (típicamente 15-37°C). La cicloadición click puede llevarse a cabo opcionalmente en presencia de una base orgánica, tal como se describe en Meldal y Tornøe [Chem. Rev. 108, 2952, Tabla 1 (2008)].

Un catalizador de cicloadición click preferido comprende Cu(I). El catalizador de Cu(I) está presente en una cantidad suficiente para que la reacción progrese, típicamente en una cantidad catalítica o en exceso, tal como 0,02 a 1,5 equivalentes molares respecto al compuesto de Fórmula (IIa) o (IIb). Los catalizadores de Cu(I) adecuados incluyen sales de Cu(I) tales como CuI o [Cu(NCCH₃)₄][PF₆], pero de forma ventajosa se pueden usar sales de Cu(II) tales como sulfato de cobre (II) en presencia de un agente reductor para generar Cu(I) *in situ*. Los agentes reductores adecuados incluyen: ácido ascórbico o una sal del mismo, por ejemplo, ascorbato sódico, hidroquinona, cobre metálico, glutatióna, cisteína, Fe²⁺ o Co²⁺. El Cu(I) también está intrínsecamente presente sobre la superficie de las partículas de cobre elemental, por tanto también se puede usar como catalizador cobre elemental, por ejemplo en forma de polvo o gránulos. El cobre elemental, con un tamaño de partícula controlado es una fuente preferida del catalizador de Cu(I). Un catalizador de este tipo más preferido es el cobre elemental en forma de polvo de cobre, que presente un tamaño de partícula en el rango de 0,001 a 1 mm, preferiblemente de 0,1 mm a 0,7 mm, más preferiblemente de aproximadamente 0,4 mm. Alternativamente, se puede usar cable de cobre bobinado con un diámetro en el rango de 0,01 a 1,0 mm, preferiblemente de 0,05 a 0,5 mm, y más preferiblemente con un diámetro de 0,1 mm. El catalizador de Cu(I) puede usarse opcionalmente en presencia de batofenantrolina, que se usa para estabilizar Cu(I) en la química click.

Los compuestos precursores no radioactivos de Fórmula (I), en los que el BTM es un péptido o una proteína, pueden prepararse mediante métodos estándar de síntesis de péptidos, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida, por ejemplo, tal como describen Atherton, E. y Sheppard, R.C.; “Solid Phase Synthesis”; IRL Press: Oxford, 1989. La incorporación del grupo alquino en un compuesto de Fórmula (Ia) o (Ib) puede lograrse mediante reacción del extremo N o C del péptido o con algún otro grupo funcional contenido dentro de la secuencia de péptidos, cuya modificación no afecta a las características de unión del vector. El grupo alquino preferiblemente es introducido mediante la formación de un enlace de amida estable, por ejemplo formado mediante reacción de una función amino del péptido con un ácido activado, o alternativamente mediante reacción de una función ácido del péptido con una función amino e introducido durante o después de la síntesis del péptido. Los métodos de incorporación de un grupo alquino en vectores tales como células, virus, bacterias pueden encontrarse en H.C. Kolb y K.B. Sharpless, Drug Discovery Today, Vol. 8 (24), 1128, diciembre de 2003, y en las referencias incluidas en la misma. Los intermedios bifuncionales adecuados útiles para incorporación del grupo alquino en un compuesto de Fórmula (I) incluyen:

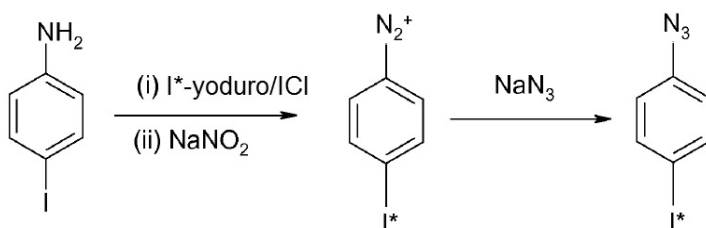


donde L^1 y las realizaciones preferidas del mismo son como se ha definido anteriormente.

En las anteriores fórmulas, L^1 está presente de forma adecuada. En el aminoácido funcionalizado con azida, sin embargo, el grupo funcional azida puede estar unido opcionalmente de forma directa a la cadena lateral del aminoácido sin ningún grupo ligando. Los precursores de alquino de este tipo se describen en Glaser y Arstad [Bioconj. Chem., 18, 989-993 (2007)]. Los mismos autores también describen métodos para introducir grupos alquinos en péptidos.

Otras estrategias para funcionalizar BTMs con grupos alquino se describen en Nwe *et al* [Cancer Biother. Radiopharm., 24(3), 289-302 (2009)]. Smith *et al* proporcionan la síntesis de precursores de isatina funcionalizados con alquinos, donde el compuesto de isatina es específico para caspasa-3 o caspasa-7 [J. Med. Chem., 51(24), 8057-8067 (2008)]. De Graaf *et al* [Bioconj. Chem., 20(7), 1281-1295 (2009)] describen aminoácidos no naturales que tienen cadenas laterales de alquino y su incorporación específica de sitio en péptidos o proteínas para su posterior conjugación click. El Ejemplo 7 (incluido a continuación) proporciona una alquino-maleimida bifuncional, que puede usarse para conjugarse con el grupo tiol de un BTM que contiene un tiol para introducir un grupo alquino adecuado para una posterior cicloadición click.

Las azidas radioyodadas de Fórmula (IIa) pueden sintetizarse mediante el método de Bercovici *et al* [Biochemistry, 17(8), 1484-1489 (1978)]. Se puede obtener 1-Azido-4- 125 Iyodobenceno (es decir, Y^1 es un grupo 1,4-fenileno) mediante el método de Booth *et al* (para $I^* = ^{125}I$) como se indica a continuación [Biochem. J., 179, 397-405 (1979)]:



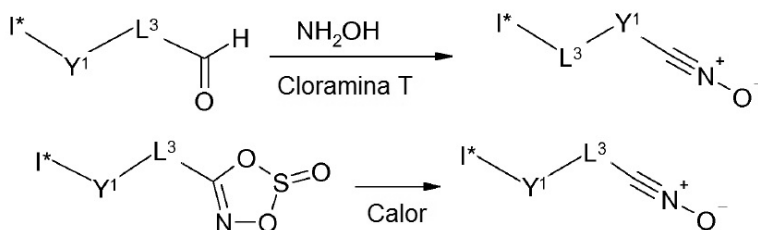
Una opción adicional es partir de anilina, y radioyodarla directamente (ya que la posición *para* es la más activada), usando una sustitución electrofílica y un oxidante adecuado. La anilina puede ser yodada de este modo, seguido de diazotización para producir el intermedio de diazonio mostrado antes. Alternativamente, se podría usar un precursor de trialkiltina para asegurar la regioespecificidad.

Los óxidos de nitrilo de Fórmula (IIb) pueden obtenerse mediante los métodos descritos por Ku *et al* [Org. Lett., 3(26), 4185-4187 (2001)], y las referencias incluidas en la misma. De esta manera, se generan típicamente *in situ* mediante tratamiento de una aldoxima alfa-halo con una base orgánica tal como trietilamina. Un método preferido de generación, así como las condiciones de la posterior ciclación click al isoxazol deseado se describen en Hansen *et al* [J. Org. Chem., 70(19), 7761-7764 (2005)]. Hansen *et al* generan la aldoxima alfa-halo deseada *in situ* mediante reacción del correspondiente aldehído con trihidrato de cloramina-T, y a continuación desclorando el mismo con hidróxido sódico. La correspondientes aldoxima se prepara haciendo reaccionar el correspondiente aldehído con

hidrocloruro de hidroxilamina a pH 9-10. Véase también K.B.G. Torsell "Nitrile Oxides, Nitrones and Nitronates in Organic Synthesis" [VCH, Nueva York (1988)].

Debido a la inestabilidad del grupo de óxido de nitrilo, éstos se introducen mayoritariamente de forma adecuada en un compuesto de Fórmula (IIa) *in situ*, por ejemplo a partir del correspondiente aldehído u óxido de nitrilo enmascarado, tal como un éster de sulfito cíclico.

5

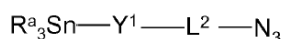


En una realización, se proporciona un compuesto de Fórmula (IIa) en donde Y¹ es 1,4-fenileno; siendo preparado dicho compuesto fácilmente según el Ejemplo 1 (ver más adelante).

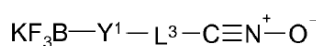
Los compuestos de Fórmula (IIa) o (IIb) se generan preferiblemente a partir de precursores no radioactivos como se indica a continuación:

10

hacer reaccionar un precursor de Fórmula (IVa) o de Fórmula (IVb) respectivamente:



(IVa)



(IVb)

en donde Y¹, L² y L³ y las realizaciones preferidas de los mismos son como se ha definido anteriormente, y cada R^a es de forma independiente alquilo C₁₋₄;

con un suministro de ion yoduro radioactivo en presencia de un agente oxidante, para proporcionar el compuesto de Fórmula (IIa) o (IIb), respectivamente.

15

El precursor de Fórmula (IVa) o (IVb) no es radioactivo. Los intermedios de organoestaño se describen en Ali *et al* [Synthesis, 423-445 (1996)]. Los agentes oxidantes adecuados se describen en Bolton [J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002)]. Los agentes oxidantes preferidos son el ácido peracético a pH de aproximadamente 4, y peróxido de hidrógeno/HCl en agua a pH de aproximadamente 1. La síntesis de los precursores de alquilnitrilfluoroborato de potasio se describe en Kabalka *et al* [J. Lab. Comp. Radiopharm., 48, 359-362 (2005)] y J. Lab. Comp. Radiopharm., 49, 11-15 (2006)]. Se considera que los precursores de alquilnitrilfluoroborato de potasio son sólidos cristalinos, estables tanto en aire como en agua.

20

La presente invención proporciona una estrategia más quimioselectiva para la radioyodación. La reacción de ligación se produce en un sitio predeterminado del BTM, dando lugar solo a un posible producto. Por lo tanto, esta metodología es quimioselectiva. Adicionalmente, las funcionalidades alquino y azida son estables en la mayoría de las condiciones de reacción y no reaccionan con las funcionalidades más habituales de los péptidos – minimizando de esta manera las etapas de protección y desprotección requeridas durante la síntesis de radiomarcaje. Además, los anillos de triazol e isoxazol formados durante la reacción de marcaje no se hidrolizan y son altamente estables frente a la oxidación y la reducción, lo que significa que el BTM marcado tiene una elevada estabilidad *in vivo*. El anillo de triazol también es comparable a una amida en tamaño y polaridad, de tal modo que los péptido o proteínas marcados son buenos sustitutos de sus contrapartidas naturales – el anillo de triazol en particular es un conocido grupo mimético de amidas o bioisótero.

25

30

El método del primer aspecto se lleva a cabo de forma preferible de una manera aséptica, de tal modo que el producto de Fórmula (IIIa) o (IIIb) se obtiene como una composición radiofarmacéutica. A continuación se proporciona una descripción más detallada de la composición radiofarmacéutica.

35

Por tanto, el método se lleva a cabo en condiciones de fabricación asépticas para producir el producto radiofarmacéutico estéril, no pirogénico, deseado. Por lo tanto, es preferible que los componentes clave, especialmente cualquier parte del sistema que entre en contacto con el producto de Fórmula (IIIa) o (IIIb) (p.ej., viales y tubos de transferencia) estén esterilizados. Los componentes y reactivos pueden esterilizarse empleando métodos conocidos en la técnica, que incluyen esterilización por filtración, esterilización terminal usando, p.ej., radiación gamma, autoclavado, calor seco o tratamiento químico (p.ej., con óxido de etileno). Es preferible esterilizar a los componentes no radioactivos por adelantado, de tal modo que haya realizar el mínimo número posible de manipulaciones necesarias con el producto radiofarmacéutico radioyodado. Sin embargo, como precaución, es preferible incluir al menos una etapa de esterilización por filtración final.

40

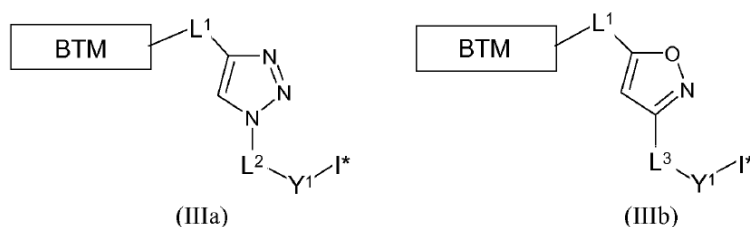
45

Los compuestos de Fórmulas (I), (IIa) y/o (IIb), más el catalizador de cicloadición click y otros reactivos y disolventes similares, son suministrados todos en viales o recipientes adecuados que comprende un recipiente sellado que permite el mantenimiento de la integridad estéril y/o la seguridad radioactiva, más opcionalmente un gas de espacio de cabeza inerte (p.ej., nitrógeno o argón), a la vez que permita la adición o la extracción de disoluciones mediante jeringa o cánula. Un recipiente preferido de este tipo es un vial sellado con septum, en donde el cierre hermético es ajustado con reborde (típicamente de aluminio). El cierre es adecuado para una punción individual o múltiple con una aguja hipodérmica (p.ej., un cierre sellado de septum ajustado con pinza) a la vez que mantiene la integridad de la esterilización. Dichos recipientes presentan la ventaja adicional de que el cierre puede soportar vacío si se desea (p.ej., para cambiar el gas del espacio de cabeza o para desgasificar las disoluciones), y soportar cambios de presión tales como reducciones de la presión sin permitir la entrada de gases atmosféricos externos, tales como oxígeno o vapor de agua. El recipiente de reacción se elige de forma adecuada entre tales recipientes, y las realizaciones preferidas de los mismos. El recipiente de reacción se fabrica preferiblemente de un plástico biocompatible (p.ej., PEEK).

El método del primer aspecto se lleva a cabo preferiblemente usando un aparato sintetizador automatizado. Con el término "sintetizador automatizado" se pretende indicar un módulo automatizado basado en el principio de las operaciones unitarias tal como se describe en Satyamurthy *et al* [Clin. Positr. Imag., 2(5), 233-253 (1999)]. El término "operaciones unitarias" significa que procesos complejos se reducen a una serie de operaciones o reacciones simples, que pueden aplicarse a un rango de materiales. Dichos sintetizadores automatizados son preferidos para el método de la presente invención, especialmente cuando se desea un producto radiofarmacéutico. Están disponibles comercialmente a partir de una serie de suministradores [Satyamurthy *et al*, ver anterior], 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.).

Los sintetizadores comerciales automatizados también proporcionan recipientes adecuados para el residuo radioactivos líquido generado como resultado de la preparación radiofarmacéutica. Los sintetizadores automatizados no se proporcionan típicamente con protección frente a la radiación, ya que están diseñados para ser empleados en una célula de trabajo radioactiva configurada de forma adecuada. La célula de trabajo radioactiva proporciona una protección adecuada frente a la radiación para proteger al operario de una potencial dosis de radiación, así como ventilación para eliminar vapores químicos y/o radioactivos. El sintetizador automatizado comprende preferiblemente una "casete" tal como se describe más adelante.

En la presente memoria también se describe un compuesto de Fórmula (IIIa) o (IIIb):



en donde: L₁, L₂, L₃, Y₁, BTM e I* que incluyen aspectos preferidos de los mismos son tal como se ha definido en el primer aspecto (ver antes).

En los compuestos de Fórmula (IIIa) y (IIIb), los grupos ligando (L₂ y L₃, respectivamente) preferiblemente están ausentes. En la presente memoria también se describe un compuesto de Fórmula (IIIa) o (IIIb), como los descritos antes, para uso médico – preferiblemente el compuesto de Fórmula (IIIa).

En la presente memoria también se describe un compuesto de Fórmula (IIaa) o (IIbb), útiles en el método del primer aspecto:



en donde I* e Y¹, que incluyen los aspectos preferidos de los mismos, son tal como se han definido antes. Los compuestos de Fórmula (IIaa) o (IIbb) pueden suministrarse preferiblemente como composiciones farmacéuticas, junto con un medio vehículo biocompatible. Dichas composiciones, que incluyen los aspectos preferidos de las mismas, son como se describe a continuación.

En la presente memoria también se describe una composición radiofarmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (IIIa) o (IIIb) junto con un medio vehículo biocompatible. Las realizaciones preferidas de I*, L¹ y BTM son como se han definido en el primer aspecto (ver antes). El compuesto del tercer aspecto también es preferiblemente un triazol de Fórmula (IIIa).

El “medio vehículo biocompatible” comprende uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente es un fluido, especialmente un líquido, en el que se suspende o se disuelve el compuesto de Fórmula (IIIa) o (IIIb), de tal modo que la composición es fisiológicamente tolerable, es decir, puede administrarse al cuerpo del mamífero sin toxicidad o molestias indebidas. El medio vehículo biocompatible es de forma adecuada un líquido vehículo inyectable tal como agua esterilizada libre de pirógenos para inyección; una disolución acuosa tal como salino (que de forma ventajosa puede prepararse de tal modo que el producto final sea isotónico o no hipotónico); una disolución acuosa de una o más sustancias de ajuste de la tonicidad (p.ej., sales de cationes de plasma con contraiones biocompatibles), azúcares (p.ej., glucosa o sacarosa), alcoholes de azúcar (p.ej., sorbitol o manitol), glicoles (p.ej., glicerol) u otros materiales de poliol no iónicos (p.ej., polietilen glicoles o polipropilén glicoles). El medio vehículo biocompatible también puede comprender disolventes orgánicos biocompatibles tales como etanol. Dichos disolventes orgánicos son útiles para solubilizar más compuestos o formulaciones lipofílicas. Preferiblemente, el medio vehículo biocompatible es agua libre de pirógenos para inyección, salino isotónico o una disolución de etanol en agua. El pH del medio vehículo biocompatible para inyección intravenosa de forma adecuada está en el rango de 4,0 a 10,5.

En la presente memoria también se describe el uso de un compuesto de Fórmula (IIIa) o de Fórmula (IIIb), preferiblemente de Fórmula (IIIa), para la fabricación de un radiofármaco para uso en un método de obtención de imágenes *in vivo* o de radioterapia *in vivo*. Preferiblemente, el uso es en un método de obtención de imágenes *in vivo*, más preferiblemente del cuerpo de mamífero intacto (especialmente de un humano), de la forma más preferible tal como la obtención de imágenes mediante PET o SPECT.

En la presente memoria también se describe el uso de un aparato sintetizador automatizado para llevar a cabo el método del primer aspecto.

El aparato sintetizador automatizado y las realizaciones preferidas del mismo son tal como se ha descrito en el primer aspecto (ver antes).

En la presente memoria también se describe una casete esterilizada de uso individual adecuada para utilización en el sintetizador automatizado de la realización preferida de los primeros aspectos, comprendiendo dicha casete los reactivos no radioactivos necesarios para llevar a cabo el método del primer aspecto en forma esterilizada apirogénica.

Con el término “casete” se pretende indicar una pieza de aparato diseñada para ser ajustada de forma desmontable 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 la operación de la casete desde el exterior de la casete, es decir externamente. Las casetes adecuadas comprenden un sistema lineal de válvulas, ligada cada una de ellas a un puerto en el que se pueden unir los reactivos o viales, por punción con aguja de un vial sellado con septum invertido, o mediante juntas de unión herméticas. Cada válvula presenta una unión macho-hembra que sirve de interfaz con un brazo móvil correspondiente del sintetizador automatizado. La rotación externa del brazo controla de esta manera la apertura o el cierre de la válvula cuando la casete está unida al sintetizador automatizado. Otras partes móviles adicionales del sintetizador automatizado están diseñadas para engancharse a los extremos del émbolo de las jeringas, y de esta manera elevan o bajan los émbolos de la jeringa.

La casete es versátil, presentando de forma típica varias posiciones en las que se pueden unir los reactivos, y varias adecuadas para la unión de viales de jeringa de reactivos o de cartuchos de cromatografía (p.ej., SPE). La casete siempre comprende un recipiente de reacción. Dichos recipientes de reacción preferiblemente tienen de 1 a 10 cm³, lo más preferiblemente de 2 a 5 cm³ de volumen y están configurados de tal modo que se conectan a ellos 3 ó más puertos de la casete, para permitir la transferencia de reactivos o disolventes desde varios puertos de la casete. Preferiblemente, la casete tiene de 15 a 40 válvulas en disposición lineal, lo más preferiblemente de 20 a 30, siendo especialmente preferido 25. Las válvulas de la casete preferiblemente son todas idénticas, y lo más preferiblemente son válvulas de 3-vías. Las casetes están diseñadas para ser adecuadas para fabricación radiofarmacéutica y por tanto están fabricadas a partir de materiales que son de grado farmacéutico e idealmente también son resistentes a radiolisis.

Los sintetizadores automatizados preferidos son aquellos que comprenden una casete de uso individual o desechable que comprende todos los reactivos, recipientes de reacción y aparatos necesarios para llevar a cabo la preparación de un lote dado de radiofármaco radioyodado. La casete significa que el sintetizador automatizado tiene la flexibilidad de ser capaz de preparar una variedad de diferentes radiofármacos marcados con radioyodo con riesgos mínimos de contaminación cruzada, simplemente cambiando la casete. La estrategia de casetes también presenta las ventajas de: instalación simplificada y por tanto riesgo reducido de error de operario; aceptación mejorada de GMP (práctica de buena fabricación, del inglés “Good Manufacturing Practice”); capacidad multi-trazadora; cambio rápido entre lotes de producción; comprobación diagnóstica automatizada previa de la casete y los reactivos; comprobación cruzada automatizada por código de barras de reactivos químicos respecto a la síntesis a llevar a cabo; trazabilidad de reactivos; uso individual y por tanto ausencia de riesgo de contaminación cruzada, manipulación y resistencia por abuso.

En la presente memoria también se describe un método para generar una imagen de un cuerpo animal o humano que comprende la administración de un compuesto o de una composición radiofarmacéutica tal como se ha descrito anteriormente, y generar una imagen de al menos una parte de dicho cuerpo en la cual se ha distribuido dicho compuesto o composición usando PET o SPECT.

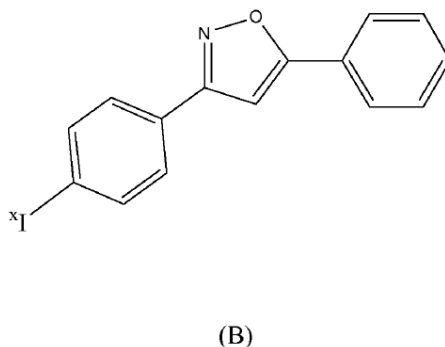
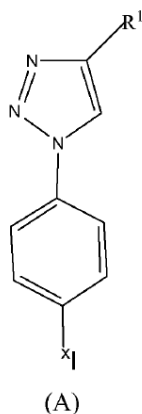
- 5 En la presente memoria también se describe un método para monitorizar el efecto del tratamiento de un cuerpo humano o animal con un fármaco, comprendiendo dicho método la administración a dicho cuerpo de un compuesto o una composición como se ha descrito anteriormente y la detección de la captación de dicho compuesto o composición en al menos una parte de dicho cuerpo, en el cual se ha distribuido dicho compuesto o composición, usando PET o SPECT.
- 10 La administración y la detección de este último aspecto preferiblemente se efectúan antes y después del tratamiento con dicho fármaco, de tal modo que se pueda determinar el efecto del tratamiento con fármaco del paciente humano o animal. Cuando el tratamiento con fármaco implica un curso de terapia, la obtención de imágenes solo se puede llevar a cabo durante el tratamiento.

- La invención se ilustra a través de los siguientes Ejemplos. El Ejemplo 1 proporciona la síntesis de muestras auténticas de los análogos de triazol yodado (isótopo de yodo ^{127}I) no radioactivos, Compuesto 1 y Compuesto 2. El Ejemplo 2 proporciona la síntesis de ^{123}I -4-yodofenil azida, un precursor importante para la química de radiomarcaje click de la presente invención. El Ejemplo 3 proporciona la síntesis de un anillo de triazol radioyodado usando el método de cicloadición click de las presentes reivindicaciones (Compuesto 1A), usando dos catalizadores de cicloadición click alternativos. La síntesis se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, demostrando la adecuación para el marcaje de BTMs en condiciones suaves. El Ejemplo 4 proporciona una síntesis adicional que forma un anillo de triazol radioyodado (Compuesto 2A). El Ejemplo 5 proporciona la síntesis de muestras auténticas del análogo de isoxazol yodado (isótopo de yodo ^{127}I) no radioactivo Compuesto 3. El Ejemplo 6 proporciona la síntesis de un anillo de isoxazol radioyodado usando el método de cicloadición click de las presentes reivindicaciones (Compuesto 3A). El Ejemplo 7 proporciona la síntesis de una alquino-maleimida bifuncional, adecuada para la conjugación covalente con los grupos tiol de un BTM para introducir grupos alquino.
- 15
- 20
- 25

Abreviaturas

- DCM: diclorometano,
- DMF: dimetilformamida,
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución,
- 30 MeCN: acetonitrilo,
- PAA: ácido peracético,
- RCP: pureza radioquímica,
- RT: temperatura ambiente,
- t_R : tiempo de retención.

35 Compuestos de la invención



Compuesto	Fórmula	R ¹	x
1	A	-(CO(NH)bencilo	127
1A	A	-(CO(NH)bencilo	123
2	A	-fenilo	127
2A	A	-fenilo	123
3	B	no aplicable	127
3A	B	no aplicable	123

Ejemplo 1: Preparación de N-Bencil 1-(4-yodofenil)-1,2,3-triazolil-4-carboxamida (Compuesto 1) y de 1-(4-yodofenil)-4-fenil-1,2,3-triazol (Compuesto 2).

Etapa (a): Preparación de propiolato de N-hidroxisuccinimidilo.

- 5 Se trató una disolución de ácido propiónico (2,1 g, 30 mmol) y N-hidroxisuccinimida (3,45 g, 30 mmol) en 1,2-dimetoxietano (40 mL) con 1,3-diciclohexilcarbodiimida (6,19 g, 30 mmol) en 1,2-dimetoxietano (35 mL) mediante adición gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla se volvió turbia en el transcurso de la adición. Se dejó agitando la mezcla durante una noche y se retiró el sólido por filtración y el filtrado se evaporó para producir 5,1 g de un sólido marrón claro.
- 10 RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H 2,83 (4H, s, 2 x CH₂), y 3,38 (1H, s, CH).

Etapa (b): Preparación de N-bencil propinamida.

- 15 Una disolución de N-hidroxisuccinimidil propiolato (5,1 g, 30 mmol) en diclorometano (100 mL) se enfrió en un baño de hielo durante 30 minutos. Se añadió gota a gota bencilamina (2,89 g, 27 mmol, 2,95 mL) a lo largo de 2-3 minutos. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente dejando que el baño de hielo se fundiera. Durante ese tiempo se formó un precipitado en la reacción. A continuación la mezcla se agitó durante una noche. El sólido se retiró por filtración y el filtrado se evaporó para producir 5,4 g de un aceite amarillo oscuro. Se filtró aproximadamente 2,2 g de material a través de un cartucho de gel de sílice eluyendo con diclorometano. Esto dio como resultado 1,3 g (27%) de un sólido amarillo claro. El RMN de ¹H mostró que el material era consistente con el material deseado – pureza entre el 80 y el 90%.
- 20 RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ_H 2,80 (1H, s, CCH), 4,48 (2H, d, J = 2,7 Hz, CH₂), 6,19 (1H, br s, NH), y 7,33 (5H, m, 5 x ArH)

Etapa (c): Preparación de 1-(4-yodofenil)-4-fenil-1,2,3-triazol (Compuesto 2) y N-Bencil 1-(4-yodofenil)-1,2,3-triazolil-4-carboxamida (Compuesto 1).

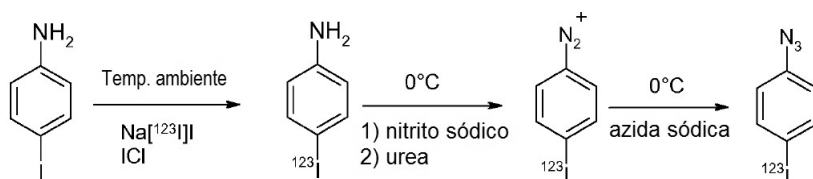
- 25 Se añadió ácido 4-yodofenil borónico (496 mg, 2 mmol) a una disolución agitada de color amarillo oscuro de sulfato de cobre (50 mg, 0,2 mmol) y azida sódica (1,56 mg, 2,4 mmol) en metanol (6 mL). La mezcla se agitó vigorosamente durante 24 horas. Con el transcurso de la reacción se disolución amarilla oscura se convirtió en una suspensión fina verde amarillenta. Se añadió agua (7 mL) lo que hizo que la mezcla se convirtiera en una suspensión lechosa verde. Ésta se dividió en dos porciones. Cada suspensión se trató con ascorbato sódico (99 mg) y una se trató con (A) N-bencil propinamida (159 mg), y la otra (B) con fenilacetileno (102 mg, 110 µL). Las dos mezclas fueron agitadas vigorosamente a temperatura ambiente durante 6 horas. Las mezclas cambiaron de suspensiones lechosas verdes a suspensiones lechosas amarillas en unos pocos minutos, y a continuación se separaron para producir sólidos en polvo suspendidos en la mezcla agua/metanol. Los sólidos fueron retirados por filtración, lavados con agua y secados a vacío durante una noche para producir los dos materiales deseados:

- 35 A) Compuesto 1 (140 mg, 35%), en forma de polvo blanquecino. RMN de ¹H (300 MHz, D₆-DMSO) 4,49 (2H, d, J = 6,4 Hz, CH₂), 7,20 – 7,35 (5H, m, CH₂C₆H₅), 7,80 (2H, d, J = 8,7 Hz, 1-(2,6-ArH)), 7,98 (2H, d, J = 8,7 Hz, 1-(3,5-ArH)), 9,26 (1H, t, J = 6,4 Hz, NH), y 9,32 (1H, s, 5-ArH).

m/z calculado para C₁₆H₁₃IN₄O 404,0; obtenido 404,5.

- 40 B) Compuesto 2 (190 mg, 55%) en forma de polvo amarillo pálido. RMN de ¹H (300 MHz, D₆-DMSO) 7,39 (1H, t, J = 7,4 Hz, 4-(4-ArH)), 7,51 (2H, t, J = 7,4 Hz, 4-(3,5-ArH)), 7,79 (2H, d, J = 8,4 Hz, 1-(2,6-ArH)), 7,94 (2H, d, J = 7,4 Hz, 4-(2,6-ArH)), 8,02 (2H, d, J = 8,4 Hz, 1-(3,5-ArH)), y 9,35 (1H, s, 5-ArH).

m/z calculado para C₁₄H₁₀IN₃ 347,0; obtenido 347,6.

Ejemplo 2: Preparación de [¹²³I]-4-yodo fenil azida

Se basa en el método de Booth *et al* [Biochem. J., **179**, 397-405 (1979)]. El reactivo de monoclorigenuro de yodo (ICI) se preparó como se indica a continuación: en 10 mL de ácido clorhídrico 1 M se disolvió cloruro sódico (1,168 g), yoduro potásico (20,8 mg) y yodato potásico (13,4 mg). A continuación se transfirió 1,0 mL de esta disolución naranja a un vial de centelleo que contenía 1,2 mL de una disolución 3,3 mM de yodato potásico (7,06 mg disueltos en 10 mL de agua), 0,9 mL de ácido clorhídrico al 37% y 3,7 mL de cloruro sódico 2M. La disolución amarilla/naranja pálida se almacenó a -4°C.

A ~5 µL de yoduro [¹²³I] sódico (137 MBq) se añadió hidróxido sódico acuoso (20 µL 0,01 M), 4-yodoanilina (100 µg, $4,6 \times 10^{-7}$ moles) disuelto en ácido clorhídrico 0,5 M (0,1 mL) y reactivo de monoclorigenuro de yodo (20 µL). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. El análisis de HPLC mostró 4-[¹²³I] yodoanilina (t_R 5 minutos, sistema A) con una RCP de >90%.

A [¹²³I]-4-yodoanilina sin purificar enfriada en un baño de hielo se añadió nitrito sódico (20 µL, $9,4 \times 10^{-7}$ moles, 1,6 mg, disueltos en 0,5 mL de agua). Después de 20 minutos se añadió urea (20 µL, $1,67 \times 10^{-6}$ moles, 2,5 mg disueltos en 0,5 mL de agua) y azida sódica (15 µL, $1,42 \times 10^{-6}$ moles, 3,12 mg disueltos en 0,5 mL de agua). Tras 10 minutos, el hielo se retiró y la disolución turbia se transfirió a un vial de centelleo. El vial de reacción se lavó con 2 x 0,5 mL de acetonitrilo y se transfirió al mismo vial de centelleo. La disolución transparente resultante se diluyó con 10 mL de agua, se cargó en un cartucho ligero tC18 (pre-tratado con 2,5 mL de MeCN y 5 mL de agua) y se eluyó en 0,6 mL de acetonitrilo para dar lugar al producto purificado, 4-[¹²³I] yodofenilazida con un rendimiento del 55% (sin corregir el decaimiento) con una RCP de >90% (HPLC, t_R 13 minutos, sistema A).

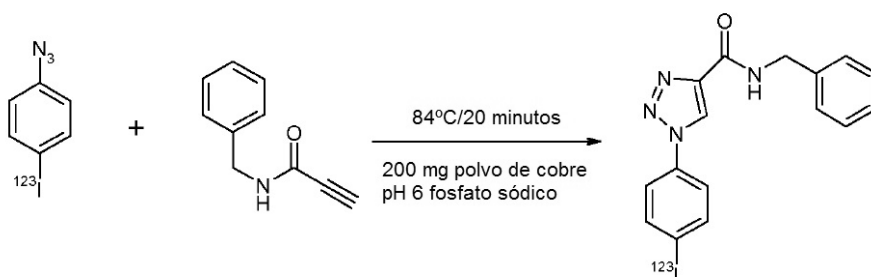
HPLC Sistema A (A = 0,1% de TFA en agua; B = 0,1% de TFA en acetonitrilo).

Columna C18 (2) phenomenex Luna, 150 x 4,6 mm, 5 micras.

Gradiente	Tiempo (minutos)	0	1	20	22	22,5	25
	% de B	50	50	95	95	50	50

Ejemplo 3: Preparación de [¹²³I]-N-Bencil 1-(4-yodofenil)-1,2,3-triazolil-4-carboxamida (Compuesto 1A).

Opción 1: con polvo de cobre.



Este método se basa en Glaser *et al* [Bioconj. Chem., **18**(3), 989-993 (2007)].

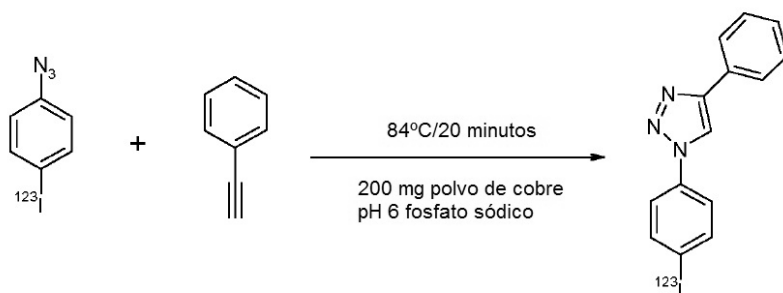
A polvo de cobre (tamaño de partícula - 40 mesh, 200 mg) en un vial Wheaton se añadió fosfato sódico (200 µL, pH 6, 50 mM), N-bencilpropinamida (1,0 mg, disuelta en 0,1 mL de DMF, $6,3 \times 10^{-6}$ moles) y 4-[¹²³I] yodofenilazida en 0,2 mL de MeCN (22 MBq). La reacción se calentó a 84°C durante 20 minutos. Tras enfriar, se analizó una muestra de 10 µL mediante HPLC que indicó el producto deseado con una RCP de 84% (HPLC t_R ~9 minutos, sistema A, Ejemplo 2). La preparación sin purificar se diluyó con 0,5 mL de TFA al 0,1% en acetonitrilo y 0,6 mL de TFA al 0,1% en agua y el producto deseado se aisló mediante HPLC (Sistema A, Ejemplo 2) con un rendimiento del 58% (sin corregir el decaimiento) con una RCP del 100%. Se observó la co-elución del producto purificado con Compuesto 1 auténtico (Ejemplo 1).

La reacción también se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, obteniéndose un rendimiento del 17%, con una RCP del 100%.

Opción 2: con sulfato de cobre(II) y ascorbato sódico.

- 5 A una disolución de sulfato de cobre (II) (50 μ L, disolución 0,045 M) en un vial Wheaton se añadió una disolución de ascorbato sódico (50 μ L, disolución 0,15 M), tampón de fosfato sódico (100 μ L, pH 6, 50 mM), N-bencilpropinamida (1,0 mg disueltos en 0,1 mL de DMF, $6,3 \times 10^{-6}$ moles) y 0,2 mL de 4- 123 I] yodofenilazida en MeCN (22 MBq). La reacción se calentó a 84°C durante 20 minutos. Tras enfriar, la preparación sin purificar se diluyó con 0,5 mL de TFA al 0,1% en acetonitrilo y 0,6 mL de TFA al 0,1% en agua y el producto deseado se aisló mediante HPLC (Sistema A, Ejemplo 2) con un rendimiento del 56% (sin corregir decaimiento) con una RCP del 100%. Se observó la co-elución del producto purificado con Compuesto 1 auténtico (Ejemplo 1).

Ejemplo 4: Preparación de [123 I]-1-(4-yodofenil)-4-fenil-1,2,3-triazol (Compuesto 2A).



Este método se basa en Glaser *et al* [Bioconj. Chem., 18(3), 989-993 (2007)].

- 15 A polvo de cobre (tamaño de partícula -40 mesh, 200 mg) en un vial Wheaton se añadió fosfato sódico (200 μ L, pH 6, 50 mM), fenilacetileno (0,64 mg, disuelto en 0,1 mL de DMF, $6,3 \times 10^{-6}$ moles) y finalmente 0,2 mL de 4- 123 I] yodofenilazida en MeCN (28 MBq). La reacción se calentó a 84°C durante 20 minutos. Tras enfriar, se analizó una muestra de 10 μ L mediante HPLC que indicó el producto deseado con una RCP de 85% (HPCL t_R 22,5 minutos, sistema B). La preparación sin purificar se diluyó con 0,4 mL de TFA al 0,1% en acetonitrilo y 0,7 mL de TFA al 0,1% en agua y el producto deseado se aisló mediante HPLC (Sistema B) con un rendimiento del 48% (sin corregir el decaimiento) con una RCP del 100%. Se observó la co-elución del producto purificado con Compuesto 2 auténtico (Ejemplo 1).

HPLC Sistema B

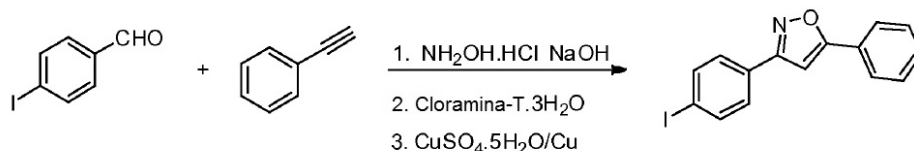
A = 0,1% de TFA en agua

B = 0,1% de TFA en acetonitrilo

- 25 Columna C18 (2) phenomenex Luna, 150 x 4,6 mm, 5 micras.

Gradiente	Tiempo (minutos)	0	25	27	29,5	30,5	37
	% de B	45	45	95	95	45	45

Ejemplo 5: Síntesis de 3-(4-yodofenil)-5-feniloxazol (Compuesto 3).



Véase J. Org. Chem. 70, 7761-7764 (2005).

- 30 A una disolución de hidrocloreto de hidroxilamina (79 mg, 1,13 mmol) en t-butanol (8 mL) y agua (8 mL) se añadió 4-yodobenzaldehído (250 mg, 1,07 mmol) y a continuación hidróxido sódico (45 mg, 1,05 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entonces se añadió trihidrato de cloramina-T (318 mg, 1,13 mmol) en una porción, seguido de sulfato de cobre (7,5 mg, 0,03 mmol) y virutas de cobre (aprox. 20 mg), etnil benceno (115 mg,

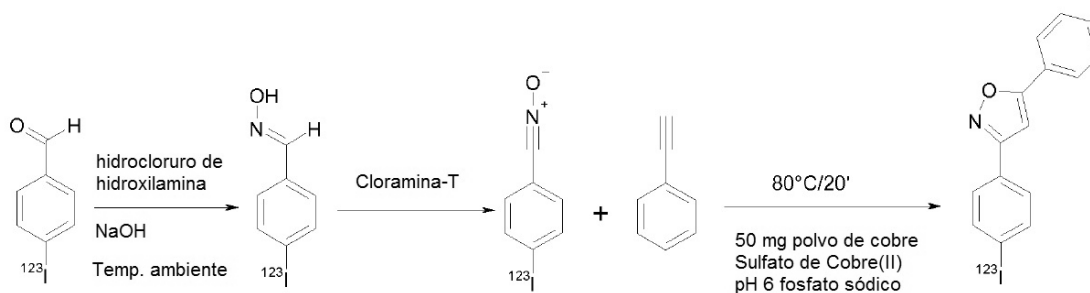
1,13 mmol, 120 μ L). El pH se ajustó a ~6 mediante la adición de unas pocas gotas de HCl 2 N y se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en hielo/agua (30 mL), se añadió una disolución diluida de hidróxido de amonio (10 mL) y el producto se recogió por filtración. El producto se volvió a disolver en DCM y se hizo pasar a través de un cartucho de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 20%: éter de petróleo (75 mL) para dar lugar a un sólido blanquecino impuro. El material se purificó adicionalmente mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con EtOAc al 5-10% en gasolina. Esto dio lugar a un sólido blanco (10 mg, 3%). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ H 6,80 (1H, s), 7,47 (3H, m), 7,60 (2H, m), y 7,82 (4H, m); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ H 96,4, 97,2, 125,9, 127,3, 128,4, 128,6, 129,0, 130,4, 162,2 y 170,7.

Ejemplo 6: Preparación de [^{123}I]-3-(4-yodofenil)-5-fenilisoxazol (Compuesto 3A).

10 Etapa (a): Preparación de [^{123}I] 4-yodobenzaldehído.

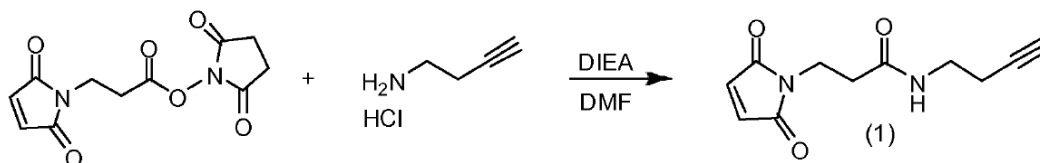
A 5,2 μ L de [^{123}I] yoduro sódico (138,1 MBq) se añadió tampón de acetato amónico (100 μ L, pH 4, 0,2 M), [^{127}I] yoduro sódico (51 μ L, disolución 10 mM en hidróxido sódico 0,01 M, $5,1 \times 10^{-7}$ moles), ácido peracético (11 μ L, disolución 50 mM, $5,5 \times 10^{-7}$ moles) y 4-tributylestannil benzaldehído (100 μ L, 200 μ g, disolución de 2 mg/mL en acetonitrilo, $5,06 \times 10^{-7}$ moles). Se añadieron otros 50 μ L adicionales de acetonitrilo para facilitar la solubilidad del 4-tributylestannil benzaldehído, y la mezcla de reacción se dejó incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos antes del análisis de HPLC, que mostró [^{123}I]-4-yodobenzaldehído (t_R ~8 minutos, sistema A, Ejemplo 2) con una RCP de >90%. A la mezcla de reacción se añadió 1 mL de acetonitrilo y 10 mL de agua y la disolución resultante se cargó en un cartucho ligero tC-18 (pre-tratado con 2,5 mL de metanol y 5 mL de agua). El [^{123}I] 4-yodobenzaldehído se eluyó con 0,5 mL de *t*-butanol:agua 1:1 con un rendimiento del 48% (sin corregir decaimiento).

20 Etapa (b): Preparación de Compuesto 3A.



A [^{123}I]-4-yodobenzaldehído purificado (0,5 mL) en un vial Wheaton se añadió hidrocloreto de hidroxilamina (74 μ g, 18,5 μ L de una disolución de 4mg/mL en agua, $1,06 \times 10^{-6}$ moles) e hidróxido sódico (106,5 μ g, 10,6 μ L de una disolución de 10 mg/mL en agua, $2,65 \times 10^{-6}$ moles). El pH se midió en aproximadamente 10 y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El análisis de HPLC confirmó una conversión del 81% a una especie más hidrofílica (t_R 7,0 minutos, Sistema A, Ejemplo 2) que se cree que es la oxima. A la oxima sin purificar se añadió en el siguiente orden; trihidrato de cloramina-T (750 μ g, 7,5 μ L de una disolución de 100 mg/mL en agua, $2,66 \times 10^{-6}$ moles), sulfato de cobre (II) (3,8 μ g, 7,6 μ L de una disolución de 0,5 mg/mL en agua, $1,53 \times 10^{-8}$ moles), polvo de cobre con tamaño de partícula -40 mesh (50 mg), tampón de fosfato sódico (100 μ L, pH 6, 50 mM) y fenilacetileno (0,64 mg en 0,1 mL de DMF, $6,3 \times 10^{-6}$ moles). El pH de la mezcla de reacción se midió en 6 y la mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 20 minutos. Tras enfriar, se analizó una muestra de 10 μ L mediante HPLC que indicó la formación del producto deseado (HPLC t_R 19,5 minutos, Sistema A, Ejemplo 2) con una RCP de 11,6%. La preparación sin purificar se diluyó con 0,4 mL de TFA al 0,1% en acetonitrilo y 0,4 mL de TFA al 0,1% en agua y el producto deseado se aisló mediante HPLC (Sistema A, Ejemplo 2) con un rendimiento del 3% (sin corregir el decaimiento) con una RCP del 100%. Se observó la co-elución del producto purificado con el Compuesto 3 auténtico (Ejemplo 5).

Ejemplo 7: Síntesis del ligando bifuncional maleimida-alquino (1)



40 Se disolvió éster de *N*-[β -maleimidopropiloxi]-succinimida (50 mg, 1,25 eq.) en 1,0 mL de DMF seco. Se disolvió hidrocloreto de 3-butin-1-amina (16 mg, 1,0 eq.) en 0,5 mL de DMF seco y 26 μ L de diisopropiletilamina (DIEA). Esta disolución de amina se añadió gota a gota al éster de succinimida manteniendo la disolución de éster en un baño de

5 hielo. La mezcla se agitó a 0°C durante 10 minutos. La disolución se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 h. Los disolventes fueron evaporados a vacío y el residuo se disolvió en 5 mL de CH₂Cl₂. La disolución orgánica se extrajo con salmuera (3 x 5 mL) y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida y el material sin purificar se purificó usando cromatografía flash (sílice, MeOH/CH₂Cl₂). El producto (1) se purificó de la grasa disolviendo la muestra en la cantidad mínima de CH₂Cl₂ (aprox. 2 mL), seguido de tres lavados con hexanos. El producto (1) precipitó un sólido blanco esponjoso. La caracterización del producto se realizó mediante RMN de ¹H. Rendimiento: 8,2 mg (25%). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,02 (s, 1), 2,41 (t, J = 5 Hz, 2), 2,57 (t, J = 5 Hz, 2), 3,42 (td, J = 5 Hz, 2), 3,88 (t, J = 5 Hz), 5,90 (bs, 1), 6,73 (s, 2).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GE Healthcare Limited

<120> Método de radiomarcado de yodo

5 <130> PZ09107 WO

<140> PCT/EP2010/069341

<141> 10-12-2010

10 <160> 9

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido sintético

<400> 1

Tyr Ile Gly Ser Arg

1 5

25 <210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> péptido sintético

<400> 2

Pro Asp Ser Gly Arg

1 5

35 <210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

40 <220>

<223> péptido sintético

45 <400> 3

Ile Lys Val Ala Val

1 5

<210> 4

<211> 3

50 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

55 <400> 4

Leu Arg Glu

1

60

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 5
 Lys Cys Gln Ala Gly Thr Phe Ala Leu Arg Gly Asp Pro Gln Gly
 10 1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 20 <400> 6
 Arg Gly Asp
 1
 <210> 7
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 30 <400> 7
 Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
 1 5
 <210> 8
 <211> 8
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> péptido sintético
 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 45 <223> Sar
 <400> 8
 Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ile
 1 5
 50 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> péptido sintético
 <220>
 <221> TIOET
 60 <222> (1)..(8)
 <220>

<221> DISULFURO

<222> (2)..(6)

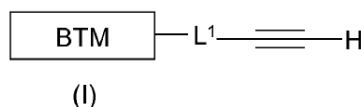
<400> 9

5 Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

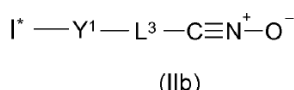
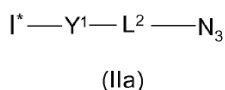
REIVINDICACIONES

1. Un método para la radioyodación de un resto diana biológico, comprendiendo dicho método:

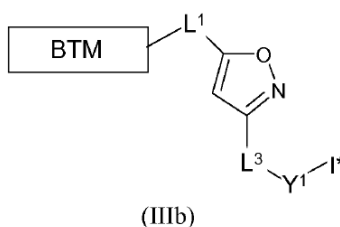
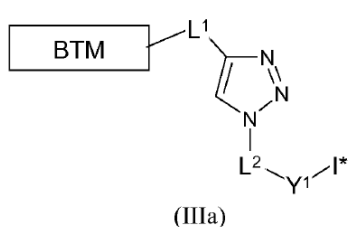
(i) la provisión de un compuesto de Fórmula (I):



5 (ii) la reacción de dicho compuesto de Fórmula (I) con un compuesto de Fórmula (IIa) o de Fórmula (IIb):



en presencia de un catalizador de cicloadición click, para producir un conjugado de Fórmula (IIIa) o (IIIb), respectivamente:



10 en donde:

I* es un radioisótopo de yodo, adecuado para la obtención de imágenes *in vivo*, elegido entre ¹²³I, ¹²⁴I o ¹³¹I;

L¹, L² y L³ son cada uno de forma independiente un grupo ligando que puede estar presente o ausente, en donde dicho grupo ligando comprende de forma independiente un grupo de fórmula -(A)_m- en donde cada A es de forma independiente -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-,
 15 -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NRCR₂-, un grupo cicloheteroalquileo C₄₋₈, un grupo cicloalquileo C₄₋₈, un grupo arileno C₅₋₁₂, o un grupo heteroarileno C₃₋₁₂, un aminoácido, un azúcar o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG) monodisperso;

en donde cada R se elige de forma independiente entre: H, alquilo C₁₋₄, alqueno C₂₋₄, alquino C₂₋₄, alcoxilquilo C₁₋₄ o hidroxialquilo C₁₋₄;

20 y m es un número entero de valor 1 a 20;

Y¹ es -Ar¹- o -X¹-;

en donde -Ar¹- es arileno C₃₋₁₀, y

-X¹- es -CH=CH-(CH₂)_n-(Ar¹)_j- o -CH=CH-(Ar¹)_j-(CH₂)_n-

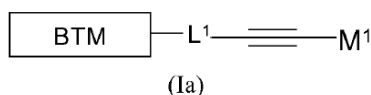
en donde j es 0 ó 1, y n es un número entero de valor 0 a 4,

25 en donde cuando Y¹ es -X¹-, I* está unido al extremo -CH=CH de X¹;

BTM es el resto diana biológico, que comprende: un péptido, análogo de péptido, peptoide o mimético de péptido de 3-80 unidades, que puede ser un péptido lineal o cíclico o combinaciones de los mismos; un aminoácido individual; un sustrato enzimático, antagonista de enzima, agonista de enzima (que incluye agonista parcial) o inhibidor enzimático; un compuesto de unión a receptor (que incluye un sustrato receptor, un antagonista, un agonista o un sustrato); un oligonucleótido, o un fragmento de oligo-ADN u oligo-ARN,

30

en donde el compuesto de Fórmula (I) es generado por la desprotección de un compuesto de Fórmula (Ia):



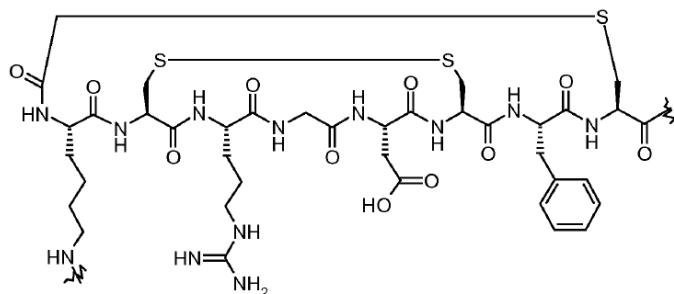
en donde M¹ es un grupo protector de alquilo.

2. El método según la reivindicación 1, en donde I* es ¹²³I.

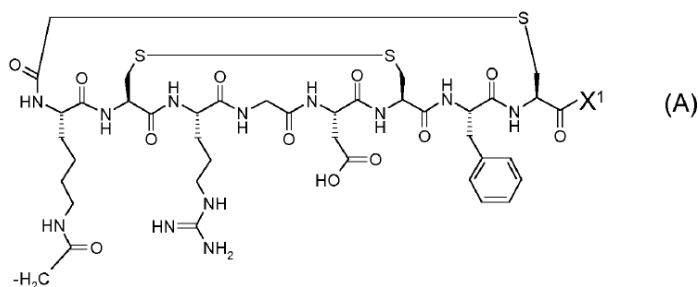
3. El método según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en donde el BTM es un aminoácido individual, un péptido de 3-80 unidades, un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático, un inhibidor enzimático o un compuesto de unión a receptor.

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el BTM es un péptido RGD.

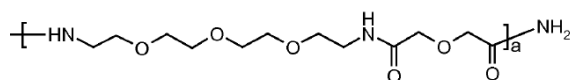
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el BTM es un péptido que comprende el fragmento:



6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el BTM es un péptido de fórmula (A):



en donde X¹ es -NH₂ o



en donde a es un número entero entre 1 y 10.

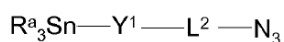
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el catalizador de cicloadición click es un catalizador de Cu(I) que comprende cobre elemental.

8. El método según la reivindicación 7, en donde el cobre elemental comprende:

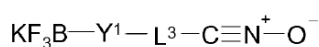
- (i) polvo de cobre con un tamaño de partícula en el rango de 0,001 a 1 mm;
- (ii) alambre de cobre con un diámetro en el rango de 0,01 a 1,0 mm.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el compuesto de Fórmula (IIa) o (IIb) se genera como se indica a continuación:

reacción de un precursor de Fórmula (IVa) o de Fórmula (IVb) respectivamente:



(IVa)



(IVb)

en donde Y¹, L² y L³ son como se define en la reivindicación 1, y cada R^a es de forma independiente alquilo C₁₋₄;

25

con un suministro de ion yoduro radioactivo en presencia de un agente oxidante, para producir el compuesto de Fórmula (IIa) o (IIb) respectivamente.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que se lleva a cabo de un modo aséptico, de tal modo que el producto de Fórmula (IIIa) o (IIIb) se obtiene como composición radiofarmacéutica.
- 5
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que se lleva a cabo usando un aparato sintetizador automatizado.