

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 230**

51 Int. Cl.:

C07D 249/04 (2006.01)

C07D 261/08 (2006.01)

C07B 59/00 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2010 PCT/EP2010/062149**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11020907**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2010 E 10752326 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2467365**

54 Título: **Método de radioyodación**

30 Prioridad:

20.08.2009 US 235393 P

20.08.2009 GB 0914543

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2017

73 Titular/es:

GE HEALTHCARE LIMITED (100.0%)

Amersham Place Little Chalfont

Buckinghamshire HP7 9NA , GB

72 Inventor/es:

AVORY, MICHELLE y

TRIGG, WILLIAM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 230 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 radioyodación

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona un nuevo método para marcar moléculas biológicas dirigidas a diana (BTMs, del inglés "biological targeting molecules") de interés con radioyodo. También se proporcionan nuevas BTMs radioyodadas preparadas usando el método, así como composiciones radiofarmacéuticas que comprenden dichas BTMs radioyodadas. La invención también proporciona intermedios radioyodados útiles en el método, así como métodos de obtención de imágenes *in vivo* usando las 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 los radiofármacos marcados con ^{123}I , Eersels *et al* [J. Lab. Comp. Radiopharm., 48, 241-257 (2005)] han comparado las 4 rutas sintéticas principales:

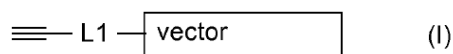
- (i) radioyodación oxidativa;
- (ii) intercambio nucleofílico isotópico;
- 15 (iii) intercambio nucleofílico no isotópico;
- (iv) marcaje electrofílico.

La ruta (iv) habitualmente implica el uso de un precursor organometálico, tal como trialquilestaño, trialquilsililo o un derivado de organomercurio u organotalio. De éstos, se reconoce que la ruta de radioyododestannilación se ha convertido en el método de marcaje electrofílico preferido, debido a la posibilidad de radioyodación regioespecífica a temperatura ambiente. Eersels *et al* concluyeron que no había un método de radioyodación de elección.

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

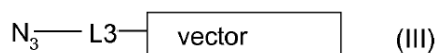
25 Las aplicaciones de la "química click" en investigación biomédica, incluyen la radioquímica, han sido revisadas por Nwe *et al* [Cancer Biother. Radiopharm., 24(3), 289-302 (2009)]. Tal como se indica en dicha referencia, el principal interés ha estado en el radioisótopo de PET ^{18}F (y en menor medida el ^{11}C), más las estrategias de "click a quelato" para radiometales adecuados para la obtención de imágenes SPECT, tales como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{111}In . El marcaje click con ^{18}F de péptidos dirigidos, que da lugar a productos que incorporan un triazol sustituido con ^{18}F -fluoroalquilo 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)].

30 El documento 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,

35 de un compuesto de fórmula (III) con un compuesto de fórmula (IV)

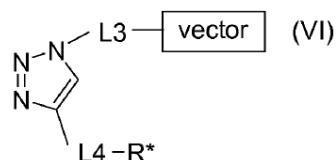
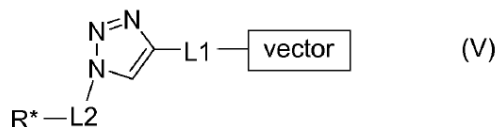


en presencia de un catalizador de Cu(I), en donde:

L1, L2, L3 y L4 son todos grupos ligando;

R* es un resto receptor que comprende un radionucleido;

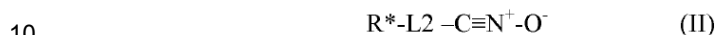
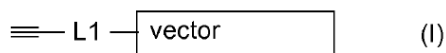
para dar lugar a un conjugado de fórmula (V) o (VI), respectivamente:



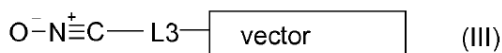
en donde L1, L2, L3, L4 y R* son como se ha definido antes.

- 5 En el documento WO 2006/067376, R* es un resto indicador que comprende un radionucleido, por ejemplo un radionucleido emisor de positrones. Se considera que los radionucleidos emisores de positrones adecuados para este fin 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 ha indicado que otros radionucleidos útiles incluyen ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{211}At , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{111}In .

El documento WO 2007/148089 describe un método para radiomarcado de 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):

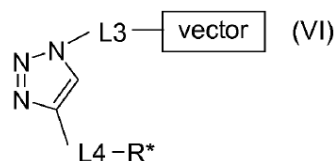
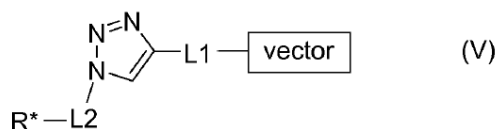


en presencia de un catalizador de Cu(I), en donde:

L1, L2, L3 y L4 son todos grupos ligando;

- 15 R* es un resto receptor que comprende un radionucleido;

para dar lugar a un conjugado de fórmula (V) o (VI), respectivamente:



- 20 En ambos documentos, WO 2006/067376 y WO 2007/148089, se indica que los radionucleidos metálicos son incorporados de forma adecuada en un agente quelante, por ejemplo mediante incorporación directa empleando métodos conocidos por los especialistas en la técnica. Ni el documento WO 2006/067376 ni el 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 los grupos ligando L1, L2, L3, L4, y qué tipo de grupo R* serían adecuados. Adicionalmente, el documento WO 2006/067376 se centra en el ^{18}F , y el fluoroacetileno no sería un intermedio atractivo para el radiomarcado, ya que tiene un punto de ebullición de -80°C y se sabe que es explosivamente inestable en estado líquido [Middleton, J. Am. Chem. Soc., 81, 803-804 (1959)].

5 El documento 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

(i) una primera estructura molecular;

(ii) un grupo saliente;

10 (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,

con un reactivo radiactivo en condiciones suficientes para desplazar el grupo saliente con un componente radiactivo del reactivo radiactivo para formar un primer compuesto radiactivo;

(b) proporcionar un segundo compuesto que comprende

15 (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 opcionalmente comprende un ligando entre el segundo compuesto y el segundo grupo funcional;

20 (c) hacer reaccionar el primer grupo funcional del primer compuesto radiactivo con el grupo funcional complementario del segundo compuesto mediante una reacción de química click para formar el ligando o sustrato radiactivo; y

(d) aislar el ligando o sustrato radiactivo.

25 El documento WO 2006/116629 muestra que el método que incluye 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 . El documento WO 2006/116629 muestra que otros radioisótopos 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, el documento WO 2006/116629 no proporciona ninguna indicación específica sobre cómo aplicar el método a la radioyodación de moléculas biológicas.

30 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de métodos de radioyodación alternativos.

La presente invención

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

40 El método proporciona productos en los que el radioyodo es enlazado directamente a un anillo de heteroarilo de triazol o isoxazol. De esta manera, es de esperar que los productos radioyodados exhiban una buena estabilidad con respecto a la desyodación metabólica *in vivo*, con la consiguiente captación de radioyodo no deseada en el estómago y/o el tiroides. Por lo tanto, los productos son adecuados para uso como radiofármacos para la obtención de imágenes *in vivo*, lo cual supone una ventaja importante.

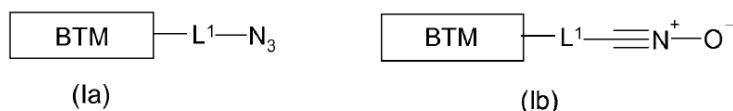
45 La metodología de radioyodación click es fácilmente adaptable al uso con un aparato sintetizador automatizado. En relación a esto, la volatilidad del yodoacetileno usado ($\text{H}-\equiv\text{I}$), (predicha en 32°C a aproximadamente 1 atmósfera de presión, pero publicada en $60-80^\circ\text{C}$) puede utilizarse de forma ventajosa para permitir una destilación fácil de las especies de radioyodo reactivas antes del radiomarcado, de tal modo que se maximiza la pureza radioquímica (RCP, del inglés "radiochemical purity"). Esto minimiza la necesidad de procesos adicionales de purificación del producto, tal como mediante cromatografía. También contrasta con la metodología de radioyodación convencional,

en la que las especies que contienen radioyodo volátil (p.ej., yodo molecular I₂) serían consideradas no deseadas debido al aumento del riesgo de pérdida de radiactividad y/o dosis de radiación.

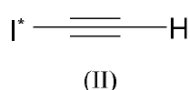
Descripción detallada de la invención

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de radioyodación de un resto biológico dirigido a diana, método que comprende:

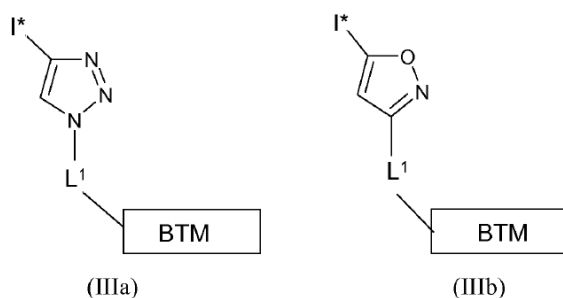
(i) la provisión de un compuesto de Fórmula (Ia) o (Ib):



(ii) la reacción de dicho compuesto de Fórmula (Ia) o (Ib) con un compuesto de Fórmula (II):



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



en donde:

I* es un radioisótopo de yodo;

15 L¹ es un grupo ligando que puede estar presente o ausente;

BTM es el resto biológico dirigido a diana.

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.

20 Cuando el grupo ligando está ausente, eso significa que el grupo azida de la Fórmula (Ia) o el grupo funcional de óxido de nitrilo de la Fórmula (Ib) están ligados directamente al BTM.

Con el término "resto biológico dirigido a diana" (BTM) se pretende indicar un compuesto que, tras ser administrado, es captado o se localiza de forma selectiva en una zona concreta del cuerpo de un mamífero *in vivo*. Dichas zonas pueden estar implicadas, por ejemplo, en un estado de enfermedad particular, o pueden ser indicativas de cómo está funcionando un órgano o un proceso metabólico.

25 El término radioisótopo de yodo tiene su significado convencional, es decir, un isótopo del elemento yodo que es radioactivo. Los radioisótopos adecuados incluyen: ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I y ¹³¹I. Cuando el BTM está marcado con ¹³¹I, el producto puede ser útil como radiofármaco para aplicaciones terapéuticas *in vivo*, tal como la radioinmunoterapia cuando el BTM es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

30 Con el término "catalizador de cicloadición click" se pretende indicar un catalizador que se sabe que cataliza la reacción de cicloadición click (alquino más azida) o la reacción de cicloadición click (alquino más óxido de isonitrilo) del primer aspecto. Los catalizadores adecuados para reacciones de cicloadición click son conocidos en la técnica. Los catalizadores preferidos incluyen Cu(I), y se describen más adelante. Wu y Fokin [Aldrichim. Acta, 40(1), 7-17 (2007)] y Meldal y Tornøe [Chem. Rev., 108, 2952-3015 (2008)] describen detalles adicionales de los catalizadores adecuados.

35 Aspectos preferidos

Un precursor preferido para uso en el método del primer aspecto es la azida de la Fórmula (Ia), 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, preferiblemente ^{123}I , ^{124}I o ^{131}I , más preferiblemente ^{123}I o ^{124}I , lo más preferiblemente ^{123}I .

El BTM puede ser de origen sintético o natural, pero preferiblemente es sintético. El término "sintético" tiene su significado convencional, es decir, fabricado por el hombre, en vez de aislado de fuentes naturales, p.ej., del cuerpo de un mamífero. Dichos compuestos presentan la ventaja de que su fabricación y perfil de impurezas pueden controlarse 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 emplea en la presente memoria.

El peso molecular del BTM preferiblemente es de hasta 30.000 Daltons. Más preferiblemente, el peso molecular está en el intervalo de 200 a 20.000 Daltons, lo más preferiblemente de 300 a 18.000 Daltons, siendo especialmente preferido de 400 a 16.000 Daltons. Cuando el BTM no es un péptido, el peso molecular del BTM preferiblemente es de hasta 3.000 Daltons, más preferiblemente de 200 a 2.500 Daltons, lo más preferiblemente de 300 a 2.000 Daltons, siendo especialmente preferido de 400 a 1.500 Daltons.

El resto biológico dirigido a diana preferiblemente comprende: un péptido, análogo de péptido, peptoido o mimético de péptido de 3-100 unidades, que puede ser un péptido lineal o cíclico o una combinación de ambos; un aminoácido individual; un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático (que incluye un agonista parcial) o un inhibidor enzimático; un compuesto de unión a receptor (que incluye un sustrato de 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, como se define más adelante, ligados mediante un enlace peptídico (es decir, un enlace de amida que une la amina de uno de los aminoácidos con el carboxilo del otro). El término "mimético de péptido" o "mimético" se refiere a compuestos activos biológicamente que imitan la actividad biológica de un péptido o proteína pero que ya no tienen una naturaleza química peptídica, es decir, ya no contienen ningún enlace peptídico (es decir, enlaces de amida entre aminoácidos). En la presente memoria, el término mimético de péptido se usa en un sentido más amplio para incluir moléculas que ya no son completamente de naturaleza peptídica, tal como pseudo-péptidos, semi-péptidos y peptoides. El término "análogo de péptido" se refiere a péptidos que comprenden uno o más análogos de aminoácidos, tal como se describe más adelante. Véase también "Synthesis of Peptides and Peptidomimetics", M. Goodman *et al*, Houben-Weyl E22c, Thieme.

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

Cuando el BTM es un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático, 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, enlaces de amida entre dos residuos de aminoácido. Los sustratos, antagonistas, agonistas o inhibidores enzimáticos adecuados incluyen glucosa y análogos de glucosa; ácidos grasos, o elastasa, Angiotensina II o inhibidores de metaloproteinasa. 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 los tropanos; y ligandos para el receptor de serotonina.

Lo más preferiblemente, el BTM es un péptido o análogo de péptido de 3-100 unidades. Cuando el BTM es un péptido, preferiblemente en un péptido de 4-30 unidades, y lo más preferiblemente un péptido de 5 a 28 unidades.

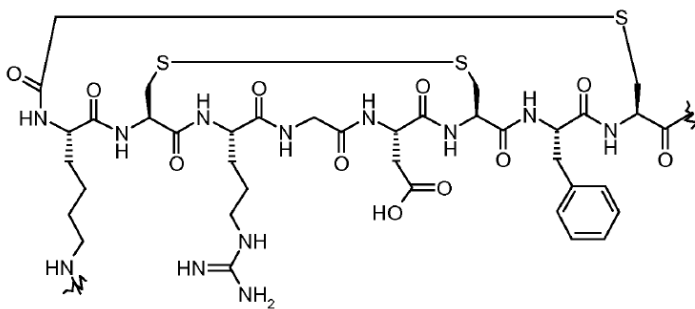
Cuando el BTM es un sustrato enzimático, antagonista enzimático, agonista enzimático o inhibidor enzimático, dichas moléculas biológicas dirigidas a diana preferidas de la presente invención son moléculas pequeñas sintéticas de tipo fármaco, es decir, moléculas farmacéuticas. Los ligandos de transportador 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 preferidos son ^{123}I -CIT (DopascanTM), ^{123}I -CIT-FP (DaTSCANTM) y el isómero E de ^{123}I -2 β -carbometoxi-3 β -(4-fluorofenil)-N-(1-yodoprop-1-en-3-il)nortropano (AltropanoTM). Se prefieren especialmente el DopascanTM y el DaTSCANTM. Éstos y otros agentes de tropano son

descritos por 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 la *meta*-yodobencilguanidina (MIBG), es decir ¹²³I-MIBG.

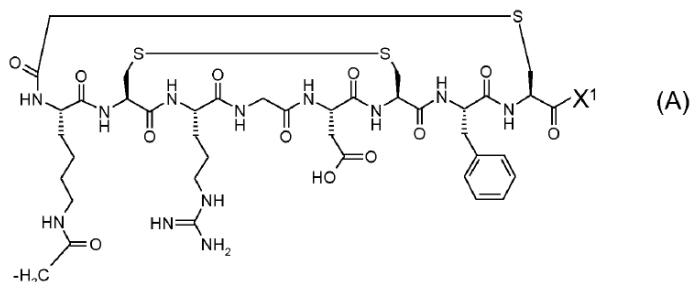
Cuando el BTM es un péptido, los péptidos preferidos incluyen:

- 5 - somatostatina, octreotide y análogos,
- péptidos que se unen al receptor de ST, en donde ST se refiere a toxina termoestable producida por *E. coli* y otros microorganismos;
- bombesina;
- péptidos intestinal vasoactivo;
- 10 - 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, p.ej., pueden estar dirigidos a angiogénesis [R. Pasqualini *et al.*, Nat Biotechnol. 1997 Junio; 15(6): 542-6]; [E. Ruoslahti, Kidney Int. 1997 Mayo; 51(5): 1413-7].
- 15 - 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);
- 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).
- 20 - Angiotensina I: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu.
- 25 - Angiotensina I: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu.

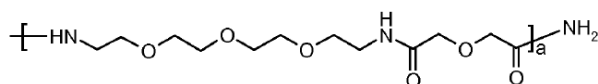
Los péptidos BTM preferidos son péptidos RGD. Un péptido RGD más preferido comprende el fragmento:



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



30 en donde X¹ es -NH₂ o



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

En la Fórmula a, a es preferiblemente 1.

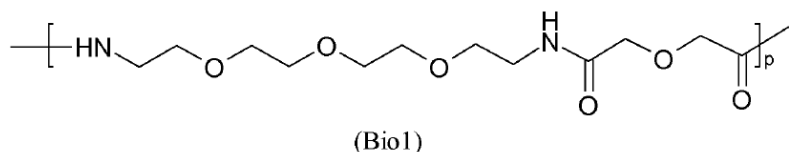
- 5 Cuando el BTM es un péptido, uno o ambos extremos del péptido, preferiblemente ambos, tienen conjugado un grupo inhibidor del metabolismo (M^G). Tener ambos extremos del péptido protegidos de esta manera es importante para las aplicaciones de obtención de imágenes *in vivo*, ya que de otro modo sería de esperar un rápido metabolismo con la consiguiente pérdida de afinidad de unión selectiva del péptido BTM. Con el término "grupo inhibidor del metabolismo" (M^G) se pretende indicar un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo enzimático, especialmente de la peptidasa carboxipeptidasa, del péptido BTM en el extremo amino o en el extremo carboxi. Dichos grupos son particularmente importantes para aplicaciones *in vivo*, y son bien conocidos por los especialistas en la técnica y se eligen de forma adecuada, para el extremo amino del péptido: grupos N-acilados -NH(C=O)R^G en donde el grupo acilo -(C=O)R^G tiene R^G elegido entre: grupos alquilo C₁₋₆, arilo C₃₋₁₀, o comprende una unidad de construcción de polietilenglicol (PEG). Los grupos PEG adecuados se describen a continuación para el grupo ligando (L¹). Tales 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.

- 15 Los grupos inhibidores del metabolismo adecuados para el extremo carboxilo del péptido incluyen: carboxamida, *tert*-butil éster, bencil éster, ciclohexil éster, amino alcohol o una unidad de construcción de polietilenglicol (PEG). Un grupo M^G adecuado para el residuo de aminoácido carboxiterminal del péptido de BTM es cuando la amina terminal del residuo de aminoácido está N-alquilada con un grupo alquilo C₁₋₄, preferiblemente un grupo metilo. Dichos grupos M^G preferidos son carboxamida o PEG, siendo lo más preferido carboxamida.

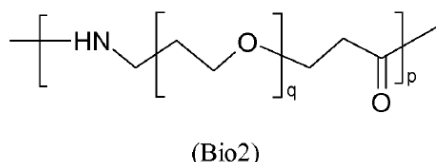
- 20 En el método del primer aspecto, preferiblemente está presente un grupo ligando (L¹). Los grupos ligando preferidos (L¹) son sintéticos, y comprenden un grupo de fórmula -(A)_m- en donde cada A es de forma independiente -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OOCR₂-, -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 una unidad de construcción de polietilenglicol (PEG) monodisperso; en donde cada R se elige de forma independiente entre: H, alquilo C₁₋₄, alquenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄, alcoxialquilo C₁₋₄ o hidroxialquilo C₁₋₄;

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

- 30 Cuando L¹ comprende una cadena peptídica de 1 a 10 residuos de aminoácido, los residuos de aminoácido preferiblemente se eligen entre glicina, lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico o serina. Cuando L¹ comprende un resto PEG, preferiblemente comprende unidades derivadas de la oligomerización de estructuras de tipo PEG monodispersas de las Fórmulas Bio1 o Bio2:



- 35 Ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de Fórmula Bio1 en el que 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:

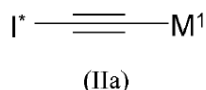


- 40 en donde p es como se ha definido para la Fórmula Bio1 y q es un número entero entre 3 y 15. En la Fórmula Bio2, p es preferiblemente 1 o 2, y q es preferiblemente de 5 a 12.

Quando el grupo ligando no comprende PEG o una cadena peptídica, los grupos L¹ preferidos tienen una cadena principal de átomos ligados que constituyen el resto -(A)_m- de 2 a 10 átomos, lo más preferiblemente de 2 a 5 átomos, siendo especialmente preferido 2 o 3 átomos.

Los péptidos BTM que no se encuentran disponibles comercialmente pueden sintetizarse mediante síntesis de péptidos en fase sólida tal como se describe en P. Lloyd-Williams, F. Albericio y E. Giraldo; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, 1997.

5 En el método del primer aspecto, el compuesto de Fórmula (II) puede generarse de forma preferible *in situ* mediante desprotección de un compuesto de Fórmula (IIa):



en donde M¹ es un grupo protector de alquino, e I* es tal como se ha definido para la Fórmula (II). Los aspectos preferidos de I* en la Fórmula (IIa), son los descritos para la Fórmula (II).

10 Con 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 para ser eliminado del grupo funcional en cuestión en condiciones suficientemente suaves para no modificar el resto de la molécula. Tras desprotección, se obtiene el producto deseado. Los grupos protectores de alquino adecuados se describen en “Protective Groups in Organic Synthesis”, Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, Capítulo 8, páginas 927-933, 4ª edición (John Wiley & Sons, 2007), e incluyen: un grupo trialkilsililo en el que cada grupo alquilo es de forma independiente alquilo C₁₋₄;

15 un grupo arildialquilsililo en el que el grupo arilo preferiblemente es bencilo o bifenilo y los grupos alquilo son cada uno de forma independiente alquilo C₁₋₄; hidroximetilo o 2-(2-hidroxipropilo). Un grupo protector de alquino preferido es el trimetilsililo. Los yodoalquinos protegidos de Fórmula IIa presentan las ventajas de que se puede controlar la volatilidad del yodoalquino radiactivo, y de que el alquino deseado de Fórmula (II) se puede generar de un modo controlado *in situ*, de tal modo que se maximiza la eficacia de la reacción con el derivado de azida de Fórmula (Ia) o

20 (Ib).

El método del primer aspecto se lleva a cabo preferiblemente de un modo aséptico, de tal modo que el producto de Fórmula (IIIa) o (IIIb) se obtiene como una composición radiofarmacéutica. En el tercer aspecto se proporciona una descripción adicional de la composición radiofarmacéutica (ver más adelante). Por tanto, el método se lleva a cabo en condiciones de fabricación asépticas para producir el producto radiofarmacéutico estéril no pirogénico

25 esterilizado. Por lo tanto, se prefiere que los componentes clave, especialmente cualquier parte del aparato que entre en contacto con el producto de Fórmula (IIIa) o (IIIb) (p.ej., viales y tubos de transferencia) sean estériles. Los componentes y reactivos pueden esterilizarse mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen: esterilización por filtración, esterilización terminal usando, p.ej., radiación gamma, autoclavado, tratamiento químico (p.ej., con óxido de etileno) o con calor seco. Se prefiere esterilizar los componentes no radiactivos por anticipado, de tal modo que se realice el menor número posible de manipulaciones del producto radiofarmacéutico radioyodado. Sin embargo, a modo de precaución, se prefiere incluir al menos una etapa final de esterilización por filtración.

Los compuestos de Fórmula (Ia), (Ib) y (II), más un catalizador de Cu(I) y otros reactivos y disolventes son suministrados en viales o recipientes adecuados que comprenden un recipiente sellado que permite mantener la integridad estéril y/o la seguridad radiactiva, más opcionalmente un gas inerte de espacio de cabeza (p.ej., nitrógeno o argón), a la vez que se permite la adición y la retirada de disoluciones mediante jeringa o cánula. Un recipiente de este tipo preferido es un vial sellado con septum, en el que se realiza un cierre hermético pinzando un tapón (típicamente de aluminio). El cierre es adecuado para punción única o múltiple con una aguja hipodérmica (p.ej., un cierre sellado de septum pinzable) a la vez que mantiene la integridad estéril. Dichos recipientes presentan la ventaja adicional de que el cierre puede soportar vacío si se desea (p.ej., para cambiar el gas de espacio de cabeza o para desgasificar disoluciones), y puede soportar cambios de presión tales como reducciones de 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 dichos recipientes, y las realizaciones preferidas de los mismos. El recipiente de reacción está fabricado preferiblemente en un plástico biocompatible (p.ej., PEEK).

35

40

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 los procesos complejos se reducen a una serie de operaciones o reacciones sencillas, que pueden aplicarse a un abanico de materiales. Dichos sintetizadores automatizados son preferidos para el método de la presente invención especialmente cuando se desea un producto radiofarmacéutico. Se encuentran 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.).

45

50

Los sintetizadores automatizados comerciales también proporcionan recipientes adecuados para el residuo radiactivo líquido generado como resultado de la preparación radiofarmacéutica. Los sintetizadores automatizados no se proporcionan habitualmente con blindaje de radiación, ya que están diseñados para ser empleados en una célula de trabajo radiactivo configurada de forma adecuada. La célula de trabajo radiactivo proporciona un blindaje adecuado frente a la radiación para proteger al operador de la potencial dosis de radiación, así como la ventilación

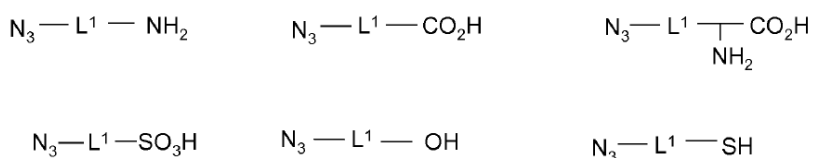
55

necesaria para eliminar los vapores químicos y/o radiactivos. El sintetizador automatizado preferiblemente comprende una "casete" como la descrita en el octavo aspecto (ver más adelante).

El método de radioyodación del primer aspecto puede llevarse a cabo en un disolvente adecuado, por ejemplo acetonitrilo, alcohol alquílico C₁₋₄, dimetilformamida, tetrahidrofurano o dimetilsulfóxido, o mezclas acuosas de cualquiera de ellos, 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 a temperatura ambiente (habitualmente 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, (2008) 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, habitualmente en una cantidad catalítica o en exceso, tal como de 0,02 a 1,5 equivalentes molares respecto al compuesto de Fórmula (Ia) o (Ib). 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 partículas de cobre elemental, por tanto también puede usarse cobre elemental, por ejemplo en forma de polvo o gránulos, como catalizador. El cobre elemental, con un tamaño de partícula controlado es una fuente preferida para el catalizador de Cu(I). Un catalizador de este tipo más preferido es el cobre elemental en forma de polvo de cobre, con 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 alambre de cobre enrollado 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 radiactivos de Fórmula (Ia) y (Ib), en los que el BTM es un péptido o proteína, pueden prepararse mediante métodos estándar de síntesis de péptidos, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida, por ejemplo, como se describe en Atherton, E. y Sheppard, R.C.; "Solid Phase Synthesis"; IRL Press: Oxford, 1989. La incorporación del grupo alquino o azida a un compuesto de Fórmula (Ia) o (Ib) se puede lograr por reacción del extremo N o C del péptido o con algún otro grupo funcional contenido dentro de la secuencia de péptido, cuya modificación no afecte a las características de unión del vector. El grupo azida se introduce preferiblemente mediante la formación de un enlace de amida estable, formado por ejemplo por reacción de una función amina de péptido con un ácido activado, o alternativamente por reacción de una función ácida de péptido con una función amina, e introducido durante la síntesis del péptido o a continuación de la misma. Los métodos para la incorporación de un grupo azida en vectores tales como células, virus, bacterias, pueden encontrarse en H.C. Kolb y K.B. Sharpless, Drug Discovery Today, Vol. 8 (24), diciembre de 2003, y las referencias ahí incluidas. Los intermediarios bifuncionales adecuados útiles para la incorporación del grupo azida en un compuesto de Fórmula (Ia) o (Ib) incluyen:



en donde L¹ y las realizaciones preferidas del mismo son como se ha definido anteriormente. En las fórmulas anteriores, L¹ está presente de forma adecuada. En el aminoácido funcionalizado con azida, sin embargo, el grupo funcional azida opcionalmente puede estar unido directamente a la cadena lateral del aminoácido sin ningún grupo ligando.

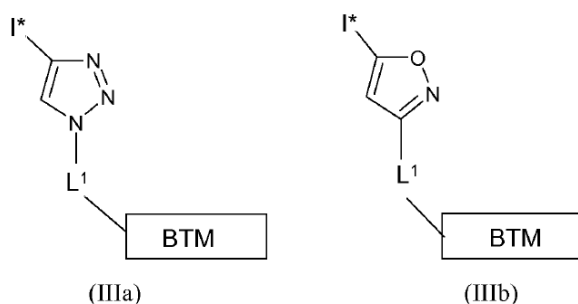
Otras estrategias adicionales para funcionalizar BTMs con grupos azida se describen en Nwe *et al* [Cancer Biother. Radiopharm., 24(3), 289-302 (2009)]. Li *et al* proporcionan la síntesis de un compuesto del tipo N₃-L¹-CO₂H, en donde L¹ es -(CH₂)₄- y su uso para conjugar los BTMs que contienen amina [Bioconj. Chem., 18(6), 1987-1994 (2007)]. Hausner *et al* describen una metodología relacionada para N₃-L¹-CO₂H, en donde L¹ es -(CH₂)₂- [J. Med. Chem., 51(19), 5901-5904 (2008)]. De Graaf *et al* [Bioconj. Chem., 20(7), 1281-1295 (2009)] describen aminoácidos no naturales que presentan cadenas laterales de azida y su incorporación específica de sitio en péptidos o proteínas para una posterior conjugación click.

Los óxidos de nitrilo de Fórmula (Ib) pueden obtenerse mediante los métodos descritos por Ku *et al* [Org. Lett., 3(26), 4185-4187 (2001)], y las referencias ahí incluidas. De esta manera, típicamente son generados *in situ* mediante tratamiento de una alfa-halo aldoxima con una base orgánica tal como trietilamina. Ver también K.B.G. Torsell "Nitrile Oxides, Nitrones and Nitronates in Organic Synthesis" [VCH, Nueva York (1988)].

Los alquinos radioyodados de Fórmula (II) y (IIa) pueden obtenerse como se describe en el cuarto aspecto (ver más adelante).

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 a un único producto posible. Por tanto, esta metodología es quimioselectiva. Adicionalmente, las funcionalidades alquino y azida son estables en la mayoría de las condiciones de reacción y no son reactivas con las funcionalidades peptídicas más habituales – minimizando de este modo 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 péptidos o proteínas marcados son buenos imitadores de sus contrapartidas naturales – el anillo de triazol en particular es un grupo mimético de amida conocido o bioisómero. Sin embargo, no es de esperar que los anillos de triazol e isoxazol de los productos de Fórmula (IIIa) y (IIIb) de la presente invención sean reconocidos por las enzimas de desyodación del tiroides conocidas por metabolizar yodo-tirosina más rápidamente que yodobenceno, y por tanto es de esperar que sean suficientemente estables *in vivo* para radioterapia u obtención de imágenes con radiofármacos.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (IIIa) o (IIIb):



en donde I*, L¹ y BTM y las realizaciones preferidas de los mismos son como se ha definido en el primer aspecto. En particular, L¹ puede estar presente o ausente.

Preferiblemente, el compuesto del segundo aspecto tiene la Fórmula (IIIa).

La presente invención también proporciona un compuesto de Fórmula (IIIa) o (IIIb) como el definido en el segundo aspecto para uso médico – preferiblemente el compuesto de Fórmula (IIIa).

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

El “medio portador biocompatible” comprende uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente es un fluido, especialmente un líquido, en el que el compuesto de Fórmula (IIIa) o (IIIb) se suspende o se disuelve, de tal modo que la composición sea fisiológicamente tolerable, es decir, se pueda administrar al cuerpo del mamífero sin toxicidad y sin generar molestias. El medio portador biocompatible de forma adecuada es un líquido portador inyectable tal como agua estéril, libre de pirógenos, para inyección; una disolución acuosa tal como salino (que de forma ventajosa puede estar equilibrada para que el producto final para inyección sea isotónico o no hipotónico); una disolución acuosa de una o más sustancias de ajuste de la tonicidad (p.ej., sales de cationes plasmáticos 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., polietilenglicoles, propilen glicoles y similares). El medio portador biocompatible también puede comprender disolventes orgánicos biocompatibles tales como etanol. Dichos disolventes orgánicos son útiles para solubilizar los compuestos o formulaciones más lipofílicas. Preferiblemente, el medio portador biocompatible es agua libre de pirógenos para inyección, salino isotónico o una disolución de etanol en agua. El pH del medio portador biocompatible para inyección intravenosa está de forma adecuada en el intervalo de 4,0 a 10,5.

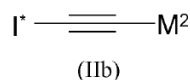
En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación del compuesto de Fórmula II tal como se ha definido en el primer aspecto, que comprende:

(i) Reacción de un precursor de Fórmula IV o de Fórmula V



en donde M^2 es H o un grupo M^1 , y M^1 es como se ha definido en el primer aspecto, y cada R^a es de forma independiente alquilo C_{1-4} ;

con un suministro de ion yoduro radiactivo en presencia de un agente oxidante, para dar lugar al compuesto de Fórmula IIb:



5

en donde I^* es tal como se ha definido en el primer aspecto;

(ii) cuando M^2 es un grupo M^1 , desprotección para eliminar el grupo M^1 .

Los grupos protectores M^1 adecuados para uso en el cuarto aspecto, y las realizaciones preferidas de los mismos se describen en el primer aspecto (ver más arriba). Las condiciones de desprotección se describen en "Protective Groups in Organic Synthesis", Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, Capítulo 8, páginas 927-933, 4ª edición (John Wiley & Sons, 2007).

10

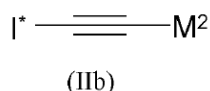
15

20

25

El precursor de Fórmula IV o V no es radiactivo. Algunos precursores de Fórmula (IV) se encuentran disponibles comercialmente. Así, los compuestos de trialquilestaño $Bu_3Sn\equiv H$ y $Bu_3Sn\equiv SiMe_3$ están disponibles comercialmente en Sigma-Aldrich. Otros 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 (que está disponible comercialmente) a pH de aproximadamente 4 y peróxido de hidrógeno/HCl acuoso a pH de aproximadamente 1. Cuando M^2 es H, el compuesto de fórmula IIb es yodoacetileno. La síntesis del análogo no radiactivo (^{127}I) ha sido descrita por Ku *et al* [Org. Lett., 3(26), 4185-4187 (2001)]. La síntesis de yoduros de alquínilo marcados con ^{123}I a través de los precursores de alquíniltrifluoroborato análogos a la Fórmula (V), usando ácido peracético en la etapa de radioyodación, ha sido descrita por Kabalka *et al* [J. Lab. Comp. Radiopharm., 48, 359-362 (2005)]. La síntesis de precursores de alquíniltrifluoroborato de potasio a partir del correspondiente alquino se describe en dicho documento, así como en Kabalka *et al* [J. Lab. Comp. Radiopharm., 49, 11-15 (2006)]. Se menciona que los precursores de alquíniltrifluoroborato de potasio son sólidos cristalinos, que son estables tanto en aire como en agua.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (IIb), útil en el método del primer aspecto:



en donde I^* es tal como se ha definido en el primer aspecto; y

30

M^2 es H o M^1 , en donde M^1 es tal como se ha definido para la Fórmula IIa (ver más arriba).

Las realizaciones preferidas de I^* y M^1 son como se ha definido en primer aspecto (ver más arriba).

35

Cuando M^2 es H, el compuesto de Fórmula (IIb) es yodoacetileno radioyodado. La volatilidad del yodoacetileno ($H\equiv I$) usado, 32 °C a 1 atmósfera de presión, puede permitir de forma ventajosa una destilación fácil de las especies de radioyodo reactivas antes del radiomarcaje, atrapándose el producto, p.ej., en un recipiente enfriado en hielo seco. Esto representa una purificación útil antes de la etapa de radioyodación. Puesto que la cicloadición click tiene un rendimiento elevado, se puede suponer que se consumiría todo el Compuesto (II), por lo que se maximiza la pureza radioquímica (RCP) del producto, es decir, del Compuesto (IIIa) o (IIIb).

40

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto según el segundo o el quinto aspecto, 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 mediante PET o SPECT.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un aparato sintetizador automatizado para llevar a cabo el método del primer o del cuarto aspecto.

45

El aparato sintetizador automatizado y las realizaciones preferidas del mismo se describen en el primer aspecto (ver más arriba).

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona una casete estéril de uso individual, adecuada para uso en el sintetizador automatizado de la realización preferida del primer aspecto, comprendiendo dicha casete los reactivos no radiactivos necesarios para llevar a cabo el método del primer o del cuarto aspecto en forma apirogénica estéril.

Las realizaciones preferidas de los métodos anteriores para uso en el octavo aspecto se describen en el primer y en el cuarto aspectos, respectivamente.

Con el término "casete" se pretende indicar una pieza de un aparato diseñada para ajustarse de forma extraíble e intercambiable en un aparato sintetizador automatizado (tal como se define más adelante), de tal modo que el movimiento mecánico de 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, unidas cada una a un puerto al que se pueden acoplar reactivos o viales, mediante punción con aguja de un vial sellado con septum invertido, o mediante juntas de acoplamiento herméticas. Cada válvula tiene una junta macho-hembra que hace de interfaz con el correspondiente brazo móvil del sintetizador automatizado. La rotación externa del brazo controla de este modo la apertura o el cierre de la válvula cuando la casete está acoplada al sintetizador automatizado. Se diseñan otras partes móviles adicionales del sintetizador automatizado para sujetar el extremo del émbolo de la jeringa, y de este modo subir o bajar el émbolo de la jeringa.

La casete es versátil, presentando típicamente varias posiciones en las que se pueden acoplar los reactivos, y varias adecuadas para el acoplamiento 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 un volumen de 1 a 10 cm³, lo más preferiblemente de 2 a 5 cm³, y están configurados de tal modo se conectan al mismo 3 o 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 un sistema 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 de la presente invención están diseñadas para ser adecuadas para fabricación de radiofármacos, y por tanto están fabricadas en materiales que son de grado farmacéutico y que idealmente también son resistentes a radiolisis.

Los sintetizadores automatizados preferidos de la presente invención son aquellos que comprenden una casete desechable o de uso individual 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 implica que el sintetizador automatizado tiene la flexibilidad para ser capaz de fabricar una variedad de diferentes radiofármacos marcados con radioyodo con un riesgo mínimo de contaminación cruzada, simplemente cambiando la casete. La estrategia de casetes también presenta las ventajas de: instalación simplificada y por tanto riesgo de error del operario reducido; mejor aceptación de GMP; capacidad multi-trazadora; cambio rápido entre lotes de producción; comprobación diagnóstica automatizada previa a la operación de la casete y de los reactivos; comprobación cruzada de código de barras automatizada 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, resistencia a la alteración y al abuso.

En un noveno aspecto, la presente invención proporciona un método para generar una imagen de un cuerpo humano o de animal que comprende la administración de un compuesto según el segundo aspecto, o la composición radiofarmacéutica según el quinto aspecto, y generar una imagen de al menos una parte de dicho cuerpo por el cual se ha distribuido dicho compuesto o composición mediante PET o SPECT.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para monitorizar el efecto del tratamiento de un cuerpo humano o de animal con un fármaco, comprendiendo dicho método la administración a dicho cuerpo de un compuesto según el segundo aspecto, o la composición según el quinto aspecto, y detectar la captación de dicho compuesto o composición en al menos una parte de dicho cuerpo por el cual se ha distribuido dicho compuesto o composición usando PET o SPECT.

La administración y la detección de este aspecto final preferiblemente se efectúan antes y después del tratamiento con dicho fármaco, de tal modo que se puede determinar el efecto del tratamiento con fármaco en el paciente humano o animal. Cuando el tratamiento con fármaco implica un curso de terapia, la obtención de imágenes también se puede llevar a cabo durante el tratamiento.

La invención es ilustrada mediante los siguientes Ejemplos. El Ejemplo 1 proporciona la síntesis de una muestra de referencia de (¹²⁷I) yodo-acetileno no radiactivo como patrón de referencia auténtico para cromatografía. El Ejemplo 2 proporciona el acoplamiento click de yodo-acetileno con bencil azida, para formar un anillo de triazol. Los Ejemplos 3 a 5 proporcionan la síntesis de ¹²³I-yodoacetileno usando diferentes oxidantes. Los Ejemplos 6 a 8 proporcionan ejemplos proféticos de la síntesis de triazoles radioyodados usando el método de la invención. El Ejemplo 9 proporciona un ejemplo profético de la síntesis de triazoles radioyodados usando el método de la invención.

Abreviaturas

DIPEA: di-isopropiletilamina

DMF: Dimetilformamida

55 HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

MeCN: Acetonitrilo

PAA: Ácido peracético
 RP-HPLC: HPLC de fase inversa
 RT: temperatura ambiente
 THF: tetrahidrofurano.

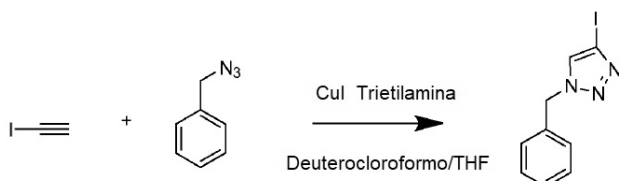
5 **Ejemplo 1: Síntesis de yodo acetileno.**



Se trató tributil(etinil)estannano (Sigma-Aldrich, 400 mg, 1,27 mmol) en deuterocloroformo (2 mL) a 0°C con yodo (322 mg, 1,27 mmol). La reacción se dejó calentar entonces hasta temperatura ambiente a lo largo de un periodo de 15 minutos, cuando el color del yodo se desvaneció rápidamente. A continuación la reacción se destiló, y el yodoacetileno volátil se recogió en deuterocloroformo en forma de líquido incoloro. El análisis de RMN en cloroformo indicó que era una disolución pura de yodoacetileno. El rendimiento no se puede estimar fácilmente a esta escala, ya que el yodoacetileno es un material volátil.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 2,17 (1H, s, CH). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 83,3 (no es visible ningún otro carbono).

15 **Ejemplo 2: Síntesis de 1-bencil-4-yodo-1H-1,2,3-triazol.**



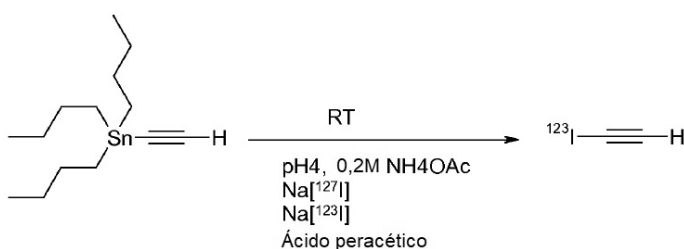
Una disolución de yodoacetileno (193 mg, 1,27 mmol, suponiendo un 100% de rendimiento en la reacción previa) en deuterocloroformo (2 mL) y THF (2 mL) a 20°C fue tratada con azidometil benceno (bencil azida; 169 mg, 1,27 mmol) [disponible comercialmente en Alfa Aesar; Fr. Moulin, Helvet. Chim. Acta, 35, 167-80 (1952)], yoduro de cobre (90 mg, 0,47 mmol), y trietilamina (256 mg, 2,54 mmol). A continuación la reacción se agitó a temperatura ambiente a lo largo de un periodo de 48h. La reacción de filtró entonces a través de celite para eliminar el óxido de cobre (I) y después se sometió a cromatografía en sílice con un gradiente de acetato de etilo al 15-50% en gasolina. Se recogieron dos fracciones.

La fracción 1 se evaporó para producir un aceite incoloro (102 mg, 0,77 mmol). El RMN de ^1H y el RMN de ^{13}C indicaron que éste era principalmente azidometil benceno sin reaccionar.

La fracción 2 se evaporó para producir 1-bencil-4-yodo-1H-1,2,3-triazol en forma de líquido incoloro que se cristalizó al dejarlo reposar (104 mg, 0,364 mmol, 28%).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 5,60 (2H, s, CH_2), 7,24 (2H, m, 2xArH), 7,32 (3H, m, 3xArH), 7,741 H, s, CHArH). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 53,8, 127,7, 128,4, 128,8, 134,2, 141,5. Un carbono no visible.

30 **Ejemplo 3: Preparación y destilación de [^{123}I]-yodoacetileno usando como oxidante ácido peracético.**



A un vial Wheaton en hielo se añadió tampón de acetato de amonio (100 μL , 0,2 M, pH 4), [^{127}I] yoduro sódico (10 μL , disolución 10 mM en hidróxido sódico 0,01 M, 1×10^{-7} moles), [^{123}I] yoduro sódico (10 μL , 20-85 MBq), ácido

peracético (10 μL , disolución 10 mM, 1×10^{-7} moles) y una disolución de etiniltributilestannano en THF (Sigma-Aldrich; 100 μL , 0,38 mg/mL, $1,2 \times 10^{-7}$ moles). Finalmente, se añadieron 400-600 μL de THF, el vial Wheaton se selló y se dejó que la mezcla de reacción se calentara hasta temperatura ambiente antes del análisis mediante HPLC de fase inversa.

- 5 El análisis de HPLC aproximadamente 10 minutos después de la adición de etiniltributilestannano dio lugar a [^{123}I]-yodoacetileno con una pureza radioquímica (RCP) del 75%. Ver la Figura 1. La impureza con el tiempo de retención más elevado se cree que es ^{123}I -diyodoacetileno.

La mezcla de reacción se calentó a 80-100°C durante 15-20 minutos, tiempo durante el cual el [^{123}I]-yodoacetileno y el THF fueron destilados a través de un tubo corto hasta un vial de recolección en hielo. Después de este tiempo, se hizo pasar un flujo pequeño de nitrógeno a través de los septum del vial calentado para eliminar cualquier líquido residual del tubo. Ver la Figura 2.

- 10 El análisis de HPLC aproximadamente a los 10 minutos después de la destilación mostró [^{123}I]-yodoacetileno con un 94% de RCP. Ver la Figura 3.

Ejemplo 4: Preparación de [^{123}I]-yodoacetileno usando tubos de Iodo-gen

- 15 A un tubo iodo-gen (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products) pre-humedecido con tampón de fosfato sódico (1 mL, pH 7,4, 25 mM), se añadió tampón de fosfato sódico (100 μL , pH 7,4, 25 mM), [^{127}I] yoduro sódico (10 μL , disolución 10 mM en hidróxido sódico 0,01 M, 1×10^{-7} moles) y [^{123}I] yoduro sódico (10 μL , 18 MBq). Tras una incubación a temperatura ambiente durante 6 minutos, dichos reactivos fueron transferidos a un vial Wheaton en hielo antes de la adición de una disolución de etiniltributilestannano en THF, (Sigma-Aldrich; 38 μL , 1 mg/mL, $1,2 \times 10^{-7}$ moles). El vial se selló y se dejó que la mezcla de reacción se calentara hasta temperatura ambiente antes del análisis de HPLC de fase inversa.

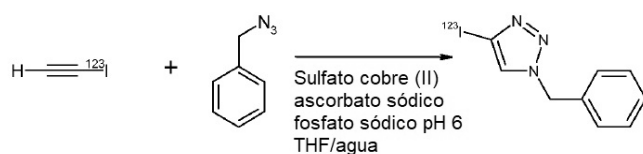
El análisis de HPLC aproximadamente a los 10 minutos después de la adición de etiniltributilestannano mostró [^{123}I]-yodoacetileno con un rendimiento del 57%.

Ejemplo 5: Preparación y purificación de [^{123}I]-yodoacetileno usando como oxidante peróxido de hidrógeno.

- 25 A un vial Wheaton en hielo se añadió [^{127}I] yoduro sódico (10 μL , disolución 10 mM en hidróxido sódico 0,01 M, 1×10^{-7} moles), [^{123}I] yoduro sódico (10 μL , 18 MBq), ácido clorhídrico (100 μL , 1M), peróxido de hidrógeno (50 μL , disolución al 3% en agua, $4,4 \times 10^{-5}$ moles) y una disolución de etiniltributilestannano en THF (Sigma-Aldrich; 38 μL , 1 mg/mL, $1,2 \times 10^{-7}$ moles). El vial se selló y se dejó que la mezcla de reacción se calentara hasta temperatura ambiente antes del análisis mediante HPLC de fase inversa.

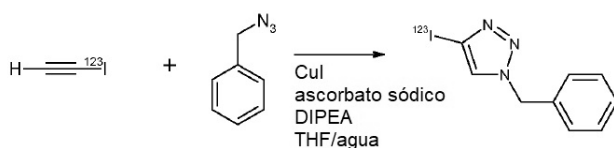
- 30 El análisis de HPLC aproximadamente 10 minutos después de la adición de etiniltributilestannano dio lugar a [^{123}I]-yodoacetileno con rendimiento del 85%.

Ejemplo 6: Preparación de 1-benceno-4- ^{123}I -yodo-1H-1,2,3-triazol (Ejemplo Profético).

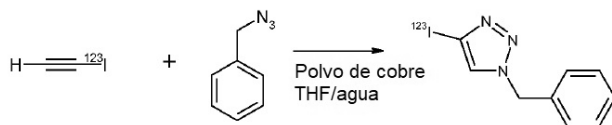


- 35 A un vial Wheaton enfriado que contiene [^{123}I]-yodoacetileno en THF (Ejemplo 3, 4 ó 5) se añade agua, sulfato de cobre, ascorbato L sódico y tampón de fosfato sódico. Finalmente, se añade una disolución bencil azida y se retira el baño de hielo. La reacción se incuba a temperatura ambiente, aplicando calor cuando es requerido. Tras dilución en agua, el 1-benceno-4- ^{123}I -yodo-1H-1,2,3-triazol se purifica mediante HPLC de fase inversa o cartucho Sep-Pak.

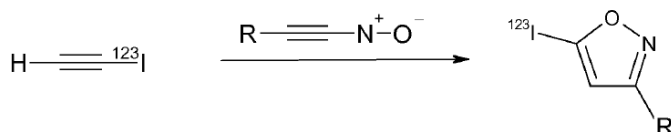
Ejemplo 7: Preparación de 1-benceno-4- ^{123}I -yodo-1H-1,2,3-triazol (Ejemplo Profético).



- 40 A un vial Wheaton en hielo que contiene [^{123}I]-yodoacetileno en THF (Ejemplo 3, 4 ó 5) se añade yoduro de cobre (I), ascorbato L sódico, agua y di-isopropiletilamina. Finalmente, se añade una disolución bencil azida y se retira el baño de hielo. La reacción se incuba a temperatura ambiente, aplicando calor cuando es requerido. Tras dilución en agua, el 1-benceno-4- ^{123}I -yodo-1H-1,2,3-triazol se purifica mediante HPLC de fase inversa o cartucho Sep-Pak.

Ejemplo 8: Preparación de 1-benceno-4-[¹²³I]-yodo-1H-1,2,3-triazol (Ejemplo Profético).

5 A un vial Wheaton cargado con polvo de cobre (tamaño de partícula ~40 mesh) y colocado en hielo se añade [¹²³I]-yodoacetileno (Ejemplo 3, 4 ó 5) y bencil azida. Tras la adición de los reactivos, se retira el baño de hielo y la reacción se incuba a temperatura ambiente aplicando calor según sea requerido.

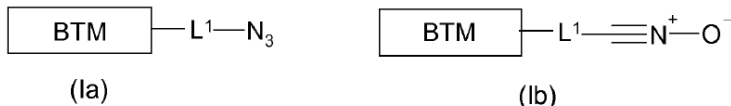
Ejemplo 9: Preparación de isoxazoles radioyodados (Ejemplo Profético).

10 A un vial Wheaton de 3 mL enfriado que contiene [¹²³I]-yodoacetileno (Ejemplo 3, 4 ó 5) se añade una disolución del óxido de nitrilo disuelto en THF (0,1-0,5 mL). La mezcla de reacción se agita adicionalmente a 0°C durante 15 minutos antes de permitir que se caliente hasta temperatura ambiente y agitar durante otros 30-60 minutos hasta que se haya consumido todo el yodoacetileno. Tras dilución en agua, el [¹²³I] isoxazol se purifica mediante HPLC.

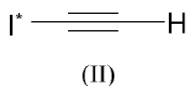
REIVINDICACIONES

1. Un método de radioyodación de un resto biológico dirigido a diana, comprendiendo dicho método:

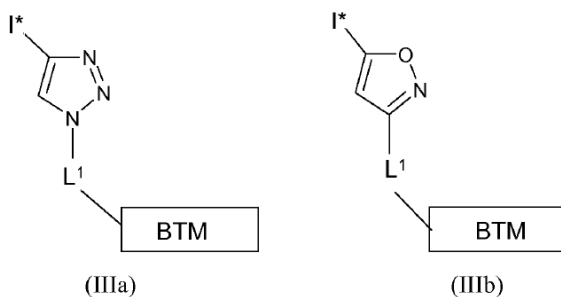
(i) la provisión de un compuesto de Fórmula (Ia) o (Ib):



5 (ii) la reacción de dicho compuesto de Fórmula (Ia) o (Ib) con un compuesto de Fórmula (II):



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



10 en donde:

I* es un radioisótopo de yodo;

L¹ es un grupo ligando que puede estar presente o ausente;

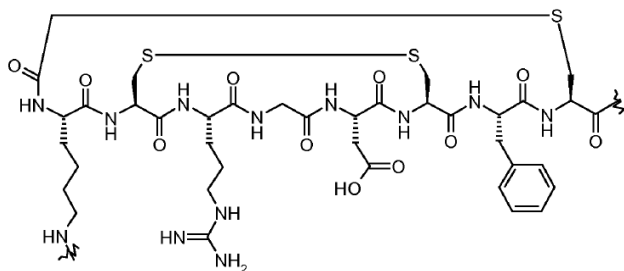
BTM es el resto biológico dirigido a diana.

2. El método según la reivindicación 1, en el que I* se elige entre ¹²³I, ¹²⁴I o ¹³¹I.

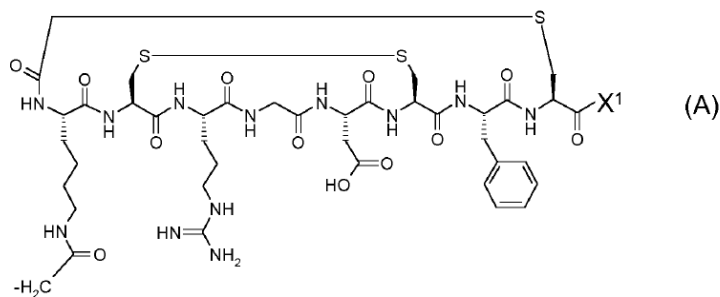
15 3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el BTM es un aminoácido individual, un péptido de 3-100 unidades, un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático, un inhibidor enzimático o un compuesto de unión a receptor.

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

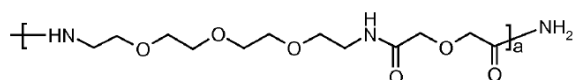
20 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que BTM es un péptido que comprende el fragmento:



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

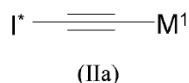


en donde X¹ es -NH₂ o



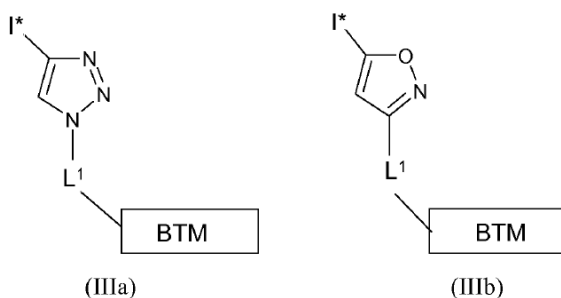
en donde a es un número entero entre 1 y 10.

- 5 **7.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el catalizador de Cu(I) comprende cobre elemental.
- 8.** El método según la reivindicación 7, en donde el cobre elemental tiene un tamaño de partícula en el rango de 0,001 a 1 mm.
- 10 **9.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el compuesto de Fórmula (II) se genera in situ mediante la desprotección de un compuesto de Fórmula (IIa):



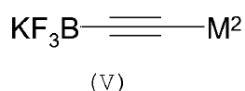
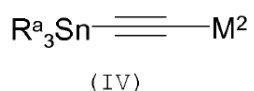
en donde M¹ es un grupo protector de alquino.

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



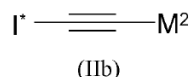
20 en donde I* y L¹ son tal como se han definido en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, y el BTM es tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 6.

- 13.** Una composición radiofarmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto según la reivindicación 12, junto con un medio portador biocompatible.
- 14.** Un método de preparación del compuesto de Fórmula II tal como se ha definido en la reivindicación 1, que comprende:
- 25 (i) la reacción de un precursor de Fórmula IV o de Fórmula V



en donde M^2 es H o M^1 , en donde M^1 es como se ha definido en la reivindicación 9, y cada R^a es de forma independiente alquilo C_{1-4} ;

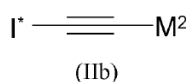
5 con un suministro de ion yoduro radiactivo en presencia de un agente oxidante, para dar lugar al compuesto de Fórmula IIb:



en donde I^* es tal como se ha definido en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2;

(ii) cuando M^2 es un grupo M^1 , la desprotección para eliminar el grupo M^1 .

15. Un compuesto de Fórmula (IIb), útil en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11:



10

en donde I^* es tal como se ha definido en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2; y

M^2 es tal como se ha definido en la reivindicación 14.

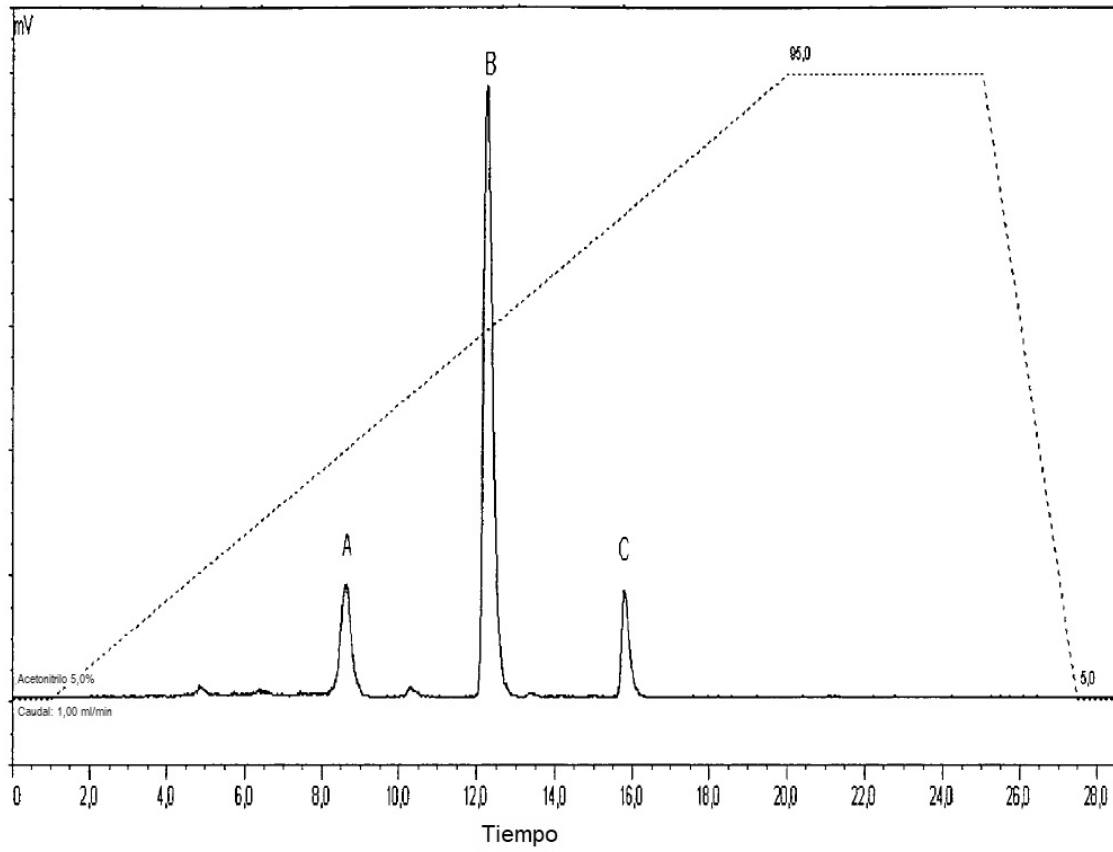
16. El uso de un compuesto según la reivindicación 12 o la reivindicación 15 para la fabricación de un radiofármaco para uso en un método de obtención de imágenes *in vivo* o de radioterapia *in vivo*.

15 17. El uso de un aparato sintetizador automatizado para llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 ó 14.

18. Una casete estéril de uso individual adecuada para uso en el método de sintetizador automatizado de la reivindicación 17, comprendiendo dicha casete los reactivos no radiactivos necesarios para llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 ó 14 de forma estéril apirogénica.

20

Figura 1. Análisis de RP-HPLC de [^{123}I]-yodoacetileno preparado usando ácido peracético.



A = yoduro oxidado sin reaccionar

B = ^{123}I -yodoacetileno

C = ^{123}I -diyodoacetileno

Figura 2.

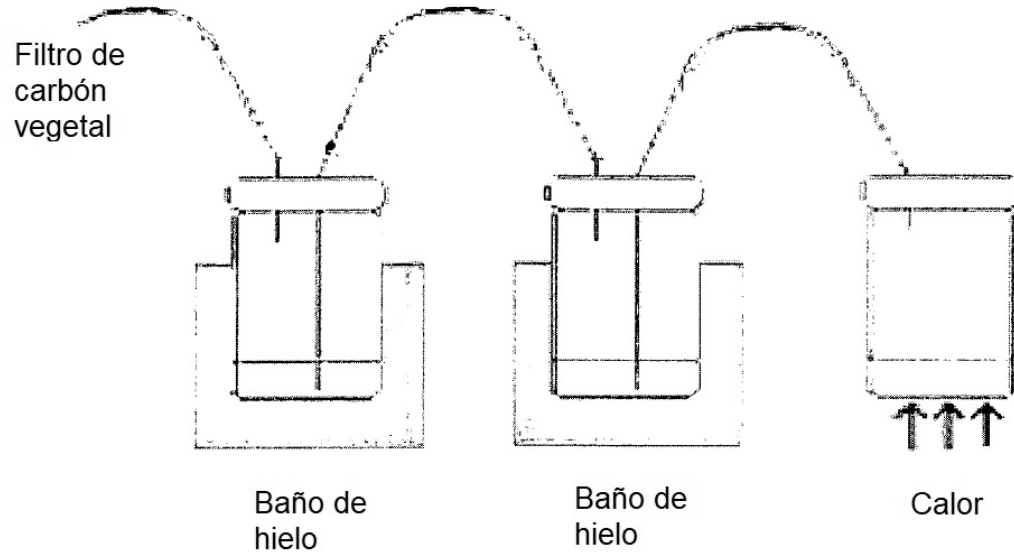
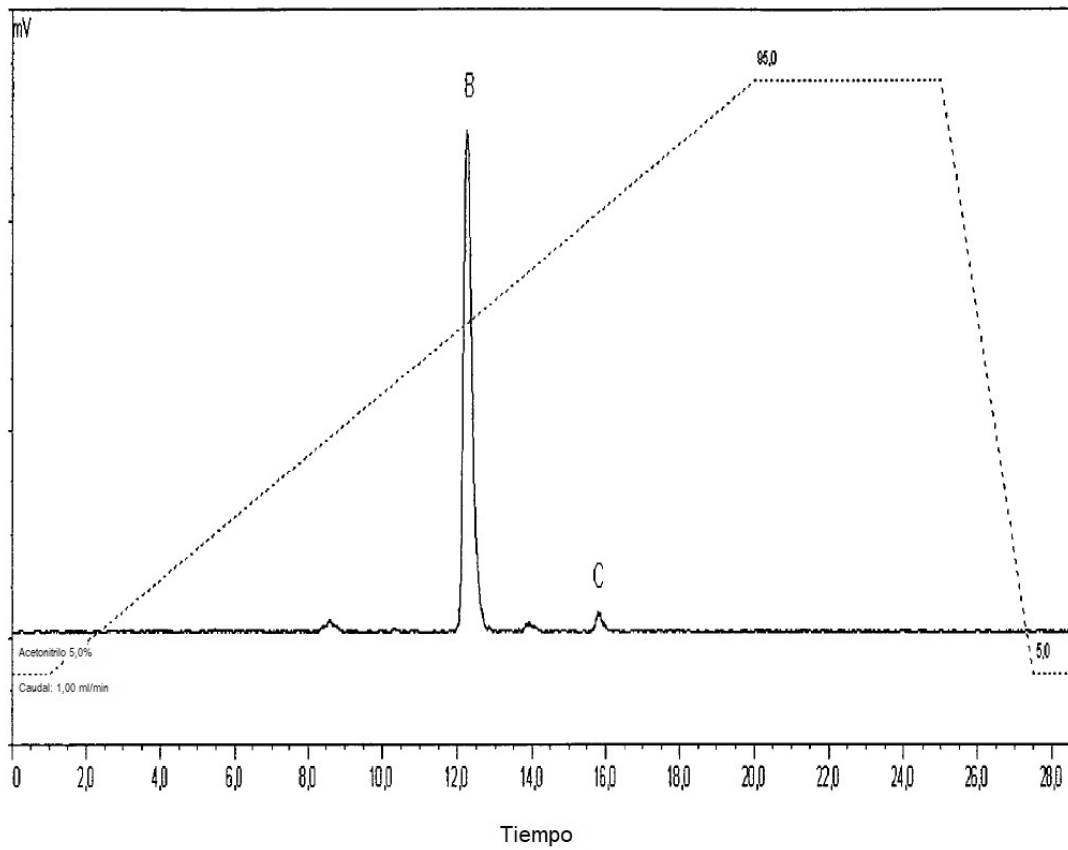


Figura 3. El análisis de HPLC aprox. 10 minutos después de la destilación mostró [^{123}I]-yodoacetileno con una RCP de 94%.



B = ^{123}I -yodoacetileno

C = ^{123}I -diyodoacetileno