

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 102**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/08** (2006.01)  
**A61K 51/04** (2006.01)  
**C07B 59/00** (2006.01)  
**C07C 251/32** (2006.01)  
**C07C 259/02** (2006.01)  
**C07K 1/13** (2006.01)  
**G01N 33/534** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2011 PCT/EP2011/071506**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072736**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2011 E 11788862 (8)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2646060**

54 Título: **Método de radioconjugación**

30 Prioridad:

**01.12.2010 GB 201020314**  
**19.04.2011 US 201161476805 P**  
**19.04.2011 GB 201106593**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.07.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**INDREVOLL, BARD**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 675 102 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 radioconjugación

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la radiofarmacéutica para imagenología *in vivo*, en particular a un método de marcar una molécula directora biológica con un radioisótopo. El método de la invención es particularmente adecuado para uso con un aparato sintetizador automatizado.

**Antecedentes de la invención**

El documento WO 2004/080492 A1 divulga un método para la radiofluoración de un vector director biológico, que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (I) con un compuesto de fórmula (II):



10

o

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



en las que:

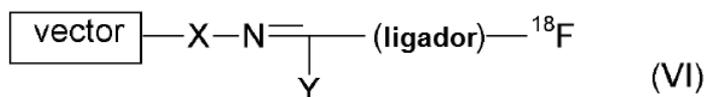
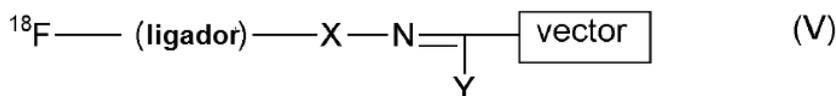
15 R1 es un resto aldehído, un resto cetona, un aldehído protegido tal como un acetal, una cetona protegida tal como un cetal o una funcionalidad, tal como diol o residuo de serina N-terminal, que puede oxidarse rápida y eficazmente a un aldehído o cetona usando un agente oxidante;

R2 es un grupo seleccionado de amina primaria, amina secundaria, hidroxilamina, hidrazina, hidrazida, aminoxi, fenilhidrazina, semicarbazida y tiosemicarbazida, y es preferiblemente un grupo hidrazina hidrazida o aminoxi;

20 R3 es un grupo seleccionado de amina primaria, amina secundaria, hidroxilamina, hidrazina, hidrazida, aminoxi, fenilhidrazina, semicarbazida o tiosemicarbazida, y es preferiblemente un grupo hidrazina, hidrazida o aminoxi;

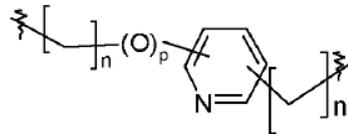
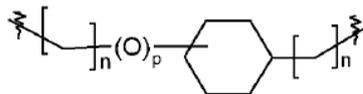
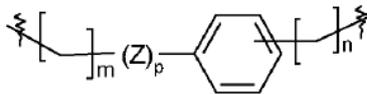
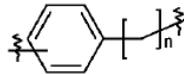
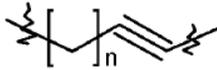
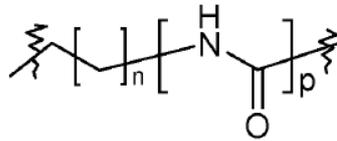
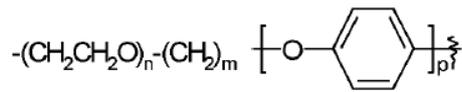
R4 es un resto aldehído, un resto cetona, un aldehído protegido tal como un acetal, una cetona protegida tal como un cetal o una funcionalidad, tal como diol o residuo de serina N-terminal, que puede oxidarse rápida y eficazmente a un aldehído o cetona usando un agente oxidante;

25 dando un conjugado de fórmula (V) o (VI) respectivamente:



en las que X es -CO-NH-, -NH-, -O-, -NHCONH- o -NHCSNH-, y es preferiblemente -CO-NH-, -NH- u -O-; Y es H, sustituyentes alquilo o arilo; y

el grupo ligador de los compuestos de fórmulas (II), (IV), (V) y (VI) se selecciona de



5

en las que:

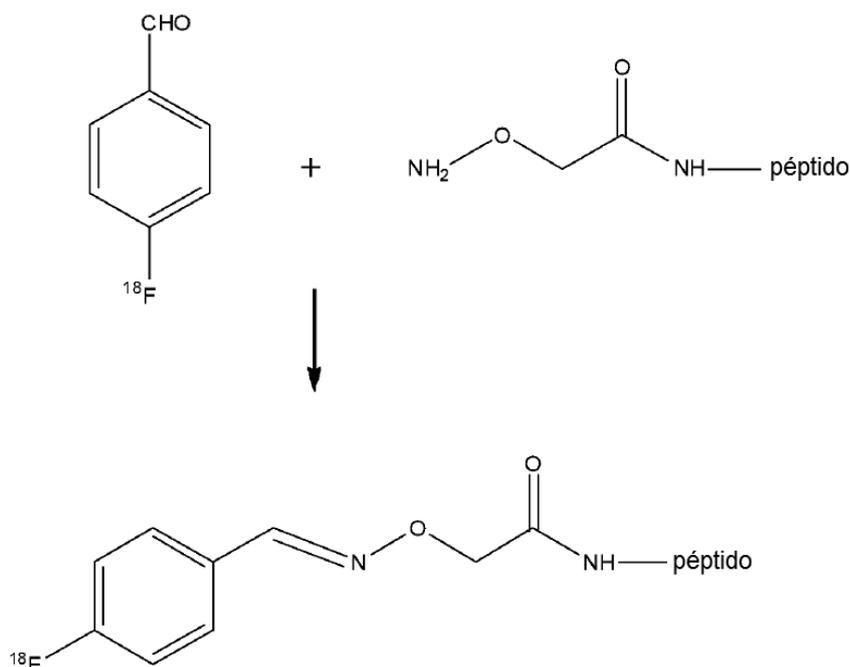
n es un entero de 0 a 20;

10 m es un entero de 1 a 10;

p es un entero de 0 o 1;

Z es O o S.

15 Poethko *et al* [J.Nucl.Med., 45(5), 892-902 (2004)] divulgan un método de radiomarcaje de péptidos con el radioisótopo  $^{18}\text{F}$ , en el que se condensa un péptido funcionalizado con aminoxi con  $^{18}\text{F}$ -fluorobenzaldehído, dando un péptido marcado que tiene un grupo de enlace éter de oxima como sigue:



Schottelius *et al.* [Bioconj.Chem., 19(6), 1256-1268 (2008)] desarrollaron adicionalmente el método de Poethko *et al.* Schottelius *et al.* usan un péptido funcionalizado con aminoxi en el que la amina del grupo aminoxi está protegida con un grupo protector *N*-Boc (Boc= *terc*-butiloxicarbonilo). El péptido funcionalizado con aminoxi deseado se genera *in situ* en presencia de [<sup>18</sup>F]-fluorobenzaldehído mediante la desprotección del grupo *N*-Boc a pH ácido (pH= 2) a 75 °C. Schottelius *et al.* usan un exceso 5 veces molar de precursor protegido con Boc, porque la desprotección no era cuantitativa en las condiciones de reacción.

Mezo *et al.* [J.Pept.Sci., 17, 39-46 (2010)] describen algunos de los problemas asociados a la química de ligadura de oxima anterior de péptidos funcionalizados con aminoxi protegidos con Boc. Por tanto, es conocido que el aminoxipéptido libre inicialmente formado puede acilar aminoxipéptido protegido con Boc no reaccionado, conduciendo a subproductos indeseables. Es también conocido que la reactividad del grupo aminoxi libre del péptido funcionalizado es alta frente a los compuestos de carbonilo. En consecuencia, puede ocurrir una condensación indeseada con cualquier aldehído o cetona accidental presente en la mezcla de reacción o en cualquier etapa de purificación posterior. Tales aldehídos o cetonas podrían ser trazas de acetona presente en los disolventes usados o de formaldehído (p.ej. de plastificantes). Mezo *et al.* están interesados en resolver este problema tanto para la conjugación de fármacos anticancerosos como de [<sup>18</sup>F]-fluorobenzaldehído con péptidos. Mezo *et al.* resuelven el problema llevando a cabo la desprotección del Boc-aminoxipéptido en presencia de un exceso 10 veces molar de ácido (aminoxi)acético (Aoa) libre como "agente de captura de carbonilo". El aminoxipéptido desprotegido y el Aoa en exceso se liofilizan entonces y se almacenan a 4 °C. Inmediatamente antes de la reacción de ligadura de oxima, se reconstituye la mezcla liofilizada y se separa el Aoa en exceso por HPLC o cartucho Sep-Pak más C18. Mezo *et al.* proporcionan un ejemplo en que se conjuga 4-fluorobenzaldehído no radiactivo (concretamente, <sup>19</sup>F) con un péptido de somatostatina funcionalizado con aminoxi usando esta técnica. Mezo *et al.* no proporcionan ningún dato sobre el radiomarcaje con <sup>18</sup>F.

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos mejorados de radiomarcaje de péptidos y otras moléculas directoras biológicas.

### La presente invención

La presente invención proporciona un método mejorado para radiomarcarse una molécula directora biológica (BTM) mediante grupos funcionales aminoxi. La invención proporciona un enfoque de grupo protector que supera los problemas de impureza reconocidos en la técnica anterior sin necesidad de:

- (i) un "agente de captura de carbonilo" junto con almacenamiento prolongado a 4 °C;
- (ii) condiciones fuertemente ácidas para retirar el grupo protector protegido con *N*-Boc-aminoxi;
- (iii) uso de un exceso de material de partida protegido con *N*-Boc-aminoxi.
- (iv)

La opción (i) no es atractiva con fines de radiomarcaje, puesto que el reactivo de captura de carbonilo en exceso debe retirarse totalmente antes para prevenir reacciones secundarias que implican al reactivo de captura de carbonilo. Esa etapa de retirada requiere cromatografía preparativa o similar. Además, la necesidad de almacenamiento del precursor a 4 °C es menos que ideal.

5 La técnica anterior enseña también que puede usarse un precursor aminoxi protegido con Boc, la opción (ii). El problema con ese enfoque es que se requieren condiciones fuertemente ácidas para la desprotección de Boc, tales como ácido trifluoroacético (TFA) al 95 % o TFA al 25-50 %/disolvente orgánico (p.ej. DCM), ambos a temperatura ambiente. Algunas publicaciones sugieren también calentar a 60-75 °C. Tal ácido fuerte y/o calentamiento pueden dañar la molécula directora biológica. También es necesario retirar el ácido fuerte en exceso en una etapa adicional, típicamente por evaporación del TFA, lo que puede llevar tiempo. Sin embargo, el ácido trifluoroacético genera también sales que no se retirarían por evaporación, y típicamente requieren trituración para retirarse. El método de la presente invención consigue una desprotección completa usando solo ácido acuoso diluido (p.ej., TFA acuoso al 2,5 % o ácido clorhídrico acuoso 0,01 M) a temperatura ambiente, o TFA acuoso al 0,1 % a 60 °C. Tales condiciones son más compatibles con las BTM y obvian la necesidad de etapas de purificación adicionales.

15 En tercer lugar, la técnica anterior enseña que debería usarse un exceso molar de 5 veces de un precursor aminoxi-BTM protegido con Boc, la opción (iii). Esto es debido a que la desprotección de Boc es incompleta y es importante consumir todo el reactante [<sup>18</sup>F]-fluorobenzaldehído. Ese enfoque es indeseable con fines radiofarmacéuticos, debido a que cualquier exceso de precursor de BTM no marcado presente en el producto competiría probablemente con la BTM radiomarcada por el sitio de interés biológico *in vivo*, y por ello se arriesga a inhibir la captación del agente de imagenología deseado. En consecuencia, sería necesario retirar el exceso de precursor no radiactivo del producto radiomarcado antes del uso. En contraposición, el método de la presente invención permite una desprotección eficaz y completa en condiciones suaves, de modo que es innecesario emplear un exceso de material de partida protegido.

25 Las BTM protegidas de la presente invención tienen la ventaja de que se suprime la sobreacilación durante desprotección y radiomarcaje.

Puesto que el método de la presente invención requiere menos etapas, y evita la necesidad de algunas de las etapas de purificación por cromatografía de la técnica anterior, es también tanto más eficaz como más susceptible de automatización, p.ej. usando un aparato sintetizador automatizado.

30 Es una ventaja adicional de los grupos protectores de la presente invención que son estables a pH neutro y básico y en disolución acuosa de ácido acético de hasta el 50 %, de modo que el producto protegido puede purificarse usando cromatografía de HPLC usando ácido acético acuoso al 0,1 % como fase móvil. Por ello, una BTM protegida usando el enfoque de la presente invención puede purificarse en una variedad de condiciones que pueden ajustarse a la estabilidad de la BTM.

### Descripción detallada de la invención

35 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para radiomarcarse una molécula directora biológica que comprende:

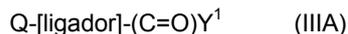
- (i) la provisión de un compuesto protegido de fórmula (IA)



- 40 (ii) la desprotección del compuesto protegido de fórmula (IA) de la etapa (i) dando un compuesto de aminoxi de fórmula (IIA)



- (iii) la condensación del compuesto de aminoxi de fórmula (IIA) con un compuesto de carbonilo de fórmula (IIIA)



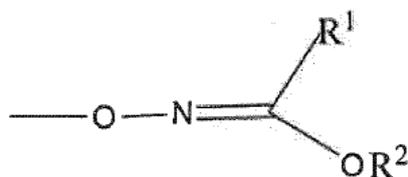
dando un conjugado radiomarcado de fórmula (IVA):



en la que:

[BTM] es una molécula directora biológica;

X<sup>1</sup> es un grupo aminoxi protegido de fórmula:



en la que  $R^1$  y  $R^2$  se eligen independientemente de alquilo  $C_{1-3}$ , fluoroalquilo  $C_{1-3}$  o arilo  $C_{4-6}$ ;

Q es un grupo que comprende un radioisótopo adecuado para imagenología por PET o SPECT *in vivo*;

$Y^1$  es H, alquilo  $C_{1-6}$  o arilo  $C_{4-10}$ ,

5 [ligador] es un grupo ligador.

El término "radiomarcaje" tiene su significado convencional, concretamente, un proceso en el que se enlaza covalentemente un radioisótopo, en este caso a la BTM.

Se entiende por el término "resto director biológico" (BTM) un compuesto que, después de la administración, se capta selectivamente o se localiza en un sitio particular del cuerpo de mamífero *in vivo*. Tales sitios pueden estar implicados, por ejemplo, en un estado patológico particular o ser indicativos de cómo funciona un órgano o proceso metabólico.

El término "desprotección" tiene su significado convencional en el campo de la química y/o radioquímica, concretamente la retirada de un grupo protector. Se entiende por el término "grupo protector" o  $P^{GP}$  un grupo que inhibe o suprime reacciones químicas indeseables, pero que se diseña para ser suficientemente reactivo para que pueda escindirse del grupo funcional en cuestión en condiciones suficientemente suaves que no modifiquen el resto de molécula. Después de la desprotección, se obtiene el producto deseado. Se describe el uso de grupos protectores en *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4ª edición, Theodorora W. Greene y Peter G. M. Wuts, [Wiley Blackwell, (2006)].

El término "grupo aminoxi" tiene su significado convencional, y hace referencia a un sustituyente de fórmula  $-O-NH_2$ , preferiblemente  $-CH_2-O-NH_2$ .

El término "grupo que comprende un radioisótopo" significa que un grupo funcional comprende el radioisótopo o que el radioisótopo está enlazado como una especie adicional. Cuando un grupo funcional comprende el radioisótopo, esto significa que la estructura química contiene ya el elemento químico en cuestión, y el isótopo radiactivo de ese elemento se presenta a un nivel significativamente por encima del nivel de abundancia natural de dicho isótopo. Tales niveles elevados o enriquecidos de isótopo son adecuadamente al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, lo más preferiblemente al menos 20 veces e idealmente al menos 50 veces el nivel de abundancia natural del isótopo en cuestión, o están presentes a nivel en que el nivel de enriquecimiento del isótopo en cuestión es de 90 a 100 %. Los ejemplos de tales grupos funcionales incluyen grupos fluoroalquilo con niveles elevados de  $^{18}F$ , tales que el átomo de  $^{18}F$  está dentro de la estructura química. Cuando el radioisótopo es un radiometal, tal como  $^{99m}Tc$ ,  $^{68}Ga$  o  $^{64}Cu$ , la "especie adicional" sería típicamente un agente quelante. Cuando el radioisótopo es radioyodo, entonces la especie adicional sería un grupo fenilo o vinilo, como es conocido en la materia, para estabilizar el enlace carbono-yodo para desyodación metabólica *in vivo*.

Los términos "PET" y "SPECT" tienen su significado convencional en el campo de la radiofarmacia y hacen referencia a tomografía de emisión de positrones y tomografía de emisión de fotón único, respectivamente.

Se entiende por el término "grupo ligador" un grupo bivalente de fórmula  $-(A)_m$  en la que cada A es independientemente  $-CR_2-$ ,  $-CR=CR-$ ,  $-C=C-$ ,  $-CR_2CO_2-$ ,  $-CO_2CR_2-$ ,  $-NRCO-$ ,  $-CONR-$ ,  $-NR(C=O)NR-$ ,  $-NR(C=S)NR-$ ,  $-SO_2NR-$ ,  $-NRSO_2-$ ,  $-CR_2OCR_2-$ ,  $-CR_2SCR_2-$ ,  $-CR_2NRCR_2-$ , un grupo cicloheteroalquileo  $C_{4-8}$ , un grupo cicloalquileo  $C_{4-8}$ , un grupo arileno  $C_{5-12}$  o un grupo heteroarileno  $C_{3-12}$ , en los que cada R se elige independientemente de: H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueno  $C_{2-4}$ , alquino  $C_{2-4}$ , alcoxilalquilo  $C_{1-4}$  o hidroxialquilo  $C_{1-4}$ ;

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

En la fórmula IA, el grupo  $X^1$  está adecuadamente enlazado con un grupo funcional de BTM como se describe a continuación.

#### Rasgos preferidos

En el primer aspecto, preferiblemente  $R^1$  y  $R^2$  son ambos independientemente alquilo  $C_{1-2}$ . Más preferiblemente,  $R^1$  y  $R^2$  se eligen de metilo y etilo, lo más preferiblemente  $R^1$  es metilo y  $R^2$  es etilo, concretamente un grupo protector etoxietilideno ("Eei").

El método del primer aspecto se lleva a cabo preferiblemente de tal modo que se usa el compuesto de fórmula (IA)

en la etapa (i), de modo que el compuesto de aminoxi de la etapa (ii) es de fórmula (IIA) y el conjugado radiomarcado es de fórmula (IVA). Es relativamente fácil introducir selectivamente un grupo aminoxi en un BTM.

En el primer aspecto, Y<sup>1</sup> es preferiblemente H, concretamente el compuesto de carbonilo de fórmula (IIIA) o (IIIB) es un aldehído.

- 5 En el primer aspecto, Q se elige preferiblemente de <sup>18</sup>F, <sup>123</sup>I, <sup>99m</sup>Tc, <sup>68</sup>Ga o <sup>64</sup>Cu. Más preferiblemente, Q es <sup>18</sup>F. Cuando Q es <sup>18</sup>F, es un compuesto de carbonilo preferido de fórmula (IIIA) el <sup>18</sup>F-4-fluorobenzaldehído.

Después de la etapa (iii) del método del primer aspecto, puede separarse preferiblemente el producto conjugado de fórmula (IVA) y/o purificarse usando técnicas estándares tales como cromatografía.

- 10 El BTM puede ser de origen sintético o natural, pero es preferiblemente sintético. El término "sintético" tiene su significado convencional, concretamente artificial en contraposición con aislarse de fuentes naturales p.ej. del cuerpo de mamífero. Tales compuestos tienen la ventaja de que su fabricación y perfil de impurezas pueden controlarse totalmente. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos de origen natural están fuera del alcance del término "sintético" como se usa en la presente memoria. El peso molecular del BTM es preferiblemente de hasta 30.000 dáltones. Más preferiblemente, el peso molecular está en el intervalo de 200 a 20.000 dáltones, lo más preferiblemente de 300 a 18.000 dáltones, prefiriéndose especialmente de 400 a 16.000 dáltones. Cuando el BTM no es un péptido, el peso molecular del BTM es preferiblemente de hasta 3.000 dáltones, más preferiblemente de 200 a 2.500 dáltones, lo más preferiblemente de 300 a 2.000 dáltones, prefiriéndose especialmente de 400 a 1.500 dáltones.

- 20 El BTM comprende preferiblemente: un péptido de 3-100 unidades, análogo peptídico, peptoide o peptidomimético que puede ser un péptido lineal o cíclico o combinación de los mismos; un solo aminoácido; un sustrato enzimático, antagonista enzimático, agonista enzimático (incluyendo agonista parcial) o inhibidor enzimático; un compuesto de unión a receptor (incluyendo un sustrato de receptor, antagonista, agonista o sustrato); oligonucleótidos o fragmentos de oligo-ADN u oligo-ARN. Más preferiblemente, el BTM comprende un Affibody™ o un solo aminoácido, 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.

- 30 Se entiende por el término "péptido" un compuesto que comprende dos o más aminoácidos, como se definen a continuación, ligados por un enlace peptídico (concretamente, un enlace amida que liga la amina de un aminoácido con el carboxilo de otro). El término "peptidomimético" o "mimético" hace referencia a compuestos biológicamente activos que imitan la actividad biológica de un péptido o una proteína pero que no son ya de naturaleza peptídica, es decir, ya no contienen enlaces peptídicos (es decir, enlaces amida entre aminoácidos). Aquí, el término peptidomimético se usa en un sentido más amplio para incluir moléculas que ya no son de naturaleza completamente peptídica, tales como pseudopéptidos, semipéptidos y peptoides. El término "análogo peptídico" hace referencia a péptidos que comprenden uno o más análogos aminoacídicos, como se describen a continuación. Véase también *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, M. Goodman *et al*, Houben-Weyl E22c, Thieme.

- 35 Se entiende por el término "aminoácido" un L- o D-aminoácido, análogo aminoacídico (p.ej., naftilalanina) o mimético de aminoácido que puede ser de origen natural o de origen puramente sintético, y puede ser ópticamente puro, concretamente un solo enantiómero y por ello quiral, o una mezcla de enantiómeros. Se usan en la presente memoria las abreviaturas de tres letras o una letra convencionales para aminoácidos. Preferiblemente, los aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros. Se entiende por el término "mimético de aminoácido" análogos sintéticos de aminoácidos de origen natural que son isoésteres, concretamente que se han diseñado para imitar la estructura estérica y electrónica del compuesto natural. Tales isoésteres son bien conocidos por los especialistas en la materia e incluyen desipéptidos, retroinversopéptidos, 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 útiles en agentes de imagenología *in vivo*.

- 45 Las moléculas de Affibody™ están basadas en el dominio de 58 residuos aminoacídicos derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica. Los aficuerpos pueden usarse en forma monomérica o dimérica, y se han revisado por Nygren [*FEBS J.*, 275, 2668-2676 (2008)] y Nilsson *et al*. [*Curr.Opin.Drug.Disc.Dev.*, 10, 167-175 (2007)]. El tamaño relativamente pequeño de estos aficuerpos debería permitir una mejor penetración en el tejido diana y depuración de la sangre en comparación con anticuerpos que son 10 a 20 veces mayores (~150 kDa). Los aficuerpos tienen también la ventaja de que son estables en un intervalo de condiciones de pH (pH 5,5 a 11).

- 55 Cuando el BTM es un sustrato enzimático, antagonista enzimático, agonista enzimático, inhibidor enzimático o compuesto de unión a receptor, es preferiblemente no peptídico, y más preferiblemente es sintético. Se entiende por "no peptídico" un compuesto que no comprende ningún enlace peptídico, concretamente un enlace amida entre dos residuos aminoacídicos. Los sustratos, antagonistas, agonistas o inhibidores enzimáticos adecuados incluyen glucosa y análogos de glucosa; ácidos grasos o elastasa, angiotensina II o inhibidores de metaloproteínasa. Los compuestos de unión a receptor sintéticos adecuados incluyen estradiol, estrógeno, progestina, progesterona y otras hormonas esteroideas; ligandos del receptor de dopamina D-1 o D-2 o transportadores de dopamina tales como

tropanos; y ligandos del receptor de serotonina.

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

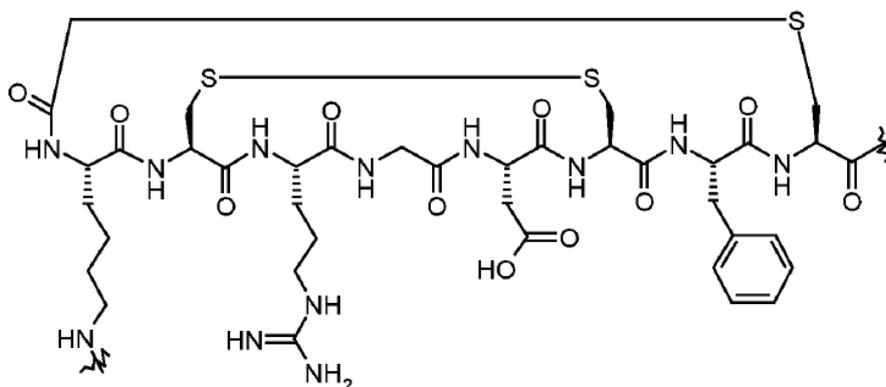
5 Cuando el BTM es un sustrato enzimático, antagonista enzimático, agonista enzimático o inhibidor enzimático, son tales moléculas directoras biológicas preferidas de la presente invención las moléculas pequeñas de tipo fármaco sintéticas, concretamente moléculas farmacéuticas. Son ligandos transportadores de dopamina preferidos tales como tropanos; ácidos grasos; ligandos del receptor D-2 de dopamina; benzamidas; anfetaminas; bencilguanidinas, iomazenil, benzofurano (IBF) o ácido hipúrico.

10 Cuando el BTM es un péptido, tales péptidos preferidos incluyen péptido A, péptido B, péptido C y péptido D como se definen a continuación, así como:

- somatostatina, octreotida y análogos,
- péptidos que se unen al receptor de ST, donde ST hace referencia a la toxina termoestable producida por *E. coli* y otros microorganismos;
- bombesina;
- 15 - péptido intestinal vasoactivo;
- neurotensina;
- fragmentos de laminina; p.ej. YIGSR, PDSGR, IKVAV, LRE y KCQAGTFALRGDPQG;
- péptidos de N-formilo quimiotácticos para dirigir a sitios de acumulación de leucocitos,
- factor de plaquetas 4 (PF4) y fragmentos del mismo,
- 20 - fragmentos peptídicos de  $\alpha$ 2-antiplasmina, fibronectina o beta-caseína, fibrinógeno o tromboespondina. Las secuencias aminoácidas de  $\alpha$ 2-antiplasmina, fibronectina, beta-caseína, fibrinógeno y tromboespondina pueden encontrarse en las siguientes referencias: precursor de  $\alpha$ 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 tromboespondina-1 [V.Dixit *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83, 5449, (1986)]; RF. Doolittle, *Ann. Rev. Biochem.*, 53, 195, (1984);
- 25 - 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);
- angiotensina I: Asp-Arg-Val- Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu.

30 Los péptidos de BTM más preferidos se eligen de péptido A, péptido B y péptido C, como se definen a continuación:

- (i) péptido A= un péptido de Arg-Gly-Asp;
- (ii) péptido B= un péptido de Arg-Gly-Asp que comprende el fragmento



- (iii) péptido C= un péptido cíclico de unión a c-Met que comprende la secuencia aminoácida:

35  $-Cys^a-X^1-Cys^c-X^2-Gly-Pro-Pro-X^3-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X^4-X^5-X^6-$

en la que  $X^1$  es Asn, His o Tyr;  
 $X^2$  es Gly, Ser, Thr o Asn;  
 $X^3$  es Thr o Arg;  
 $X^4$  es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;  
5  $X^5$  es Ser o Thr;  
 $X^6$  es Asp o Glu;

y Cys<sup>a-d</sup> son cada uno residuos de cisteína tales que los residuos a y b, así como c y d, se ciclan formando dos enlaces disulfuro separados;

(iv) péptido D= un péptido lantibiótico de fórmula:

10 Cys<sup>a</sup>-Xaa-Gln-Ser<sup>b</sup>-Cys<sup>c</sup>-Ser<sup>d</sup>-Phe-Gly-Pro-Phe-Thr<sup>c</sup>-Phe-Val-Cys<sup>b</sup>-(HO-Asp)-Gly-Asn-Thr<sup>a</sup>-Lys<sup>d</sup>

en la que Xaa es Arg o Lys;

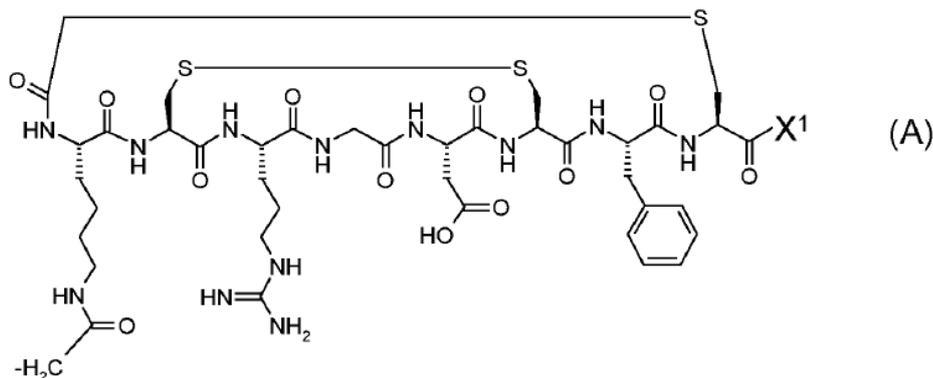
Cys<sup>a</sup>-Thr<sup>a</sup>, Ser<sup>b</sup>-Cys<sup>b</sup> y Cys<sup>c</sup>-Thr<sup>c</sup> están ligados covalentemente por enlaces tioéter;

Ser<sup>d</sup>-Lys<sup>d</sup> están ligados covalentemente por un enlace lisinoalanina;

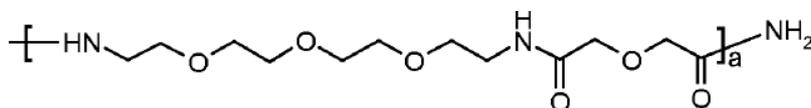
HO-Asp es ácido β-hidroxiaspártico.

15 Son péptidos de BTM especialmente preferidos péptido B, péptido C y péptido D.

Es el más preferido de tales péptidos B el péptido de fórmula (A):



en la que  $X^1$  es  $-NH_2$  o



20 en la que a es un entero de 1 a 10.

En la Fórmula A, a es preferiblemente 1.

Un péptido cíclico de unión a c-Met preferido tiene la secuencia:

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

25 Cuando el BTM es un péptido, uno o ambos extremos del péptido, preferiblemente ambos, tienen conjugados con los mismos un "grupo inhibidor del metabolismo" ( $M^G$ ). Tener ambos extremos peptídicos protegidos de este modo es importante para aplicaciones de imagenología *in vivo*, puesto que de otro modo se esperaría un metabolismo rápido con la pérdida consiguiente de afinidad de unión selectiva por el péptido de BTM. Se entiende por el término "grupo inhibidor del metabolismo" ( $M^G$ ) un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo enzimático, especialmente peptidasa tal como carboxipeptidasa, del péptido de BTM en cualquiera del extremo amino o el extremo carboxi. Tales grupos son particularmente importantes para aplicaciones *in vivo*, son bien conocidos por los  
30 especialistas en la materia y se eligen adecuadamente, para el extremo amino peptídico de: grupos N-acilados -NH(C=O)R<sup>G</sup> en que el grupo acilo -(C=O)R<sup>G</sup> tiene R<sup>G</sup> elegido de: grupos alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>3-10</sub> o comprende un

bloque de construcción de polietilenglicol (PEG). Son tales grupos M<sup>IG</sup> aminoterminales preferidos acetilo, benciloxicarbonilo o trifluoroacetilo, lo más preferiblemente acetilo.

Los grupos inhibidores del metabolismo adecuados para el extremo carboxilo peptídico incluyen: carboxamida, éster *terc*-butílico, éster bencilico, éster ciclohexílico, aminoalcohol o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG).

5 Es un grupo M<sup>IG</sup> adecuado para el residuo aminoácido carboxiterminal del péptido de BTM cuando la amina terminal del residuo aminoácido está N-alquilada con un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>, preferiblemente un grupo metilo. Tales grupos M<sup>IG</sup> preferidos son carboxamida o PEG, los más preferidos de tales grupos son carboxamida.

10 El método del primer aspecto se lleva a cabo preferiblemente de tal modo que las etapas (ii) y (iii) se lleven a cabo simultáneamente. De esa manera, se genera el compuesto de aminoxi libre de fórmula (IIA) *in situ*, y puede hacerse reaccionar por tanto con el compuesto de carbonilo de fórmula (IIIA) que está ya presente en el medio de reacción, a medida que se genera. Se espera que esto mejore el rendimiento del producto radioconjugado deseado, puesto que se minimiza la oportunidad de reacciones secundarias del compuesto de aminoxi libre relativamente reactivo.

15 La etapa de condensación (iii) del primer aspecto se lleva a cabo preferiblemente en presencia de anilina o una sal de la misma (p.ej., hidrocloreuro de anilina). El uso de anilina en ligaduras de oxima se ha mostrado eficaz para aumentar la tasa de reacción global y para permitir que tales reacciones ocurran a valores de pH menos ácidos [Dirksen, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 45, 7581-7584 (2006)].

20 El método del primer aspecto se lleva a cabo preferiblemente de tal modo que se obtenga el conjugado radiomarcado de fórmula (IVA) en una forma adecuada para administración a mamíferos, más preferiblemente en una forma adecuada para uso como producto radiofarmacéutico para imagenología *in vivo* como se describe en el segundo aspecto (a continuación).

El método del primer aspecto se lleva a cabo preferiblemente usando un aparato sintetizador automatizado como se describe en el segundo y cuarto aspectos (a continuación).

25 El éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido N-(1-etoxietiliden)-2-aminoxiacético está disponible comercialmente en Iris Biotech GmbH (Waldershofen 49-51,95615 Marktredwitz, Alemania). Ese éster activo de aminoxi protegido con Eei puede conjugarse directamente con un BTM que contiene amina (p.ej. que tiene un residuo de Lys), dando un compuesto protegido de fórmula (IA). Se describen rutas adicionales para péptidos protegidos con Eei por Dulery *et al.* [*Tetrahedron*, 63, 11952-11958 (2007)] y Foillard *et al.* [*J. Org. Chem.*, 73, 983-991 (2008)]. Dulery y Foillard describen también las condiciones adecuadas para la desprotección del grupo protector Eei.

30 El compuesto de carbonilo de Fórmula IIIA puede obtenerse como sigue. El aldehído <sup>18</sup>F-fluorado puede ser <sup>18</sup>F-fluorobenzaldehído o *p*-(di-*terc*-butil)-<sup>18</sup>F-fluorosilil)benzaldehído (<sup>18</sup>F-SiFA-A). Los aldehídos alifáticos marcados con <sup>18</sup>F de fórmula <sup>18</sup>F(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>q</sub>CH<sub>2</sub>CHO, en que q es 3, pueden obtenerse por el método de Glaser *et al.* [*Bioconj. Chem.*, 19(4), 951-957 (2008)]. El <sup>18</sup>F-fluorobenzaldehído puede obtenerse por el método de Glaser *et al.* [*J. Lab. Comp. Radiopharm.*, 52, 327-330 (2009)]. El precursor de <sup>18</sup>F-fluorobenzaldehído, concretamente Me<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CHO·CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> puede obtenerse por el método de Haka *et al.* [*J. Lab. Comp. Radiopharm.*, 27, 823-833 (1989)].

35 El <sup>123</sup>I-benzaldehído puede prepararse a partir del correspondiente precursor de trimetilestaño, que se describe por Thumshirn *et al.* [*Chem. Eur. J.*, 9, 2717-2725 (2003)].

El compuesto de carbonilo de fórmula IIIA puede generarse opcionalmente *in situ* mediante desprotección de un derivado protegido adecuado. El uso de grupos protectores de carbonilo se describe en *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4ª edición, Theodorora W. Greene y Peter G. M. Wuts, [Wiley Blackwell, (2006)].

40 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de una composición radiofarmacéutica, en el que dicha composición radiofarmacéutica comprende el conjugado radiomarcado de fórmula (IVA) como se define en el primer aspecto, junto con un portador biocompatible en una forma adecuada para administración a mamífero, y dicho método de preparación comprende el método de radiomarcaje del primer aspecto.

45 Las realizaciones preferidas del conjugado radiomarcado de fórmula (IVA) en el segundo aspecto son como se describen en el primer aspecto (anteriormente).

50 Se entiende por la frase "en una forma adecuada para administración a mamífero" una composición que sea estéril, libre de pirógenos, que carezca de compuestos que producen efectos tóxicos o adversos y que se formule a un pH biocompatible (aproximadamente pH 4,0 a 10,5). Tales composiciones carecen de partículas que podrían causar el riesgo de embolias *in vivo*, y se formulan de modo que no ocurra esa precipitación en contacto con fluidos biológicos (p.ej. sangre). Tales composiciones contienen también solo excipientes biológicamente compatibles, y son preferiblemente isotónicas.

55 El "portador biocompatible" es un fluido, especialmente un líquido, en el que el radioconjugado puede suspenderse o preferiblemente disolverse, de tal modo que la composición sea fisiológicamente tolerables, concretamente, pueda administrarse al cuerpo de mamífero sin toxicidad o incomodidad indebida. El portador biocompatible es

adecuadamente un líquido portador inyectable tal como agua estéril libre de pirógenos para inyección; una disolución acuosa tal como solución salina (que puede equilibrarse ventajosamente de modo que el producto final para inyección sea isotónico); una disolución tampón acuosa que comprende un agente tamponador biocompatible (p.ej., tampón fosfato); una disolución acuosa de una o más sustancias ajustadoras 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 o polipropilenglicoles). Preferiblemente, el portador biocompatible es agua libre de pirógenos para inyección, solución salina isotónica o tampón fosfato.

El conjugado radiomarcado y el portador biocompatible se suministran en un vial o recipiente adecuado que comprende un envase sellado que permite el mantenimiento de la integridad estéril y/o la seguridad radiactiva, más opcionalmente un gas de espacio de cabeza inerte (p.ej. nitrógeno o argón), mientras que permite la adición y extracción de disoluciones por jeringa o cánula. Es uno de tales envases preferidos un vial sellado con adhesivo, en el que el cierre hermético se corruga con una solapa (típicamente de aluminio). El cierre es adecuado para perforación única o múltiple con una aguja hipodérmica (p.ej. un cierre de sello de septo corrugado) mientras que mantiene la integridad estéril. Tales envases tienen la ventaja adicional de que el cierre puede soportar el vacío si se desea (p.ej., para cambiar el gas de espacio de cabeza o disoluciones de desgasificación) y soporta cambios de presión tales como reducciones de presión sin permitir la entrada de gases atmosféricos externos, tales como oxígeno o vapor de agua.

Los envases de dosis múltiple preferidos comprenden un solo vial de gran formato (p.ej. de 10 a 50 cm<sup>3</sup> de volumen) que contiene múltiples dosis de paciente, con lo que pueden extraerse por tanto las dosis de pacientes individuales con jeringas de calidad clínica en diversos intervalos temporales durante la vida útil viable de la preparación para adecuarse a la situación clínica. Se diseñan jeringas prellenadas para contener una única dosis humana, o "dosis unitaria" y son por lo tanto preferiblemente una jeringa desechable u otra adecuada para uso clínico.

La composición radiofarmacéutica puede contener excipientes opcionales adicionales tales como: conservante antimicrobiano, agente de ajuste del pH, carga, radioprotector, solubilizante o agente de ajuste de la osmolalidad. Se entiende por el término "radioprotector" un compuesto que inhibe reacciones de degradación, tales como procesos redox, atrapando radicales libres altamente reactivos, tales como radicales libres que contienen oxígeno que surgen de la radiólisis del agua. Los radioprotectores de la presente invención se eligen adecuadamente de: ácido ascórbico, ácido *para*-aminobenzoico (concretamente, ácido 4-aminobenzoico), ácido gentísico (concretamente ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y sales de los mismos con un catión biocompatible como se describe anteriormente. Se entiende por el término "solubilizante" un aditivo presente en la composición que aumenta la solubilidad del agente de imagenología en el disolvente. Es uno de tales disolventes preferidos medios acuosos, y por ello el solubilizante preferiblemente mejora la solubilidad en agua. Tales solubilizantes adecuados incluyen: alcoholes C<sub>1-4</sub>; glicerina; polietilenglicol (PEG); propilenglicol; monooleato de polioxietilensorbitán; monooleato de sorbitán; polisorbatos; copolímeros de bloque de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno) (Pluronic<sup>TM</sup>); ciclodextrinas (p.ej., alfa, beta o gamma-ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina o hidroxipropil-γ-ciclodextrina) y lecitina.

Se entiende por el término "conservante antimicrobiano" un agente que inhibe el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos tales como bacterias, levaduras o mohos. El conservante antimicrobiano puede exhibir también algunas propiedades bactericidas, dependiendo de la dosificación empleada. El papel principal del conservante o conservantes antimicrobianos de la presente invención es inhibir el crecimiento de cualquiera de tales microorganismos en la composición farmacéutica. Sin embargo, el conservante antimicrobiano puede usarse opcionalmente también para inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos en uno o más componentes de kits usados para preparar dicha composición antes de la administración. El conservante o conservantes antimicrobianos adecuados incluyen: parabenos, concretamente metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno o butilparabeno o mezclas de los mismos; alcohol bencílico; fenol; cresol; cetrimida y timerosal. Son conservantes preferidos los parabenos.

El término "agente de ajuste del pH" significa un compuesto o mezcla de compuestos útiles para asegurar que el pH de la composición está dentro de límites aceptables (aproximadamente pH 4,0 a 10,5) para administración a humanos o mamíferos. Tales agentes de ajuste del pH adecuados incluyen tampones farmacéuticamente aceptables, tales como tricina, fosfato o TRIS [concretamente tris(hidroximetil)aminometano], y bases farmacéuticamente aceptables de los mismos tales como carbonato de sodio, bicarbonato de sodio o mezclas de los mismos. Cuando la composición se emplea en forma de kit, el agente de ajuste del pH puede proporcionarse opcionalmente en un vial o envase separado, de modo que el usuario del kit pueda ajustar el pH como parte de un procedimiento multietapa.

Se entiende por el término "carga" un agente voluminizador farmacéuticamente aceptable que pueda facilitar el manejo del material durante la producción y liofilización. Las cargas adecuadas incluyen sales inorgánicas tales como cloruro de sodio y azúcares o alcoholes de azúcar hidrosolubles tales como sacarosa, maltosa, manitol o trehalosa.

El método del segundo aspecto puede llevarse a cabo de diversos modos:

- a) técnicas de fabricación aséptica en que las etapas se llevan a cabo en un entorno de sala limpia;
- b) esterilización terminal, en que las etapas (i)-(iii) del primer aspecto se llevan a cabo sin usar fabricación aséptica, y se esterilizan entonces en la última etapa [p.ej., por irradiación gamma, calor seco por autoclave o tratamiento químico (p.ej. con óxido de etileno)];
- 5 c) metodología de kit, en que se hace reaccionar una formulación de kit no radiactivo estéril que comprende un precursor no radiactivo adecuado de fórmula (IA) y excipientes opcionales con el compuesto radiactivo de fórmula (IIIA);
- d) técnicas de fabricación asépticas en que las etapas se llevan a cabo usando un aparato sintetizador automatizado.

10 Se prefiere el método (d). Que se describe en el cuarto aspecto (a continuación).

Un precursor que comprende el compuesto protegido de fórmula (IA) en forma estéril es útil en el método del segundo aspecto.

Las realizaciones preferidas del compuesto de fórmula (IA) en el tercer aspecto son como se describen en el primer aspecto (anteriormente).

15 El "precursor" de fórmula (IA) comprende un derivado no radiactivo de BTM.

Tales precursores son sintéticos y pueden obtenerse convenientemente con buena pureza química. El "precursor" puede comprender además opcionalmente uno o más grupos protectores ( $P^{GP}$ ) para ciertos grupos funcionales de la molécula directora biológica. El  $P^{GP}$  es como se define en el primer aspecto (anteriormente).

20 Es una forma estéril preferida del compuesto protegido de fórmula (IA) un sólido liofilizado. Más preferiblemente, el precursor estéril se suministra como parte de un módulo como se describe a continuación.

Los métodos de obtención de compuestos estériles son como se describen para la composición radiofarmacéutica del segundo aspecto (anteriormente).

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

25 Preferiblemente, se usa el tercer aspecto para llevar a cabo el método del segundo aspecto, concretamente para preparar una composición radiofarmacéutica.

30 Se entiende por el término "sintetizador automatizado" un módulo automatizado basado en el principio de operaciones unitarias como se describe por Satyamurthy *et al* [Clin.Positr.Imag., 2(5), 233-253 (1999)]. El término "operaciones unitarias" significa que los procesos complejos se reducen a una serie de operaciones o reacciones sencillas, que pueden aplicarse a una serie de materiales. Tales sintetizadores automatizados se prefieren para el método de la presente invención, especialmente cuando se desea una composición radiofarmacéutica. Están comercialmente disponibles de una serie de suministradores [Satyamurthy *et al.* anteriormente], incluyendo: GE Healthcare; CTI Inc; Ion Beam Applications (Chemin du Cyclotron 3, B-1348 Louvain-La-Neuve, Bélgica); Raytest (Alemania) and Bioscan (EE.UU.).

35 Los sintetizadores automatizados comerciales proporcionan también envases adecuados para el desecho radiactivo líquido generado como resultado de la preparación farmacéutica. Los sintetizadores automatizados no se dotan típicamente de escudo de radiación, puesto que se diseñan para emplearse en una celda de trabajo radiactiva adecuadamente configurada. La celda de trabajo radiactiva proporciona suficiente escudo de radiación para proteger al operario de la dosis de radiación potencial, así como ventilación para retirar los vapores químicos y/o radiactivos.

40 El sintetizador automatizado comprende preferiblemente un módulo.

45 Se entiende por el término "módulo" una pieza del aparato diseñada para ajustarse desmontable e intercambiabilmente en un aparato sintetizador automatizado (como se define anteriormente), de tal modo que el movimiento mecánico de las partes en movimiento del sintetizador controle la operación del módulo desde fuera del módulo, concretamente externamente. Los módulos adecuados comprenden una matriz lineal de válvulas, ligada cada una con un puerto donde pueden enlazarse reactivos o viales por punción con aguja de un vial sellado con septo invertido o por juntas de conexión herméticas. Cada válvula tiene una junta machihembrada que interactúa con el correspondiente brazo móvil del sintetizador automatizado. La rotación externa del brazo controla por tanto la apertura o cierre de la válvula cuando el módulo se enlaza con el sintetizador automatizado. Se diseñan piezas móviles adicionales del sintetizador automatizado para enganchar las puntas del cuerpo de jeringa y por tanto elevar

50 o presionar los cuerpos de jeringa.

El módulo es versátil, teniendo típicamente varias posiciones en que los reactivos pueden enlazarse y varias adecuadas para enlazar viales de jeringa de reactivos o cartuchos de cromatografía (p.ej., extracción en fase sólida o SPE). El módulo comprende siempre un recipiente de reacción. Tales recipientes de reacción son preferiblemente

de 1 a 10 cm<sup>3</sup>, lo más preferiblemente de 2 a 5 cm<sup>3</sup> de volumen y están configurados de tal modo que 3 o más puertos del módulo estén conectados con los mismos, para permitir la transferencia de reactivos o disolventes de diversos puertos en el módulo. Preferiblemente, el módulo tiene de 15 a 40 válvulas en una matriz lineal, lo más preferiblemente de 20 a 30, prefiriéndose especialmente 25. Las válvulas del módulo son preferiblemente cada una idéntica, y lo más preferiblemente son válvulas de tres vías. Los módulos se diseñan para ser adecuados para fabricación radiofarmacéutica y se fabrican por lo tanto a partir de materiales que son de calidad farmacéutica e idealmente también son resistentes a la radiólisis.

Los sintetizadores automatizados preferidos de la presente invención comprenden un módulo desechable o de un solo uso que comprende todos los reactivos, recipientes de reacción y aparatos necesarios para llevar a cabo la preparación de un lote dado de producto radiofarmacéutico radiofluorado. El módulo significa que el sintetizador automatizado tiene la flexibilidad de ser capaz de elaborar una variedad de productos radiofarmacéuticos con un mínimo riesgo de contaminación cruzada simplemente cambiando el módulo. El enfoque de módulo tiene también las ventajas de: configuración simplificada y por ello riesgo reducido de error del operario; cumplimiento mejorado de las GMP (buenas prácticas de fabricación); capacidad multitrazadora; cambio rápido entre tandas de producción; comprobación de diagnóstico automatizada antes de la tanda de módulo y reactivos; validación por código de barras automatizada de los reactivos químicos frente a la síntesis que se va a llevar a cabo; trazabilidad de los reactivos; un solo uso y por ello sin riesgo de contaminación cruzada, resistencia a las manipulaciones y el mal uso.

La invención se ilustra por los Ejemplos detallados a continuación. El ejemplo 1 proporciona la síntesis de un péptido director a c-Met de la invención ("péptido 1"). El ejemplo 1 proporciona la síntesis de un péptido 1 funcionalizado con aminoxi ("compuesto 1"), en el que el grupo funcional aminoxi está protegido con un grupo protector de la invención (Eei). El ejemplo 3 proporciona la desprotección del compuesto 1 para dar aminoxipéptido 1 libre ("compuesto 2"). El ejemplo 4 proporciona la desprotección *in situ* (concretamente en un recipiente) y conjugación con aldehído del compuesto 1, dando el conjugado ("compuesto 3"). El ejemplo 5 proporciona la síntesis de un péptido protegido con Eei de la invención adicional y el ejemplo 6 su desprotección.

#### 25 Abreviaturas

Se usan las abreviaturas de aminoácidos de una letra o tres letras convencionales.

	Ac:	acetilo
	Acm:	acetamidometilo
	ACN:	acetonitrilo
30	AcOH:	ácido acético
	Boc:	<i>terc</i> -butiloxicarbonilo
	tBu:	butilo terciario
	DCM:	diclorometano
	DIPEA:	N,N-diisopropiletilamina
35	DMF:	dimetilformamida
	DMSO:	dimetilsulfóxido
	Eei:	etoxietilidina;
	Fmoc:	9-fluorenilmetoxicarbonilo
	HBTU:	hexafluorofosfato de <i>O</i> -benzotriazol-1-il- <i>N,N,N,N'</i> -tetrametiluronio
40	HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución
	NHS:	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
	NMM:	<i>N</i> -metilmorfolina
	NMP:	1-metil-2-pirrolidinona
	Pbf:	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo
45	tBu:	<i>terc-butilo</i>
	TFA:	ácido trifluoroacético

THF: tetrahidrofurano

TIS: triisopropilsilano

Trt: tritilo.

Compuestos de la invención

Nombre	Estructura
Péptido 1	Puentes disulfuro en Cys4-16 y Cys6-14;  Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH <sub>2</sub> o  Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK-NH <sub>2</sub>
Compuesto 1	[Péptido 1]-NH(CO)-(CH <sub>2</sub> )-O-N=C(CH <sub>3</sub> )(OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
Compuesto 2	[Péptido 1]-NH(CO)-(CH <sub>2</sub> )-O-NH <sub>2</sub>
Compuesto 3	[Péptido 1]-NH(CO)-(CH <sub>2</sub> )-O-NH=CH(CH <sub>3</sub> )
Compuesto 4	[LBP1]-(CO)CH <sub>2</sub> ONC(CH <sub>3</sub> )OEt.  LBP1= Cys <sup>a</sup> -Lys-Gln-Ser <sup>b</sup> -Cys <sup>c</sup> -Ser <sup>d</sup> -Phe-Gly-Pro-Phe-Thr <sup>c</sup> -Phe-Val-Cys <sup>b</sup> -(HO-Asp)-Gly-Asn-Thr <sup>a</sup> -Lys <sup>d</sup>  (Mezcla de isómeros de LBP1 funcionalizados en cualquier grupo Cys <sup>a</sup> o Xaa Lys).
Compuesto 5	[LBP1]-(CO)CH <sub>2</sub> ONH <sub>2</sub>  (Mezcla de isómeros de LBP1 funcionalizados en cualquier grupo Cys <sup>a</sup> o Xaa Lys).

5 en que:

Los compuestos 1, 2 y 3 están funcionalizados en el grupo amino épsilon de la Lys carboxiterminal del péptido 1.

**Ejemplo 1: Síntesis del péptido 1.**

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

El péptido lineal precursor tiene la estructura:

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

15 Se ensambló la resina de peptidilo H-Ala-Gly-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Cys(Acm)-Ser(tBu)-Gly-Pro-Pro-Arg(Pbf)-Phe-Glu(OtBu)-Cys(Acm)- Trp(Boc)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Thr( $\Psi^{Me,Me}$ pro)-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Gly-Gly-Gly-Lys(Boc)-polímero en un sintetizador peptídico Applied Biosystems 433A usando la química de Fmoc, partiendo de 0,1 mmol de resina Rink Amide Novagel. Se aplicó un exceso de 1 mmol de aminoácidos preactivados (usando HBTU) en las etapas de acoplamiento. Se incorporó a la secuencia Glu-Thr seudoprolina (Novabiochem 05-20-1122). Se transfirió la reina a un aparato burbujeador de nitrógeno y se trató con una solución de anhídrido acético (1 mmol) y NMM (1 mmol) disueltos en DCM (5 ml) durante 60 min. Se retiró la disolución de anhídrido por filtración, se lavó la resina con DCM y se secó bajo corriente de nitrógeno.

20 Se llevó a cabo simultáneamente la retirada de los grupos protectores de cadena lateral y la escisión del péptido de la resina con TFA (10 ml) que contenía 2,5 % de TIS, 2,5 % de 4-tiocresol y 2,5 % de agua durante 2 horas y 30 min. Se retiró la resina por filtración, se retiró el TFA a vacío y se añadió dietiléter al residuo. Se lavó el precipitado formado con dietiléter y se secó con aire, procurando 264 mg de péptido bruto.

25 La purificación por HPLC preparativa (gradiente: 20-30 % de B durante 40 min donde A= H<sub>2</sub>O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 $\mu$  C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 30 min) del péptido bruto procuró 100 mg de precursor lineal de péptido 1 puro. Se analizó el producto puro por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 10 min donde A= H<sub>2</sub>O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 $\mu$  C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 6,54 min). Se llevó a cabo caracterización de producto adicional  
30 usando espectrometría de masas con electropulverización (MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> calculada: 1464,6, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> encontrada: 1465,1).

Etapa (b): Formación del puente disulfuro Cys4-16 monocíclico.

Cys4-16; Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Lys-NH<sub>2</sub>.

5 Se disolvió el precursor lineal de la etapa (a) (100 mg) en DMSO al 5 %/agua (200 ml) y se ajustó la disolución a pH 6 usando amoníaco. Se agitó la mezcla de reacción durante 5 días. Se ajustó entonces la disolución a pH 2 usando TFA y se retiró la mayoría del disolvente por evaporación a vacío. Se inyectó el residuo (40 ml) en porciones en una columna de HPLC preparativa para purificación de producto.

10 La purificación por HPLC preparativa (gradiente: 0 % de B durante 10 min y entonces 0-40 % de B durante 40 min, donde A= H<sub>2</sub>O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 44 min) del residuo procuró 72 mg de precursor monocíclico de péptido 1 puro. Se analizó el producto puro (como mezcla de isómeros P1 a P3) por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 10 min donde A= H<sub>2</sub>O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 5,37 min (P1); 5,61 min (P2); 6,05 min (P3)). Se llevó a cabo caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas con electropulverización (MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> calculada: 1463,6, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> encontrada: 1464,1) (P1); 1464,4 (P2); 1464,3 (P3)).

Etapa (c): Formación del segundo puente disulfuro Cys6-14 (péptido 1).

20 Se disolvió el precursor monocíclico de la etapa (b) (72 mg) en AcOH al 75 %/agua (72 ml) bajo capa de nitrógeno. Se añadieron HCl 1 M (7,2 ml) e I<sub>2</sub> 0,05 M h en AcOH (4,8 ml) en ese orden y se agitó la mezcla durante 45 min. Se añadió ácido ascórbico 1 M (1 ml) dando una mezcla incolora. Se evaporaron la mayoría de disolventes a vacío, se diluyó el residuo (18 ml) con agua/0,1 % de TFA (4 ml) y se purificó el producto usando HPLC preparativa. La purificación por HPLC preparativa (gradiente: 0 % de B durante 10 min, entonces 20-30 % de B durante 40 min, donde A= H<sub>2</sub>O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 43-53 min) del residuo procuró 52 mg de péptido 1 puro. Se analizó el producto puro por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 10 min, donde A= H<sub>2</sub>O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 6,54 min). Se llevó a cabo caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas con electropulverización (MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> calculada: 1391,5, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> encontrada: 1392,5).

**Ejemplo 2: Síntesis de conjugado aminoxi del péptido 1 protegido con Eei (compuesto 1)**

30 Se disolvieron péptido 1 (0,60 g, 0,22 mmol) y Eei-AOAc-Osu (IRIS Biotech; 83 mg, 0,32 mmol) en DMF (5 ml). Se añadió DIPEA (75 μl, 2 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 30 min. Se añadió una segunda alícuota de DIPEA (75 μl, 2 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 1 h. Se diluyó entonces la mezcla de reacción con 10 % de ACN/agua/0,1 % de acetato de amonio (10 ml) y se purificó el producto usando HPLC preparativa. Se combinaron las fracciones que contienen producto puro y se liofilizó el producto, procurando 550 mg (89 % de rendimiento) del compuesto 1.

40 Se analizó el producto puro por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 5 min, donde A= H<sub>2</sub>O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 0,6 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 3,56 min). Se llevó a cabo caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas con electropulverización (MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> calculada: 1463,1, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> encontrada: 1463,2).

**Ejemplo 3: Desprotección para dar el conjugado aminoxi del péptido 1 (compuesto 2)**

Se suspendió el compuesto 1 (Ejemplo 2; 461 mg, 158 μmol) en una disolución de 2,5 % de TFA/agua (46 ml) y se agitó/sonicó la disolución durante 60 min. Se diluyó la suspensión con agua (414 ml) y se liofilizó la disolución, procurando 472 mg (105 %) de compuesto 2.

45 Se analizó el producto puro por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 5 min, donde A= H<sub>2</sub>O/0,1 % de TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 0,6 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 3,00 min). Se llevó a cabo caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas con electropulverización (MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> calculada: 1428,1, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> encontrada: 1428,6).

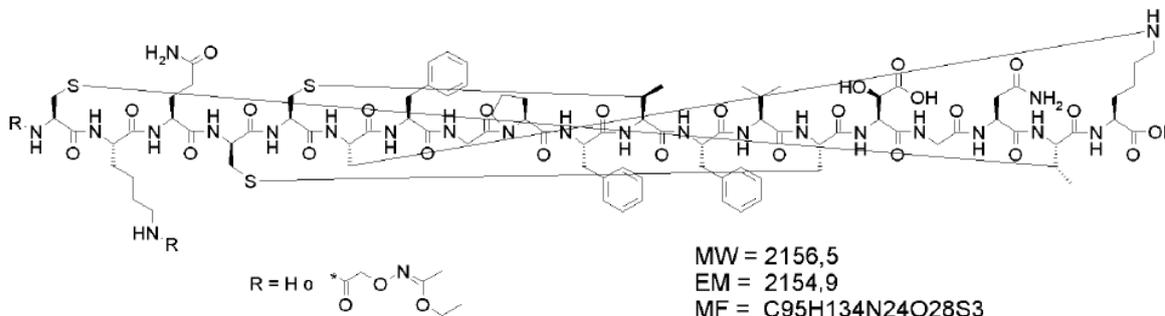
**Ejemplo 4: Conjugación en un recipiente del compuesto 1 con un aldehído**

50 Se añadió acetaldehído (1 μl, 17 μmol) en etanol (0,5 ml) a una mezcla de compuesto 1 (Ejemplo 2; 5 mg, 1,7 μmol) en HCl 1 M (0,5 ml) y se agitó/sonicó la mezcla de reacción durante 30 min. Se diluyó entonces la mezcla de reacción con 10 % de ACN/agua/0,1 % de TFA (7 ml) y se purificó el producto por HPLC semipreparativa, procurando 3,8 mg (78 %) del compuesto 3.

Se analizó el producto puro por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 5 min, donde A= H<sub>2</sub>O/0,1 % de

TFA y B= ACN/0,1 % de TFA, caudal: 0,6 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 $\mu$  C18 (2) 20 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 3,22 min). Se llevó a cabo caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas con electropulverización ( $MH_2^{2+}$  calculada: 1441,1,  $MH_2^{2+}$  encontrada: 1441,4).

**Ejemplo 5: Síntesis de (Eei-aminoxi)acetilduramicina (compuesto 4).**

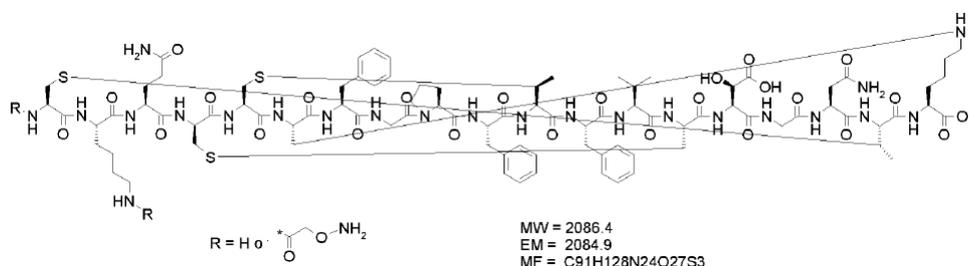


5 Se disolvieron duramicina (Sigma-Aldrich; 50 mg, 25  $\mu$ mol), éster de NHS del ácido (Eei-aminoxi)acético (Iris Biotech., 5,1 mg, 20  $\mu$ mol) y DIPEA (17  $\mu$ l, 100  $\mu$ mol) en NMP (1 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 45 min. Se diluyó entonces la mezcla con agua/0,1 % de ácido acético (8 ml) y se purificó el producto usando HPLC preparativa.

10 La purificación por HPLC preparativa (como para el ejemplo 1, con gradiente de 14-45 % de B durante 40 min, donde A= agua/0,1 % de ácido acético y B= ACN) procuró 14 mg de compuesto 4 puro (rendimiento 26 %). Se analizó el material purificado por LC-MS (gradiente: 20-50 % de B durante 5 min,  $t_R$ : 2,5 y 2,7 min,  $m/z$  encontrada: 1078,8,  $MH_2^{2+}$  esperada: 1078,5).

15 Pudo conseguirse la resolución cromatográfica de los regioisómeros de (Eei-aminoxi)acetilduramicina en HPLC analítica usando TFA al 0,1 %. Sin embargo, el grupo protector Eei es lábil en TFA al 0,1 %, de modo que no era factible una separación preparativa. Los regioisómeros no se resolvieron usando ácido acético al 0,1 %.

**Ejemplo 6: Síntesis de aminoxiacetilduramicina (compuesto 5).**



20 Se trató el compuesto 4 (Ejemplo 5; 14 mg) con 2,5 % de TFA/agua (2,8 ml) bajo atmósfera de argón durante 40 min. Se diluyó la mezcla de reacción con agua (31 ml) y se liofilizó el producto (congelado bajo atmósfera de argón usando isopropanol/hielo seco), procurando 18 mg de compuesto 5. Se analizó el producto liofilizado por LC-MS (gradiente: 20-50 % de B durante 5 min,  $t_R$ : 2,5 y 2,1 min,  $m/z$  encontrada: 1043,8,  $MH_2^{2+}$  esperada: 1043,5).

25 Pudo conseguirse la resolución cromatográfica de los regioisómeros del compuesto 5 por HPLC analítica usando TFA al 0,1 %. Sin embargo, debido a la alta reactividad del grupo aminoxi libre frente a las trazas de cetonas y aldehídos en el disolvente y la atmósfera, no se hizo intento de separar los regioisómeros.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> GE Healthcare Limited

<120> Método de radioconjugación

5 <130> PZ1124 WO

<140> PCT/EP2011/071506

<141>01-12- 2011

10 <160> 14

<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

<212> PRT

<213> Artificial

50 <220>

<223> péptido sintético

55 <400> 4

**Leu Arg Glu**

**1**

60 <210> 5

<211> 15

<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> péptido sintético  
  
 <400> 5  
 Lys Cys Gln Ala Gly Thr Phe Ala Leu Arg Gly Asp Pro Gln Gly  
 1 5 10 15  
  
 10 <210> 6  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> péptido sintético  
  
 <400> 6  
 Arg Gly Asp  
 1  
 20 <210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> péptido sintético  
  
 <400> 7  
 Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe  
 30 1 5  
  
 <210> 8  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
  
 40 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sar  
  
 45 <400> 8  
 Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ile  
 1 5  
  
 <210> 9  
 <211> 8  
 50 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
  
 55 <220>  
 <221> TIOET  
 <222> (1)..(8)  
  
 60 <220>  
 <221> DISULFUR  
 <222> (2)..(6)

<400> 9  
**Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys**  
 1 5

5 <210> 10  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> péptido sintético

<220>  
 <221> DISULFURO

15 <222> (1)..(13)

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)

20 <223> N, H o Y

<220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (3)..(11)

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> G, S, T o N

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> T o R

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> A, D, E, G o S

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> S o T

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (17)..(17)  
 <223> D o E

50 <400> 10  
**Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys Tyr Xaa Xaa**  
 1 5 10 15

**Xaa**

55 <210> 11  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

60

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

5

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

<400> 11  
 Ala Gly Ser Cys Tyr Cys Ser Gly Pro Pro Arg Phe Glu Cys Trp Cys  
 1 5 10 15

10

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

<210> 12  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Streptovercillium cinnamoneum

15

<220>  
 <221> TIOET  
 <222> (1)..(18)

20

<220>  
 <221> TIOET  
 <222> (4)..(14)

25

<220>  
 <221> TIOET  
 <222> (5)..(11)

30

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (6)..(19)  
 <223> enlace lisinoalanina

35

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> ácido beta-hidroxiaspártico

<400> 12  
 Cys Arg Gln Ser Cys Ser Phe Gly Pro Pro Thr Phe Val Cys Xaa Gly  
 1 5 10 15

40

Asn Thr Lys

<210> 13  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Streptovercillium cinnamoneum

45

<220>  
 <221> TIOET  
 <222> (1)..(18)

50

<220>  
 <221> TIOET  
 <222> (4)..(14)

55

<220>  
 <221> TIOET  
 <222> (5)..(11)

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (6)..(19)  
 5 <223> enlace lisinoalanina

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(15)  
 10 <223> ácido beta-hidroxiaspártico

<400> 13  
 Cys Lys Gln Ser Cys Ser Phe Gly Pro Pro Thr Phe Val Cys Xaa Gly  
 1 5 10 15

Asn Thr Lys

15 <210> 14  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> péptido sintético

<220>  
 <221> TIOET  
 25 <222> (1)..(8)

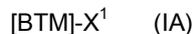
<220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (2)..(6)  
 30

<400> 14  
 Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys  
 1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de radiomarcaje de una molécula directora biológica que comprende:

(i) la provisión de un compuesto protegido de fórmula (IA)



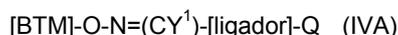
5 (ii) la desprotección del compuesto protegido de fórmula (IA) de la etapa (i) dando un compuesto de aminoxi de fórmula (IIA)



(iii) la condensación del compuesto de aminoxi de fórmula (IIA) con un compuesto de carbonilo de fórmula (IIIA)

10 
$$\text{Q}-[\text{ligador}]-(\text{C}=\text{O})\text{Y}^1 \quad (\text{IIIA})$$

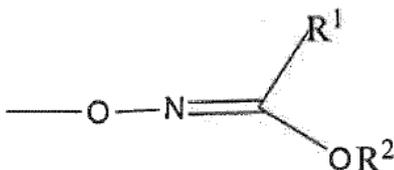
dando un conjugado radiomarcado de fórmula (IVA):



en la que:

[BTM] es una molécula directora biológica;

15  $\text{X}^1$  es un grupo aminoxi protegido de fórmula:



en la que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se eligen independientemente de alquilo  $\text{C}_{1-3}$ , fluoroalquilo  $\text{C}_{1-3}$  o arilo  $\text{C}_{4-6}$ ;

Q es un grupo que comprende un radioisótopo adecuado para imagenología por PET o SPECT *in vivo*;

$\text{Y}^1$  es H, alquilo  $\text{C}_{1-6}$  o arilo  $\text{C}_{4-10}$ ,

20 [ligador] es un grupo ligador.

2. El método de la reivindicación 1, en el que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  son independientemente alquilo  $\text{C}_{1-2}$ .

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en que  $\text{Y}^1$  es H.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde Q se elige de  $^{18}\text{F}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  o  $^{64}\text{Cu}$ .

5. El método de la reivindicación 4, donde Q es  $^{18}\text{F}$ .

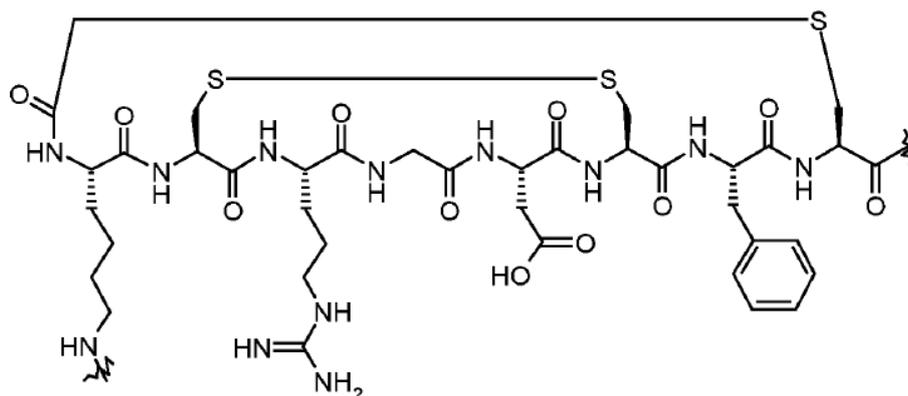
25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el BTM comprende un solo aminoácido, un péptido de 3-100 unidades, un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático, un inhibidor enzimático o un compuesto de unión a receptor.

7. El método de la reivindicación 6, donde el BTM comprende un Affibody™.

30 8. El método de la reivindicación 6, donde el BTM comprende un péptido de 3-100 unidades que se elige de péptido A, péptido B, péptido C y péptido D como se definen a continuación:

(i) péptido A= a un péptido Arg-Gly-Asp;

(ii) péptido B= un péptido Arg-Gly-Asp que comprende el fragmento



(iii) péptido C= un péptido cíclico de unión a c-Met que comprende la secuencia aminoacídica:



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

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

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

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

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

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

10 y  $\text{Cys}^{\text{a-d}}$  son cada uno residuos de cisteína tales que los residuos a y b así como c y d se ciclan formando dos puentes disulfuro separados;

(iv) péptido D= un péptido lantibiótico de fórmula:



en la que Xaa es Arg o Lys;

15  $\text{Cys}^{\text{a}}-\text{Thr}^{\text{a}}$ ,  $\text{Ser}^{\text{b}}-\text{Cys}^{\text{b}}$  y  $\text{Cys}^{\text{c}}-\text{Thr}^{\text{c}}$  están ligados covalentemente por enlaces tioéter;

$\text{Ser}^{\text{d}}-\text{Lys}^{\text{d}}$  están ligados covalentemente por un enlace lisinoalanina;

HO-Asp es ácido  $\beta$ -hidroxiaspártico.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde las etapas (ii) y (iii) se llevan a cabo simultáneamente.

20 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la etapa de condensación (iii) se lleva a cabo en presencia de anilina.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que se lleva a cabo usando un aparato sintetizador automatizado.

25 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho sintetizador automatizado comprende un módulo desechable de uso único que comprende un precursor que comprende el compuesto protegido de fórmula (IA) en forma estéril

30 13. Un método de preparación de una composición radiofarmacéutica, en el que dicha composición radiofarmacéutica comprende el conjugado radiomarcado de fórmula (IVA) como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, junto con un portador biocompatible en una forma adecuada para administración a mamíferos, y dicho método de preparación comprende el método de radiomarcaje de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.