

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 624**

51 Int. Cl.:

C07B 59/00	(2006.01) C07K 1/14	(2006.01)
C07B 63/00	(2006.01) C07K 14/00	(2006.01)
A61K 51/04	(2006.01)	
A61K 51/08	(2006.01)	
A61K 51/12	(2006.01)	
B01D 15/20	(2006.01)	
B01D 15/22	(2006.01)	
B01D 15/32	(2006.01)	
B01D 15/42	(2006.01)	
C07K 1/13	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014 PCT/EP2014/078608**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15091881**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014 E 14815726 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3083526**

54 Título: **Método de purificación y composiciones**

30 Prioridad:

18.12.2013 GB 201322451

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

26.03.2020

73 Titular/es:

**GE HEALTHCARE LIMITED (100.0%)
Amersham Place, Little Chalfont
Buckinghamshire HP15 7AT, GB**

72 Inventor/es:

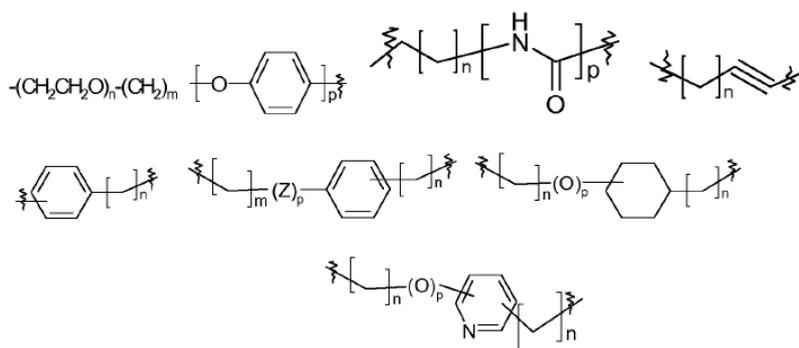
**ENGELL, TORGRIM;
MEIJER, ANDREAS, RICHARD;
KHAN, IMITIAZ AHMED;
NAIRNE, ROBERT JAMES y
MCROBBIE, GRAEME**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 750 624 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).



en donde:

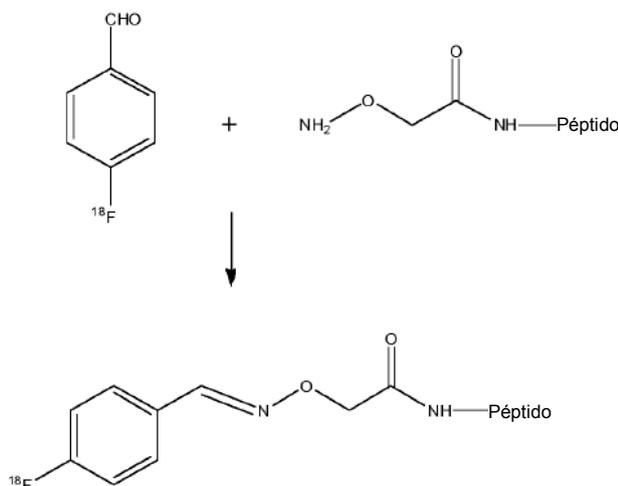
n es un número entero de 0 a 20;

m es un número entero de 1 a 10;

5 p es un número entero de 0 o 1;

Z es O o S.

Poethko *et al.* [J.Nucl. Med., 45(5), 892-902 (2004)] describen un método de péptidos radiomarcados con el radioisótopo ^{18}F , en donde un péptido funcionalizado con aminoxi se condensa con ^{18}F -fluorobenzaldehído para dar un péptido marcado que tiene un enlace éter de oxima como sigue:



10

Schottelius *et al.* [Bioconj. Chem., 19 (6), 1256-1268 (2008)] ha desarrollado aún más 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-butiloxycarbonilo). El péptido funcionalizado con aminoxi deseado se genera in situ en presencia de ^{18}F -fluorobenzaldehído mediante la desprotección del grupo N-Boc a un pH ácido (pH = 2) a 75°C. Schottelius *et al.* utilizaron un exceso molar de 5 veces del precursor protegido con Boc, porque la desprotección no fue cuantitativa en las condiciones de reacción.

15

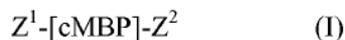
Mezo *et al.* [J.Pept. Sci., 17, 39-46 (2010)] describen algunos de los problemas asociados con la química de ligadura de oxima de péptidos funcionalizados con aminoxi protegidos con Boc. Por lo tanto, se sabe que el reactivo de Boc-aminoxi puede acilar el péptido de aminoxi protegido con Boc formado, dando lugar a subproductos indeseables. También se sabe que la reactividad del grupo aminoxi libre del péptido funcionalizado es alta hacia los compuestos de carbonilo. En consecuencia, puede producirse una condensación no deseada con cualquier aldehído o cetona adventicio presente en la mezcla de reacción o en cualquier etapa posterior de purificación. Tales aldehídos o cetonas podrían ser trazas de acetona presentes en los disolventes utilizados, o formaldehído (por ejemplo, de plastificantes). Mezo *et al.* están interesados en resolver este problema tanto para la conjugación de fármacos contra el cáncer como para ^{18}F -fluorobenzaldehído a péptidos. Mezo *et al.* resuelven el problema llevando a cabo la desprotección del péptido Boc-aminoxi en presencia de un exceso molar de diez veces de ácido acético(aminoxi) libre (Aoa) como un "agente de captura de carbonilo". El péptido aminoxi desprotegido y el exceso de Aoa se

20

25

liofilizan y se almacenan a 4°C. Inmediatamente antes de la reacción de ligadura de oxima, la mezcla liofilizada se reconstituye y el exceso de Aoa se separa por HPLC o cartucho Sep-Pak plus C18. Mezo *et al.* proporcionan un ejemplo en el que no es radiactivo (es decir ¹⁹F) 4-fluorobenzaldehído se conjuga con un péptido de somatostatina funcionalizado con aminoxi usando esta técnica. Mezo *et al.* no proporcionan ningún dato sobre ¹⁸F-radiomarcado.

- 5 El documento WO 2012/022676 describe un agente de formación de imágenes que comprende un péptido cíclico de unión a c-Met marcado con ¹⁸F de 18 meros a 30 de Fórmula I:



donde:

cMBP es de Fórmula II:



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



en donde X¹ es Asn, His o Tyr;

X² es Gly, Ser, Thr o Asn;

15 X³ es Thr o Arg;

X⁴ es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X⁵ es Ser o Thr;

X⁶ es Asp o Glu;

20 y Cys^{a-d} son cada uno residuos de cisteína de manera que los residuos a y b, así como c y d, se ciclan para formar dos enlaces disulfuro separados;

A y A' son independientemente cualquier aminoácido que no sea Cys, con la condición de que al menos uno de A y A' esté presente y sea Lys;

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

25 Z¹ está unido al extremo N terminal de cMBP, y es H o M^{IG};

Z² está unido al extremo C terminal de cMBP y es OH, OB^c o M^{IG},

donde B^c es un catión biocompatible;

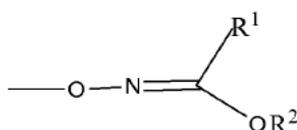
cada M^{IG} es independientemente un grupo inhibidor del metabolismo que es un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido cMBP;

30 en donde cMBP está marcado en el residuo Lys de los grupos A o A' con ¹⁸F.

El documento WO 2012/022676 también describe que los agentes de formación de imágenes pueden usarse como composiciones farmacéuticas, en donde dichas composiciones preferiblemente comprenden uno o más radioprotectores elegidos preferiblemente de: etanol; ácido ascórbico; ácido *para*-aminobenzoico (es decir, ácido 4-aminobenzoico o pABA); ácido gentísico (es decir, ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y sales de dichos ácidos con un catión biocompatible.

35

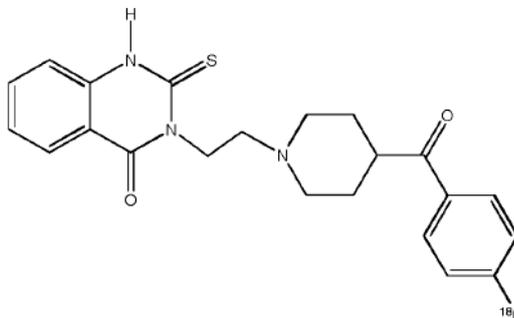
El documento WO 2012/072736 describe el uso de una química alternativa de grupos protectores para los grupos aminoxi de biomoléculas funcionalizadas. El grupo aminoxi protegido tiene la fórmula:



en donde:

R¹ y R² se eligen independientemente de alquilo C₁₋₃, fluoroalquilo C₁₋₃ o arilo C₄₋₆.

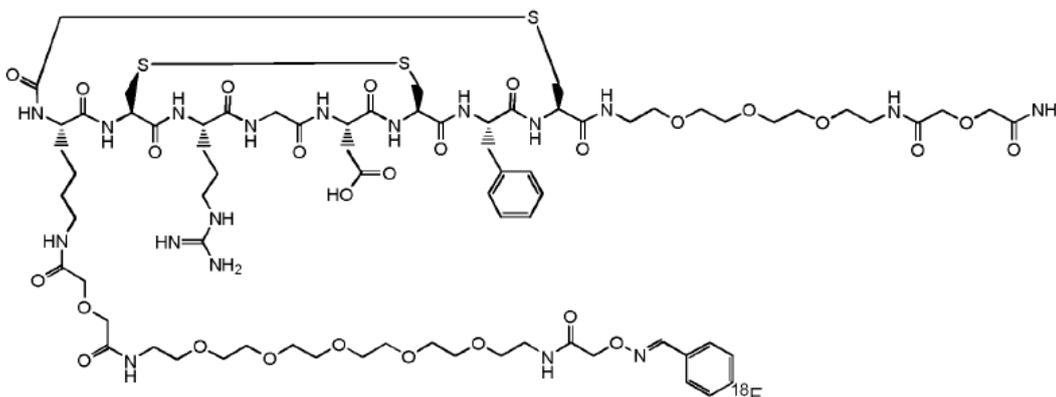
Lemaire *et al.* [J. Lab. Comp. Radiopharm., 42, 63-75 (1999)] describe la purificación por extracción en fase sólida (SPE) de ¹⁸F-altanserina:



5 ¹⁸F-altanserina

Señalaron que ¹⁸F-altanserina es muy sensible a la descomposición radiolítica, y usan una solución de acondicionamiento de columna de etanol y solución salina con ácido ascórbico al 0,1%. El lavado de la columna se realizó con una mezcla de solución salina/ácido ascórbico. La ¹⁸F-altanserina se eluyó en etanol puro y, posteriormente, se diluyó con la solución de acondicionamiento de la columna.

10 El documento US 2013/0209358 A1 describe que la ¹⁸F-fluciclatida puede someterse a radiólisis a altas concentraciones radiactivas:



¹⁸F-fluciclatida

15 El documento US 2013/0209358 A1 describe que ¹⁸F-fluciclatida no está estabilizada por etanol, y que el ácido ascórbico no es ideal para las radiosíntesis automatizadas, pero que el ácido 4-aminobenzoico (o sal del mismo) es efectivo. El documento US 2013/0209358 A1 muestra que la ¹⁸F-fluciclatida se prepara primero, y luego se agrega el radioprotector. El documento US 2013/0209358 A1 también muestra composiciones radiofarmacéuticas que comprenden ¹⁸F-fluciclatida y el radioprotector ácido 4-aminobenzoico (pABA).

20 El documento WO 2013/174909 A1 proporciona un método de purificación de ¹⁸F-fluciclatida usando SPE (extracción en fase sólida). El documento WO 2013/174909 A1 muestra que, una vez que se eluye de la columna SPE, la ¹⁸F-fluciclatida se puede diluir con un vehículo biocompatible, que puede incluir ácido 4-aminobenzoico.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de mejores métodos para preparar y purificar restos de reconocimiento biológico funcionalizados con aminoxi, para dar composiciones adecuadas de alta pureza para aplicaciones radiofarmacéuticas *in vivo*.

25 La presente invención

Los presentes inventores han identificado y analizado las impurezas radioquímicas presentes en los restos de reconocimiento biológico funcionalizado con aminoxi marcado con ¹⁸F, y cómo los niveles de tales impurezas varían con el tiempo. Esa investigación condujo a la comprensión de que las radio-lisis producidas en proceso durante los intentos de purificación eran la causa fundamental de los problemas de RCP (pureza radioquímica).

Esto se puede entender de la siguiente manera. Por lo tanto, los radiotrazadores de la presente invención, cuando se purifican y formulan para uso *in vivo*, están presentes a una concentración radioactiva (RAC) de aproximadamente 500 a 700 MBq/ml (de 0,5 a 0,7 GBq/ml). El radiotrazador puede exhibir una estabilidad satisfactoria o una degradación mínima en tales condiciones de RAC. Sin embargo, esto se obtiene a partir de una mezcla de reacción cruda, donde la RAC está en el intervalo de aprox. 10 a 15 GBq/ml. Además, los presentes inventores han establecido que, durante la purificación (es decir, al final de la radiosíntesis), aproximadamente 45 GBq de radiactividad se concentran en una banda estrecha en la columna cromatográfica con un volumen de menos de 1 ml. Eso conduce a un RAC en proceso durante la purificación de > 45 GBq/mL. Dado que la purificación puede durar hasta 20 minutos, el riesgo de radiolisis en proceso es alto.

La presente invención proporciona métodos para estabilizar los radiotrazadores mientras se lleva a cabo la purificación y, por lo tanto, también proporciona rendimientos radiactivos mejores y composiciones. La presente invención proporciona un método de purificación de un radiotrazador que comprende un resto de reconocimiento biológico funcionalizado con ¹⁸F-aminoxi. De hecho, es tanto un método de purificación como un método de radioestabilización (es decir, estabilización contra la degradación radiactiva). Por lo tanto, al evitar la radiodegradación en proceso durante la purificación, la presente invención también mejora la pureza radioquímica, ya que se suprimen las impurezas que, de otro modo, podrían generarse. El método también proporciona un rendimiento radioquímico mejorado ya que las pérdidas en el proceso durante la cromatografía se minimizan. Por lo tanto, en comparación con la purificación por HPLC sin radioestabilización en proceso, la presente invención proporciona un aumento en el rendimiento de hasta un 65%.

20 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de purificación de un radiotrazador que comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar un radiotrazador que comprende un resto de reconocimiento biológico funcionalizado con aminoxi marcado con ¹⁸F;
- (b) añadir un radioprotector a dicho radiotrazador para dar una solución de radiotrazador que comprende dicho radiotrazador en uno o más disolventes orgánicos acuosos miscibles en agua con un contenido de disolvente orgánico del 5 al 25% v/v;
- (c) hacer pasar la solución de radiotrazador de la etapa (b) a través de un cartucho SPE de fase inversa, en el que el radiotrazador se retiene en dicho cartucho SPE;
- (d) lavar el cartucho SPE de la etapa (c) una o más veces con una solución de lavado que comprende una solución de disolvente o disolventes orgánicos acuosos miscibles con agua de un radioprotector con un contenido de disolvente orgánico de 15 a 25% v/v;
- (e) lavar el cartucho SPE de la etapa (d) una o más veces con agua o solución tampón acuosa;
- (f) eluir el cartucho SPE lavado de la etapa (d) o (e) con un disolvente de elución que comprende un radioprotector en una solución acuosa de etanol que tiene un contenido de etanol de 35 a 80% v/v, en donde el eluyente comprende radiotrazador purificado en dicho disolvente de elución;

en donde cada radioprotector comprende independientemente uno o más de: ácido ascórbico; ácido *para*-aminobenzoico; y ácido genticónico, y sus sales con un catión biocompatible.

El término "radiotrazador" tiene su significado convencional y se refiere a un radiofármaco que se utiliza para rastrear un proceso fisiológico o biológico sin afectarlo. El término "radiofármaco" tiene su significado convencional y se refiere a un compuesto radiomarcado administrado al cuerpo de un mamífero *in vivo* con el propósito de obtener imágenes o una terapia. Durante la purificación cromatográfica, tal como cuando se carga y, por lo tanto, se concentra en un pequeño volumen en la parte superior de una columna SPE, el radiotrazador puede estar expuesto transitoriamente a una concentración radiactiva muy alta ("RAC"). Por lo tanto, los radiotrazadores que de otro modo parecen radioestables, pueden presentar inestabilidad con la consiguiente pérdida de pureza radioquímica ("RCP") y/o rendimiento radioquímico durante el intento de purificación.

La expresión "funcionalizado con aminoxi" significa un resto de reconocimiento biológico funcionalizado con un grupo aminoxi. La expresión "grupo aminoxi" tiene su significado convencional y se refiere a un sustituyente de fórmula -O-NH₂, preferiblemente -CH₂-O-NH₂.

Por la expresión "resto de reconocimiento biológico" (BTM) se entiende un compuesto que, después de su administración, se absorbe selectivamente o se localiza en un sitio particular del cuerpo del mamífero *in vivo*. Dichos sitios pueden, por ejemplo, estar implicados en un estado de enfermedad particular o ser indicativos de cómo funciona un órgano o proceso metabólico.

La expresión “fase inversa” se refiere a una “purificación cromatográfica en fase inversa” que tiene su significado convencional y se refiere a la cromatografía en la que la fase estacionaria es lipofílica y la fase móvil es hidrofílica, típicamente implicando medios acuosos. La técnica cromatográfica de la presente invención es la extracción en fase sólida (SPE) usando una columna SPE, a veces llamada un “cartucho SPE”. Dichas columnas SPE tienen la ventaja de que son de un solo uso, es decir, son desechables, por lo que no hay riesgo de contaminación cruzada con otros radiotrazadores.

La expresión “disolvente(s) orgánico(s) acuoso(s) miscible(s) en agua con un contenido de disolvente orgánico del 5 al 25% v/v” se refiere a una solución acuosa (por ejemplo, agua, solución salina, un tampón acuoso o mezclas de los mismos), mezclado con al menos un disolvente(s) orgánico(s) miscible(s) con agua (es decir, posiblemente dos o más diferentes). El contenido de disolvente orgánico del 5 al 25% v/v puede ser, por lo tanto, de un único disolvente orgánico, o dos o más de tales disolventes. Los disolventes orgánicos miscibles en agua son conocidos en la técnica e incluyen: acetonitrilo, un alcohol C₁₋₄, DMF, DMSO, dioxano, acetona, 2-metoxietanol, THF y etilenglicol.

Por el término “radioprotector” se entiende un compuesto que inhibe las reacciones de degradación, como los procesos redox, al atrapar los radicales libres altamente reactivos, como los 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 (es decir, ácido 4-aminobenzoico), ácido genticónico (es decir, ácido 2,5-dihidroxiibenzoico) y sus sales con un catión biocompatible. Por la expresión “catión biocompatible” se entiende un contraión cargado positivamente que forma una sal con un grupo ionizado, cargado negativamente, donde dicho contraión cargado positivamente tampoco es tóxico y, por lo tanto, es adecuado para la administración al cuerpo de los mamíferos, especialmente al cuerpo humano. Los ejemplos de cationes biocompatibles adecuados incluyen: los metales alcalinos sodio o potasio; los metales alcalinotérreos calcio y magnesio; y el ion amonio. Los cationes biocompatibles preferidos son sodio y potasio, más preferiblemente sodio.

El método de la presente invención elimina especies que permanecen unidas a la columna SPE, p. ej. especies muy lipofílicas o cualquier partícula. El método de la presente invención también minimiza o elimina las impurezas hidrofílicas que exhiben poca afinidad por la fase estacionaria de la columna SPE y que, por lo tanto, se eliminan en las etapas de carga y lavado. Dichas impurezas hidrofílicas incluyen cualquier sal o especie iónica (tal como el ion fluoruro); catalizadores (como la anilina o Kryptofix); así como el/los disolvente(s) orgánico(s) miscible(s) en agua de la solución radiotrazadora.

El radiotrazador típicamente es el resultado de la conjugación de ¹⁸F-fluorobenzaldehído (o similar) a un precursor del resto de reconocimiento biológico funcionalizado con aminoxi, el resto de fluorobenzaldehído conjugado confiere lipofilia adicional al conjugado. Por lo tanto, el radiotrazador tenderá a retenerse en una columna SPE de fase inversa, mientras que el precursor no radiactivo en sí (que es más hidrófilo) tenderá a eliminarse en la etapa de carga (c) y las etapas de lavado (d) y (e) del primer aspecto. Las etapas de lavado (d) y (e) también son importantes para eliminar el disolvente orgánico miscible en agua de la etapa (b). De esta manera, la solución de radiotrazador se purifica para eliminar las impurezas no radiactivas no deseadas en función del resto de reconocimiento biológico que, si está presente, podría competir con el radiotrazador por sitios biológicos de interés *in vivo*. Cualesquiera más impurezas radiactivas marcadas con ¹⁸F hidrofílicas tenderán a eliminarse de manera similar. Por lo tanto, el nivel inicial del Compuesto 2 en una preparación era de 5 mg, que se redujo a aprox. 200 µg (0,2 mg) en el radiotrazador purificado.

40 Características preferidas

En el método del primer aspecto, el disolvente orgánico miscible en agua de la solución de radiotrazador y/o la solución de lavado se elige preferiblemente entre: acetonitrilo, un alcohol C₂₋₄, DMF, 2-metoxietanol, THF y etilenglicol. El disolvente orgánico miscible con agua se elige más preferiblemente entre acetonitrilo y etanol.

El acetonitrilo tiene las ventajas de que es un buen disolvente para una amplia gama de radiotrazadores, no es ácido ni básico, es relativamente no reactivo y, por lo tanto, compatible con una amplia gama de grupos funcionales, y es altamente miscible con agua, de modo que se elimina fácilmente por el lavado de la columna SPE en las etapas del método (d) y (e). Se descubrió que el acetonitrilo era el disolvente más eficiente para la eliminación de impurezas en el radiotrazador, incluida la anilina. El contenido de acetonitrilo de la solución de radiotrazador y la solución de lavado preferiblemente no excede el 25% v/v, ya que niveles más altos corren el riesgo de perder el producto radiotrazador por elución de la columna SPE. El contenido de acetonitrilo de la solución de lavado es preferiblemente 18-22% v/v, más preferiblemente 20-21% v/v.

El pH del componente acuoso de la solución de radiotrazadores, la solución de lavado y el disolvente de elución es preferiblemente de 7,5 a 8,5. Eso se logra preferiblemente usando soluciones tampón, más preferiblemente, el tampón fosfato.

La solución de radiotrazador de la etapa (b) comprende preferiblemente etanol y, más preferiblemente, comprende tanto acetonitrilo como etanol. El etanol tiene roles potencialmente múltiples, ya que puede funcionar como: un disolvente orgánico miscible en agua (como se definió anteriormente); un radioprotector o radioestabilizador; un “vehículo biocompatible” (como se define a continuación); y como conservante antimicrobiano (como se define a

continuación). Los presentes inventores han descubierto que la combinación del “radioprotector” (como se definió anteriormente) y el etanol es más efectiva para estabilizar los radiotrazadores de la invención contra la radiolisis. El contenido de etanol de la solución de radiotrazador es preferiblemente de 0,5 a 5% v/v de etanol.

5 La etapa de adición (b) se logra preferiblemente mediante la adición de la solución de lavado como se define en la etapa (d).

El radiotrazador proporcionado en la etapa (a) y/o la solución de radiotrazador de la etapa (b) se enfrían preferiblemente a un intervalo de temperatura de 12 a 30°C, más preferiblemente de 15 a 25°C, lo más preferiblemente de 16 a 22°C antes de usar, en particular antes de cargarlo en la columna SPE.

10 La solución de lavado de la etapa (d) comprende preferiblemente etanol y, más preferiblemente, comprende tanto acetonitrilo como etanol. El contenido de etanol de la solución de radiotrazador es preferiblemente del 1,0 al 3%, más preferiblemente del 1,5-2,5% y lo más preferiblemente del 2% v/v de etanol.

El cartucho SPE de fase inversa del primer aspecto tiene preferiblemente una carga de carbono de 2,7 a 17% y es, más preferiblemente, un cartucho SPE C8 o C18, lo más preferiblemente un cartucho SPE tC18.

15 El disolvente de elución de la etapa (f) comprende preferiblemente 35-70% v/v de etanol acuoso, más preferiblemente 40-60%, lo más preferiblemente 48-52% de etanol acuoso y, especial y preferiblemente, 50% de etanol acuoso.

20 En el método del primer aspecto, el radioprotector utilizado en la solución de radiotrazadores, la solución de lavado y el disolvente de elución pueden ser iguales o diferentes, o iguales pero utilizados en diferentes concentraciones. Preferiblemente, el radioprotector utilizado en la solución de radiotrazador, solución de lavado y disolvente de elución es el mismo. De esa manera, se evita la presencia de múltiples componentes no volátiles en el radiotrazador purificado, lo que lo hace más adecuado para aplicaciones *in vivo*. El radioprotector del primer aspecto comprende preferiblemente ácido 4-aminobenzoico, o una sal del mismo con un catión biocompatible, más preferiblemente 4-aminobenzoato de sodio.

25 Cuando el radioprotector es 4-aminobenzoato de sodio, una concentración preferida en la solución de radiotrazador es 5 mg/ml, y una concentración preferida en la solución de lavado y el disolvente de elución es 2,5 mg/ml. Una solución de radiotrazador especialmente preferida comprende 5 mg/ml de 4-aminobenzoato de sodio, etanol al 2% en una mezcla de 79 g de solución salina tamponada con fosfato (pH 6 a 9, preferiblemente de 7 a 8,5) y 16,5 g de acetonitrilo. Una solución de lavado especialmente preferida comprende 5 mg/ml de 4-aminobenzoato de sodio en solución salina tamponada con fosfato (pH 6 a 9, preferiblemente de 7 a 8,5).

30 Cuando el radioprotector es 4-aminobenzoato de sodio, el cartucho SPE se lava preferiblemente entre las etapas de purificación con aire en lugar de nitrógeno. Por lo tanto, los presentes inventores han descubierto que el ácido 4-aminobenzoico radioprotector funciona más eficazmente en presencia de aire, en oposición a la situación en la que se excluye el oxígeno.

35 El radiotrazador purificado de la etapa (f) contiene preferiblemente ácido 4-aminobenzoico, o una sal del mismo con un catión biocompatible como radioprotector, en etanol acuoso al 35-70%. Como se describe en los aspectos segundo y tercero (a continuación), para aplicaciones radiofarmacéuticas que se diluyen preferiblemente con un vehículo acuoso biocompatible para dar un contenido final de etanol de 0,1 a 10% v/v.

40 El cartucho SPE del primer aspecto se acondiciona preferiblemente antes del uso tratando primero con un disolvente orgánico miscible en agua, luego con una solución acondicionadora. Dicho disolvente orgánico miscible en agua es preferiblemente etanol, y dicha solución de acondicionamiento es adecuadamente una mezcla de disolventes orgánicos acuosos/miscibles en agua, preferiblemente la solución de lavado de la etapa (d).

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

45 En el método del primer aspecto, el BTM comprende preferiblemente un solo aminoácido, un péptido de 3-100 mer, un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático, un inhibidor enzimático o un compuesto de unión al receptor. El BTM puede ser de origen sintético o natural, pero preferiblemente es sintético. El término “sintético” tiene su significado convencional, es decir, hecho por el hombre en lugar de estar aislado de fuentes naturales, p. ej. del cuerpo de los mamíferos. Dichos compuestos tienen la ventaja de que su perfil de fabricación y de impurezas puede controlarse completamente. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales y sus fragmentos de origen natural están fuera del alcance del término “sintético” como se usa en el presente documento. El peso molecular del BTM es preferiblemente 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 preferidos de 400 a 16.000 Daltons. Cuando el BTM no es un péptido, el peso molecular del BTM es preferiblemente de hasta 3.000 Daltons, más preferiblemente de 200 a 2.500 Daltons, lo más preferiblemente de 300 a 2.000 Daltons, siendo especialmente preferidos de 400 a 1.500 Daltons.

50

55

Más preferiblemente, BTM comprende un Affibody™ o un solo aminoácido, un péptido de 3-100 mer, un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático, un inhibidor enzimático o un compuesto de unión al receptor.

5 Por el término “péptido” se entiende un compuesto que comprende dos o más aminoácidos, como se define a continuación, unidos por un enlace peptídico (es decir, un enlace amida que une la amina de un aminoácido al carboxilo de otro). La expresión “péptido mimético” o “mimético” se refiere a compuestos biológicamente activos que imitan la actividad biológica de un péptido o una proteína, pero ya no son de naturaleza química peptídica, es decir, ya no contienen enlaces peptídicos (es decir, enlaces amida entre aminoácidos). Aquí, la expresión péptido mimético se usa en un sentido más amplio para incluir moléculas que ya no sean completamente de naturaleza peptídica, como los pseudopéptidos, semi-péptidos y peptoides. La expresión “análogo peptídico” se refiere a péptidos que comprenden uno o más análogos de aminoácidos, como se describe a continuación. Ver también *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, M. Goodman *et al.*, Houben-Weyl E22c, Thieme.

15 Por el término “aminoácido” se entiende un aminoácido L o D, un análogo de aminoácido (por ejemplo, naftilalanina) o un mimético de aminoácido que puede ser natural o de origen puramente sintético, y puede ser ópticamente puro, es decir, un solo enantiómero y, por lo tanto, quiral, o una mezcla de enantiómeros. Se usan en el presente documento 3 letras convencionales o abreviaturas de una sola letra para aminoácidos. Preferiblemente, los aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros. Por la expresión “mimético de aminoácidos” se entiende análogos sintéticos de aminoácidos naturales que son isómeros, es decir, se han diseñado para imitar la estructura estérica y electrónica del compuesto natural. Dichos isómeros son habituales por los expertos en la técnica e incluyen, entre otros, depsi-péptidos, péptidos retro-inversos, tioamidas, cicloalcanos o tetrazoles 1,5-disustituidos [véase M. Goodman, *Biopolymers*, 24, 137, (1985)]. Se sabe que los aminoácidos radiomarcados, tales como tirosina, histidina o prolina, son agentes de imagen *in vivo* útiles.

25 Las moléculas Affibody™ se basan en el dominio de residuos de 58 aminoácidos derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína estafilocócica A. Los Affibody pueden usarse en forma de monómeros o dímeros, y han sido revisados 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 Affibody debería permitir una mejor penetración del tejido objetivo y eliminación de sangre en comparación con los anticuerpos que son de 10 a 20 veces más grandes (~150 kDa). Los Affibody también tienen la ventaja de que son estables en un intervalo de condiciones de pH (pH 5,5 a 11). Un Affibody preferido de la invención reconoce HER2. Un Affibody de reconocimiento HER2 preferido comprende el Affibody 1, como se describe a continuación.

30 Cuando el BTM es un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático, un inhibidor enzimático o un compuesto de unión al receptor, es preferiblemente un no péptido y, más preferiblemente, es sintético. Por la expresión “no péptido” se entiende un compuesto que no comprende ningún enlace peptídico, es decir, un enlace amida entre dos residuos de aminoácidos. Los sustratos enzimáticos, antagonistas, agonistas o inhibidores adecuados incluyen glucosa y análogos de glucosa; ácidos grasos o elastasa, angiotensina II o inhibidores de metaloproteinasas. Los compuestos de unión a receptores sintéticos adecuados incluyen estradiol, estrógeno, progestina, progesterona y otras hormonas esteroideas; ligandos para el receptor de dopamina D-1 o D-2, o transportador de dopamina tal como tropanos; y ligandos para el receptor de serotonina.

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

45 Cuando el BTM es un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático o un inhibidor enzimático, los restos de reconocimiento biológico preferidos de la presente invención son moléculas pequeñas sintéticas similares a fármacos, es decir, moléculas farmacéuticas. Ligandos transportadores de dopamina preferidos tales como tropanos; ácidos grasos; ligandos del receptor de dopamina D-2; benzamidas; anfetaminas; bencilguanidinas, iomazenil, benzofurano (IBF) o ácido hipúrico.

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

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

- péptidos quimiotácticos de N-formilo para atacar sitios de acumulación de leucocitos,

- factor plaquetario 4 (PF4) y sus fragmentos,

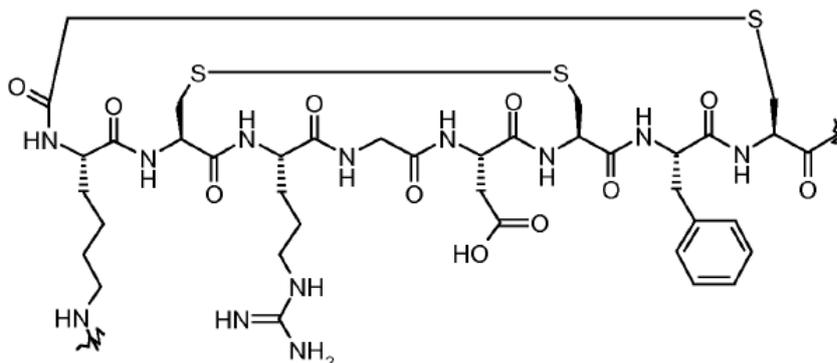
- fragmentos de péptidos de α_2 -antiplasmina, fibronectina o beta-caseína, fibrinógeno o trombospondina. Las secuencias de aminoácidos de α_2 -antiplasmina, fibronectina, beta-caseína, fibrinógeno y trombospondina se pueden encontrar en las siguientes referencias: precursor de α_2 -antiplasmina [M. 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 la 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.

Los péptidos BTM más preferidos se eligen entre Péptido A, Péptido B, Péptido C y Péptido D como se define a continuación:

(i) Péptido 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 de aminoácidos:



donde X¹ es Asn, His o Tyr;

X² es Gly, Ser, Thr o Asn;

X³ es Thr o Arg;

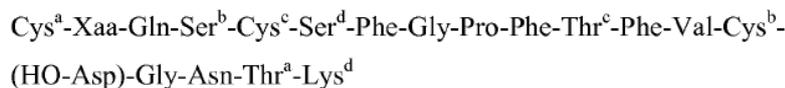
X⁴ es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X⁵ es Ser o Thr;

X⁶ es Asp o Glu;

y Cys^{a-d} son cada uno residuos de cisteína de tal manera que los residuos a y b, así como c y d se ciclan para formar dos enlaces disulfuro separados;

(i) Péptido D = un péptido lantibiótico de fórmula:



en donde Xaa es Arg o Lys;

Cys^a-Thr^a, Ser^b-Cys^b y Cys^c-Thr^c están unidos covalentemente a través de enlaces tioéter;

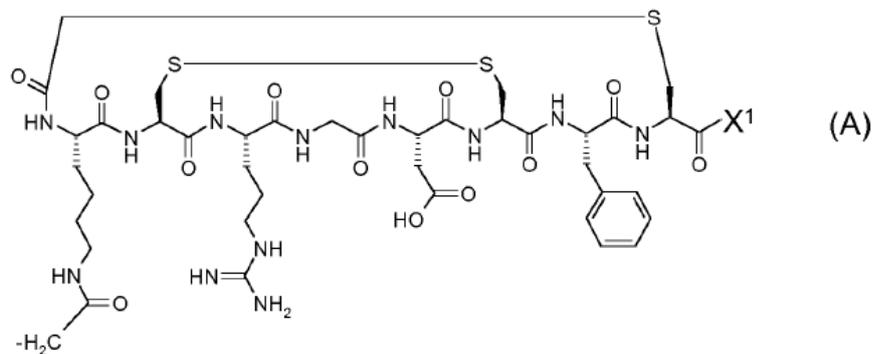
Ser^d-Lys^d están unidos covalentemente a través de un enlace de lisinoalanina;

HO-Asp es el ácido β -hidroxiaspártico.

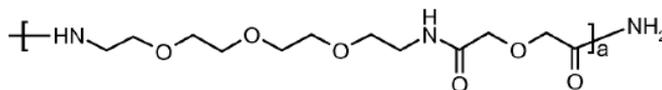
Por la expresión "enlace de lisinoalanina" se entiende que el grupo épsilon amina del residuo Lys está unido como un enlace amina al residuo Ser que se muestra por deshidratación del grupo funcional hidroxilo del Ser dando un enlace $-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_4-$ que une los dos átomos de carbono alfa de los residuos de aminoácidos.

- 5 Los péptidos BTM especialmente preferidos son el péptido B, el péptido C y el péptido D.

El más preferido de un péptido B de este tipo es de fórmula (A):



donde X^1 es $-NH_2$ o



- 10 en donde a es un número entero de desde 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^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Lys.

- 15 Cuando el BTM es un péptido, uno o ambos extremos del péptido, preferiblemente ambos, se han conjugado a un grupo inhibidor del metabolismo (M^{IG}). Tener ambos extremos peptídicos protegidos de esta manera es importante para las aplicaciones de visualización *in vivo*, ya que de lo contrario se esperaría un metabolismo rápido con la consiguiente pérdida de afinidad de unión selectiva por el péptido BTM. Por la expresión "grupo inhibidor del metabolismo" (M^{IG}) se entiende un grupo biocompatible que inhibe o suprime la enzima, especialmente la peptidasa, como la carboxipeptidasa, el metabolismo del péptido BTM en el extremo amino terminal o en el carboxi terminal.
- 20 Dichos grupos son particularmente importantes para aplicaciones *in vivo*, y son habituales por los expertos en la técnica y se eligen de manera adecuada, para el péptido amino terminal:

Los grupos N-acilados $-NH(C=O)R^G$ donde el grupo acilo $-(C=O)R^G$ tienen el R^G elegido entre: alquilo C_{1-6} , grupos arilo C_{3-10} o comprende un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG). Tales grupos amino terminales M^{IG} preferidos son acetilo, benciloxicarbonilo o trifluoroacetilo, lo más preferiblemente acetilo.

- 25 Los grupos inhibidores del metabolismo adecuados para el péptido carboxilo terminal incluyen: carboxamida, éster terc-butílico, éster bencílico, éster ciclohexílico, aminoalcohol o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG). Un grupo M^{IG} adecuado para el residuo de aminoácido carboxilo terminal del péptido BTM es donde la amina terminal del residuo de aminoácido está N-alquilado con un grupo alquilo C_{1-4} , preferiblemente un grupo metilo. Tales grupos M^{IG} preferidos son carboxamida o PEG, los grupos más preferidos son carboxamida.

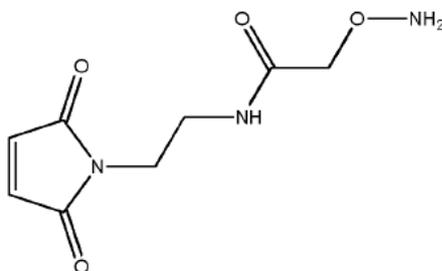
- 30 Los cartuchos SPE de fase inversa adecuados para su uso en la presente invención se pueden obtener de Waters Limited (730-740 Centennial Court, Centennial Park, Elstree, Hertfordshire, Reino Unido).

- Los péptidos funcionalizados con aminoxi se pueden preparar por los métodos de Poethko *et al* [J. Nucl. Med., 45, 892-902 (2004)], Schirmacher *et al* [Bioconj. Chem., 18, 2085-2089 (2007)], Indrevoll *et al* [Bioorg. Med. Chem Lett, 16, 6190-6193 (2006)], Glaser *et al* [Bioconj. Chem., 19, 951-957 (2008)] o Dall'Angelo *et al* [Org. Biomol. Chem., 11, 4551-4558 (2013)]. El grupo aminoxi puede estar conjugado opcionalmente en dos etapas. Primero, el ácido aminoxicarboxílico protegido con N o el éster activado con aminoxi protegido con N se conjuga con el péptido (por
- 35

ejemplo, mediante conjugación con el grupo amino de un residuo Lys, o mediante síntesis convencional en fase sólida). En segundo lugar, el intermedio péptido funcionalizado con aminoxi N-prottegido se desprotege para proporcionar el producto deseado [véanse los documentos de Solbakken y Glaser citados anteriormente]. Los ácidos aminoxi carboxílicos N-prottegidos tales como el ácido Boc-aminoxiacético [Boc-NH-O-CH₂(C=O)OH] y Eei-N-O-CH₂(C=O)OH están disponibles comercialmente, p. ej. en Sigma-Aldrich, Novabiochem e IRIS.

El término “prottegido” se refiere al uso de un grupo protector. Por la expresión “grupo protector” se entiende un grupo que inhibe o suprime reacciones químicas indeseables, pero que está diseñado para ser lo suficientemente reactivo como para que pueda escindirse del grupo funcional en cuestión bajo condiciones suficientemente leves que no modifiquen el resto de la molécula. Después de la desprotección se obtiene el producto deseado. Los grupos protectores de amina son habituales por los expertos en la técnica y se eligen adecuadamente de: Boc (donde Boc es terc-butiloxycarbonilo); Eei (donde Eei es etoxietilideno); Fmoc (donde Fmoc es fluorenilmetoxycarbonilo); trifluoroacetilo; aliloxycarbonilo; Dde [es decir 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etil] o Npys (es decir, 3-nitro-2-piridina sulfenilo). El uso de grupos protectores adicionales se describe en Protective Groups in Organic Synthesis, 4^a edición, Theodorora W. Greene y Peter G. M. Wuts, [Wiley Blackwell, (2006)]. Los grupos protectores de amina preferidos son Boc y Eei, más preferiblemente Eei.

Además, la maleimida funcionalizada con aminoxi Mal-AO ha sido descrita por Padilla de Jesus *et al* [documento US 7.902.332 y Mol.Imaging Biol., 10, 177-181 (2008)]:



Mal-AO

El enlazador bifuncional Mal-AO puede usarse para unir grupos funcionales aminoxi a BTM que contienen tiol, por reacción selectiva de dicho tiol con la función maleimida de Mal-AO. Padilla de Jesús (citado anteriormente) aplica esto a la conjugación de Mal-AO a un Affibody selectivo con HER2.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de una composición radiofarmacéutica, comprendiendo dicha composición:

- (i) el radiotrazador como se define en el primer aspecto;
- (ii) al menos un radioprotector como se define en el primer aspecto;
- (iii) un vehículo biocompatible que comprende etanol acuoso que tiene un contenido de etanol de 0,1 a 10% v/v;

en una forma adecuada para la administración de mamíferos;

donde dicho método de preparación comprende:

- llevar a cabo el método de purificación de radiotrazador de las etapas (a)-(f) como se define en el primer aspecto;
- (g) opcionalmente diluir el radiotrazador [¹⁸F] purificado de la etapa (f) con un vehículo biocompatible;
- (h) filtrar de forma aséptica la solución opcionalmente diluida de la etapa (g) para dar dicha composición radiofarmacéutica [¹⁸F].

Las realizaciones preferidas del radiotrazador y radioprotector en el segundo aspecto son como se describen en el primer aspecto (arriba).

El “vehículo biocompatible” es un fluido, especialmente un líquido, en el que el radioconjugado se puede suspender o disolver preferiblemente, de modo que la composición sea fisiológicamente tolerable, es decir, se pueda administrar al cuerpo de los mamíferos sin toxicidad o molestias indebidas. El vehículo biocompatible es adecuadamente un vehículo líquido inyectable tal como agua estéril, libre de pirógenos para inyección; una solución acuosa tal como una solución salina (que puede equilibrarse ventajosamente para que el producto final en su inyección sea isotónico); una solución tampón acuosa que comprende un agente tamponador biocompatible (por

ejemplo, tampón fosfato); una solución acuosa de una o más sustancias que ajusten la tonicidad (por ejemplo, sales de cationes plasmáticos con contraiones biocompatibles), azúcares (por ejemplo, glucosa o sacarosa), alcoholes de azúcar (por ejemplo, sorbitol o manitol), glicoles (por ejemplo, glicerol) u otros materiales de poliol no iónicos (por ejemplo, polietilenglicoles, propilenglicoles y similares). Preferiblemente, el vehículo biocompatible es agua para inyección libre de pirógenos, solución salina isotónica o tampón fosfato.

Por la frase “en una forma adecuada para la administración de mamíferos” se entiende una composición que es estéril, libre de pirógenos, carece de compuestos que produzcan efectos tóxicos o adversos, y se formula a un pH biocompatible (aproximadamente de pH 4,0 a 10,5). Dichas composiciones carecen de partículas con las que se pueda correr el riesgo de producir embolias *in vivo*, y están formuladas para que no se produzca precipitación en contacto con fluidos biológicos (por ejemplo, sangre). Dichas composiciones también contienen solo excipientes biológicamente compatibles, y son preferiblemente isotónicas.

El radiotrazador y el vehículo biocompatible se suministran en un vial o recipiente adecuado que comprende un recipiente sellado que permite el mantenimiento de la integridad estéril y/o la seguridad radiactiva, además de opcionalmente un gas inerte en el espacio de cabeza (por ejemplo, nitrógeno o argón), al tiempo que permite la adición y extracción de soluciones, por jeringa o cánula. Un recipiente de este tipo preferido es un vial sellado con septum, en el que el cierre hermético a los gases está prensado con un sello (típicamente de aluminio). El cierre es adecuado para punciones simples o múltiples con una aguja hipodérmica (por ejemplo, un cierre de sellado de tabique engarzado) mientras se mantiene la integridad estéril. Dichos recipientes tienen la ventaja adicional de que el cierre puede soportar el vacío si se desea (por ejemplo, para cambiar el gas del espacio de cabeza o las soluciones de desgasificación), y soportar cambios de presión tales como reducciones de presión sin permitir la entrada de gases atmosféricos externos, como oxígeno o vapor de agua.

Los recipientes de dosis múltiples preferidos comprenden un vial a granel único que contiene dosis de pacientes múltiples, por lo que las dosis de pacientes individuales se pueden extraer en jeringas de grado clínico a varios intervalos de tiempo durante la vida útil viable de la preparación para adaptarse a la situación clínica. Las jeringas precargadas están diseñadas para contener una sola dosis humana, o “dosis unitaria” y, por lo tanto, son preferiblemente una jeringa desechable u otra adecuada para uso clínico.

La composición radiofarmacéutica puede contener excipientes opcionales adicionales tales como: un conservante antimicrobiano, agente de ajuste del pH, relleno, solubilizante o agente de ajuste de osmolalidad.

Por el término “carga” se entiende un agente de carga farmacéuticamente aceptable que pueda facilitar la manipulación del material durante la producción y la liofilización. Las cargas adecuadas incluyen sales inorgánicas tales como cloruro de sodio y azúcares solubles en agua o alcoholes de azúcar tales como sacarosa, maltosa, manitol o trehalosa.

Por el término “solubilizador” se entiende un aditivo presente en la composición que aumenta la solubilidad del agente de interés en el disolvente. Un disolvente preferido de este tipo es un medio acuoso y, por lo tanto, el solubilizador mejora preferiblemente la solubilidad en agua. Tales solubilizadores adecuados incluyen: alcoholes C₁₋₄; glicerina; polietilenglicol (PEG); propilenglicol; monooleato de polioxietilensorbitán; monooleato de sorbitán; polisorbatos; copolímeros de bloques de poli(oxietileno)poli(oxipropileno)poli(oxietileno) (PluronicTM); ciclodextrinas (p. ej. alfa, beta o gamma ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina o hidroxipropil-γ-ciclodextrina) y lecitina.

Por la expresión “conservante antimicrobiano” se entiende un agente que inhibe el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos como bacterias, levaduras o mohos. El conservante antimicrobiano también puede exhibir algunas propiedades bactericidas, dependiendo de la dosis empleada. El papel principal del/de los conservante(s) antimicrobiano(s) de la presente invención es inhibir el crecimiento de cualquiera de dichos microorganismos en la composición farmacéutica. Sin embargo, el conservante antimicrobiano también puede usarse opcionalmente 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/los conservante(s) antimicrobiano(s) adecuado(s) incluye(n): los parabenos, es decir, parabenos de metilo, etilo, propilo o butilo o mezclas de los mismos; alcohol de bencilo; fenol; cresol; cetrimida y tiomersal. El/los conservante(s) antimicrobiano(s) preferido(s) son los parabenos.

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

El método del segundo aspecto puede llevarse a cabo de varias maneras:

- 1) técnicas de fabricación aséptica en las que las etapas se llevan a cabo en un ambiente de sala limpia;

2) esterilización terminal, en la cual las etapas (a)-(g) del primer aspecto se llevan a cabo sin usar fabricación aséptica, y luego se esterilizan como la última etapa [p. ej. por irradiación gamma, autoclave, calor seco o tratamiento químico (por ejemplo, con óxido de etileno)];

5 3) técnicas de fabricación aséptica en las que las etapas se llevan a cabo utilizando un aparato sintetizador automatizado.

Se prefiere el método (3). Por lo tanto, en el método del tercer aspecto, al menos una de las etapas (b)-(f) o (b)-(h) está preferiblemente automatizado. Más preferiblemente, la automatización se lleva a cabo utilizando un aparato sintetizador automatizado. Lo más preferiblemente, el aparato sintetizador automatizado comprende un casete de un solo uso.

10 Por la expresión "sintetizador automatizado" se entiende un módulo automatizado basado en el principio de las operaciones unitarias como lo describen Satyamurthy *et al* [Clin. Positr. Imag., 2 (5), 233-253 (1999)]. La expresión "operaciones unitarias" significa que los procesos complejos se reducen a una serie de operaciones o reacciones simples, que se pueden aplicar a una gama de materiales. Tales sintetizadores automatizados son preferidos para el método de la presente invención, especialmente cuando se desea una composición radiofarmacéutica. Están disponibles comercialmente de una gama de proveedores [Satyamurthy *et al*, arriba], 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 (Estados Unidos).

15 Los sintetizadores automatizados comerciales también proporcionan contenedores adecuados para los desechos radiactivos líquidos generados como resultado de la preparación radiofarmacéutica. Los sintetizadores automatizados no suelen estar provistos de blindaje contra la radiación, ya que están diseñados para ser empleados en una celda de trabajo radioactiva configurada adecuadamente. La celda de trabajo radioactiva proporciona un blindaje de radiación adecuado para proteger al operador de la dosis potencial de radiación, así como también ventilación para eliminar los vapores químicos y/o radiactivos. El sintetizador automatizado comprende preferiblemente un casete.

25 Por el término "casete" se entiende una unidad de aparato diseñada de tal manera que toda la unidad encaja de manera extraíble e intercambiable en un aparato sintetizador automatizado (como se definió anteriormente), de tal manera que el movimiento mecánico de las partes móviles del sintetizador controle la operación del casete desde fuera del casete, es decir, externamente. Los casetes adecuados comprenden un conjunto lineal de válvulas, cada una unida a un puerto donde se pueden unir reactivos o viales, ya sea por punción con aguja de un vial invertido sellado con tabique, o por juntas de unión herméticas a los gases. Cada válvula tiene una unión macho-hembra que interactúa con un brazo móvil correspondiente del sintetizador automatizado. La rotación externa del brazo controla así la apertura o el cierre de la válvula cuando el casete está conectado al sintetizador automatizado. Las partes móviles adicionales del sintetizador automatizado están diseñadas para engancharse en las puntas del émbolo de la jeringa y, por lo tanto, elevar o presionar los barriles de la jeringa.

35 El casete es versátil, típicamente tiene varias posiciones donde se pueden unir reactivos, y varios adecuados para la fijación de viales de jeringa de reactivos o cartuchos de cromatografía (por ejemplo, extracción en fase sólida o SPE). El casete siempre comprende un recipiente de reacción. Tales recipientes de reacción son preferiblemente de 1 a 10 cm³, lo más preferiblemente de 2 a 5 cm³ en volumen y están configurados de modo que 3 o más puertos del casete estén conectados al mismo, para permitir la transferencia de reactivos o disolventes desde varios puertos en el casete. Preferiblemente, el casete tiene de 15 a 40 válvulas en una disposición lineal, lo más preferiblemente de 20 a 30, siendo especialmente preferido 25. Las válvulas del casete son preferiblemente cada una idéntica, y lo más preferiblemente son válvulas de 3 vías. Los casetes están diseñados para ser adecuados para la fabricación radiofarmacéutica y, por lo tanto, están fabricados con materiales que son de grado farmacéutico e idealmente también son resistentes a la radiolisis.

45 Los sintetizadores automatizados preferidos de la presente invención comprenden un casete 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 un radiofármaco radiofluorado. Casete significa que el sintetizador automatizado tiene la flexibilidad de ser capaz de producir una variedad de radiofármacos diferentes con un riesgo mínimo de contaminación cruzada, simplemente cambiando el casete. El enfoque de casete también tiene las ventajas de: configuración simplificada, por lo tanto, menor riesgo de error del operador; cumplimiento mejorado de GMP (buenas prácticas de fabricación); capacidad de trazado múltiple; cambio rápido entre ciclos de producción; comprobación de diagnóstico automatizada previa al ciclo del casete y los reactivos; verificación automatizada de códigos de barras de reactivos químicos frente a la síntesis a realizar; trazabilidad de reactivos; de un solo uso y, por lo tanto, sin riesgo de contaminación cruzada, manipulación y resistencia al abuso.

55 El método del segundo aspecto preferiblemente comprende además:

(j) dispensar la composición radiofarmacéutica [¹⁸F]-radiotrazador de la etapa (h) en una o más jeringas.

La etapa de secuencia que sigue a la etapa (h) se elige en este documento deliberadamente para que sea "(j)", para evitar una posible confusión con el número romano uno.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un casete de un solo uso como se define en el segundo aspecto para llevar a cabo el método automatizado descrito allí, comprendiendo dicho casete:

- (i) un recipiente adecuado para contener la solución de radiotrazador [¹⁸F] para purificar como se define en el primer aspecto;
- 5 (ii) uno o más cartuchos SPE de fase inversa como se define en el primer aspecto;
- (iii) un suministro de la solución de lavado como se define en el primer aspecto;
- (iv) un suministro del disolvente de elución como se define en el primer aspecto, en el que dicho disolvente de elución comprende 40-60% v/v de etanol acuoso.

10 Las realizaciones preferidas del radiotrazador, el cartucho SPE, la solución de lavado y el disolvente de elución en el casete son como se describe en el primer aspecto (arriba).

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona el uso del casete del tercer aspecto ajustado en un aparato sintetizador automatizado para llevar a cabo el método de preparación del primer aspecto, o el método de radiomarcado del tercer aspecto.

15 Las realizaciones preferidas del sintetizador automatizado en el cuarto aspecto son como se describen en el segundo aspecto (arriba).

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el perfil de elución de radiación del Compuesto 3 a través de una columna SPE, durante el proceso de carga, lavado y elución usando detectores de radiactividad colocados en un casete FastLab, incluso al lado de la columna SPE.

20 La Figura 2 muestra una configuración de casete FastLab para la radiosíntesis automatizada y la purificación automatizada del Compuesto 3.

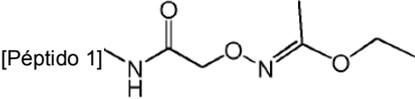
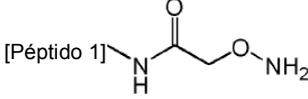
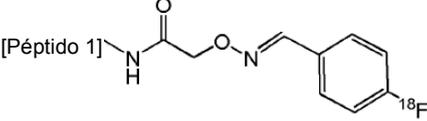
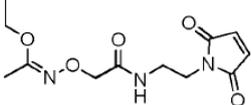
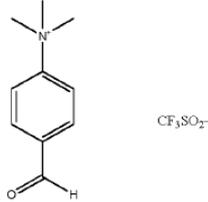
La invención se ilustra mediante los ejemplos no limitantes detallados a continuación. El ejemplo 1 proporciona la síntesis de un péptido dirigido a c-Met de la invención ("Péptido 1"). El ejemplo 2 proporciona la síntesis de un péptido 1 funcionalizado con aminoxi ("Compuesto 1"), en el que el grupo funcional aminoxi está protegido con un grupo protector (Eei), y la posterior desprotección para dar el Compuesto 2. El ejemplo 3 proporciona la radiosíntesis de [¹⁸F]-fluorobenzaldehído. El Ejemplo 4 es un Ejemplo comparativo, que proporciona la radiosíntesis del Compuesto 3 conjugado marcado con ¹⁸F, sin la metodología de la presente invención. El RCP en este caso es relativamente bajo (79%) al final de la síntesis.

30 El Ejemplo 5 proporciona un análisis de la identidad y el curso temporal de las impurezas radioquímicas en el Compuesto 3 de bajo RCP purificado de acuerdo con el Ejemplo 4. Esto proporciona evidencia de que la radiólisis en proceso durante el intento de purificación cromatográfica fue responsable del bajo RCP. El ejemplo 5 proporciona información sobre el movimiento de la radiactividad a través de la columna SPE durante la purificación SPE, lo que demuestra que el RAC supera los 45 GBq/ml durante el proceso SPE. Este RAC muy alto, pero con un límite de tiempo, también es indicativo de radiólisis en proceso.

35 El ejemplo 7 proporciona una síntesis y purificación automatizadas del Compuesto 3, usando un sintetizador y casete automatizados. Se logró un aumento significativo en el rendimiento de EOS al preparar una solución de purificación de MeCN/PBS que contenía 2,5 mg/Na-pABA, pero el EOS RCP aún era bajo y vulnerable a un alto RAC (RCP = 89% cuando un RAC de 660 MBq/ml, RCP = 85% cuando un RAC de 844 MBq/ml en una formulación de 25 ml). Un RAC alto en EOS indica un RAC aún mayor en el cartucho durante las etapas posteriores del proceso de purificación. El RCP se mejoró aún más al aumentar el contenido de Na-pABA de la solución de radiotrazador a 5 mg/ml a 89-91%. La adición de etanol (2%) a la solución de radiotrazador y a la solución de lavado resultó en una mejora adicional en RCP a > 92%. El proceso del Ejemplo 7 elimina el 85% de las impurezas relacionadas con el péptido y esencialmente toda la anilina (20 µg restantes de 100.000 µg de anilina presente en el producto bruto antes de la purificación). La adición de pABA y etanol no afectó negativamente el rendimiento de la purificación SPE con respecto a la eliminación de impurezas químicas.

45 El ejemplo 8 proporciona la síntesis de un enlazador bifuncional de aminoxi maleimida (Compuesto 4).

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 ₂ o Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK-NH ₂
Compuesto 1	
Compuesto 2	
Compuesto 3	
Compuesto 4	
Affibody 1	AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQKRAFIRKLYDDPSQSSE LLSEAKKLNDSQAPKVDC
Precursor 1	

donde:

Los compuestos 1, 2 y 3 se funcionalizan en el grupo épsilon amina del terminal carboxilo Lys del péptido 1;

5 Affibody 1 es selectivo para HER2.

Abreviaturas

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

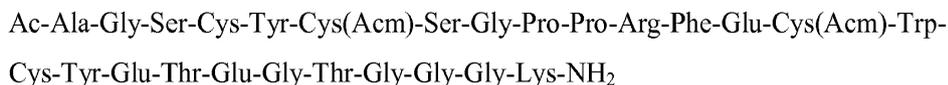
- Ac: acetilo
- Acm: acetamidometilo
- 10 ACN o MeCN: acetonitrilo.
- AcOH: ácido acético.
- Boc: *terc*-Butiloxicarbonilo.
- BTM: resto de reconocimiento biológico.
- tBu: butilo *terciario*
- 15 DCM: diclorometano

	DIPEA:	N, N-diisopropiletilamina
	DMF:	dimetilformamida
	DMSO:	Dimetilsulfóxido
	Eei:	etoxietilidina;
5	Eei-AOAc-OSu:	éster de <i>N</i> -hidroxisuccinimidilo del ácido <i>N</i> -(1-etoxietiliden)-2-aminoxiacético;
	EOS:	fin de la síntesis;
	FBA:	4-fluorobenzaldehído;
	Fmoc:	9-fluorenilmetoxycarbonilo;
	HBTU:	hexafluorofosfato de <i>O</i> -benzotriazol-1-il- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio;
10	HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución;
	MW:	peso molecular;
	NHS:	<i>N</i> -hidroxi-succinimida;
	NMM:	<i>N</i> -metilmorfolina;
	NMP:	1-metil-2-pirrolidinona;
15	PBS:	solución salina tamponada con fosfato;
	Pbf:	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo;
	RAC:	concentración radiactiva.
	RCP:	pureza radioquímica.
	RP-HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa;
20	tBu:	terc-butilo;
	TFA:	ácido trifluoroacético;
	THF:	tetrahidrofurano;
	TIS:	triisopropilsilano;
	Trt:	Tritilo.

25 Ejemplo 1: Síntesis del péptido 1

Etapa (a): síntesis del péptido lineal protegido por precursor

El péptido lineal precursor tiene la estructura:



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

35 La eliminación simultánea de los grupos protectores de la cadena lateral y la escisión del péptido de la resina se llevó a cabo en TFA (10 ml) que contenía 2,5% de TIS, 2,5% de 4-tiocresol y 2,5% de agua durante 2 horas y 30 minutos. La resina se eliminó por filtración, el TFA se eliminó al vacío y se añadió éter dietílico al residuo. El precipitado formado se lavó con éter dietílico y se secó al aire proporcionando 264 mg de péptido bruto.

40

Purificación por HPLC preparativa (gradiente: 20-30% de B durante 40 min donde A = H₂O/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 del producto: 30 min) del péptido bruto proporcionó 100 mg de precursor lineal de Péptido 1 puro. El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (gradiente: 10-40% de B durante 10 min donde A = H₂O/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 del producto: 6,54 min). Se llevó a cabo una caracterización adicional del producto utilizando espectrometría de masas por electroaspersión (MH₂²⁺ calculado: 1464,6, MH₂²⁺ encontrado: 1465,1).

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

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-NH₂.

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

Purificación por HPLC preparativa (gradiente: 0% de B durante 10 min, luego 0-40% de B durante 40 min donde A = H₂O/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 del producto: 44 min) del residuo produjo 72 mg de precursor monocíclico de Péptido 1 puro. El producto puro (como una mezcla de isómeros P1 a P3) se analizó por HPLC analítica (gradiente: 10-40% de B durante 10 minutos donde A = H₂O/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 del producto: 5,37 min (P1); 5,61 min (P2); 6,05 min (P3)). Se realizó una caracterización adicional del producto usando espectrometría de masas por electroaspersión (MH₂²⁺ calculado: 1463,6, MH₂²⁺ encontrado: 1464,1 (P1); 1464,4 (P2); 1464,3 (P3)).

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

El precursor monocíclico de la etapa (b) (72 mg) se disolvió en AcOH al 75%/agua (72 ml) bajo una capa de nitrógeno. Se añadieron HCl 1 M (7,2 ml) e I₂ 0,05 M en AcOH (4,8 ml) en ese orden y la mezcla se agitó durante 45 minutos. Se añadió ácido ascórbico 1 M (1 ml) dando una mezcla incolora. La mayoría de los disolventes se evaporaron al vacío y el residuo (18 ml) se diluyó con agua/TFA al 0,1% (4 ml) y el producto se purificó usando HPLC preparativa. Purificación por HPLC preparativa (gradiente: 0% de B durante 10 min, luego 20-30% de B durante 40 min donde A = H₂O/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 del producto: 43-53 min) del residuo proporcionó 52 mg de Péptido puro 1. El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (gradiente: 10-40% de B durante 10 min donde A = H₂O/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 del producto: 6,54 min). Se llevó a cabo una caracterización adicional del producto usando espectrometría de masas por electroaspersión (MH₂²⁺ calculado: 1391,5, MH₂²⁺ encontrado: 1392,5).

Ejemplo 2: Síntesis, purificación y liofilización del compuesto 2.

El péptido 1 (0,797 g) y Eei-AOAc-OSu (IRIS Biotech; 127 mg) se disolvieron en DMF (12 ml). Se añadió DIPEA (100 μ l) y la mezcla de reacción se agitó durante 26 min. Se añadió una segunda parte alícuota de DIPEA (80 μ l) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó luego con 10% de ACN/agua/0,1% de acetato de amonio (40 ml), y el producto se purificó por HPLC preparativa usando A = 0,1% de TFA/agua y B = ACN con gradiente de elución de 20-40% de B más de 40 min. Las fracciones que contienen productos puros (son una mezcla de Compuesto 1 y el compuesto 2) se reunieron en un matraz y el matraz se enjuagó con argón. La solución se agitó durante la noche para permitir la eliminación completa de los grupos protectores de Eei. El producto desprotegido se liofilizó proporcionando 550 mg (69%> rendimiento) del Compuesto 2.

El producto puro se analizó mediante LC-MS analítico (gradiente: 10-40% de B durante 5 min donde A = H₂O/0,1% de TFA y B = ACN TFA, caudal: 0,6 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 3,00 min), MH₂²⁺ calculado: 1428,1, MH₂²⁺ encontrado: 1427,9).

Ejemplo 3: Radiosíntesis de [¹⁸F]-fluorobenzaldehído (¹⁸F-FBA)

El [¹⁸F]-fluoruro se produjo usando un ciclotrón GEMS PETtrace con un objetivo de plata a través de la reacción nuclear [¹⁸O] (p, n) [¹⁸F]. Se utilizaron volúmenes objetivo totales de 3,2-4,8 ml. El radiofluoruro quedó atrapado en un cartucho de Waters QMA (preacondicionado con carbonato) y el fluoruro se eluyó con una solución de Kryptofix_{2.2.2}. (5,14 mg) y bicarbonato de potasio (1,40 mg) en agua (800 μ l) y acetonitrilo (200 μ l). Se usó nitrógeno para conducir la solución del cartucho QMA al recipiente de reacción. El fluoruro [¹⁸F] se secó durante 9 minutos a 120°C bajo una corriente constante de nitrógeno y vacío. Se añadió benzaldehído triflato de trimetilamonio,

[Precursor 1; Haka *et al.*, J.Lab. Comp. Radiopharm., 27, 823-833 (1989)] (3,7 mg), en DMSO (2,0 ml) al fluoruro [¹⁸F] seco, y la mezcla se calentó a 80°C durante 2 minutos para producir 4-[¹⁸F]-fluorobenzaldehído.

Ejemplo 4: Radiosíntesis del Compuesto 3 (Ejemplo comparativo)

5 El compuesto 2 del Ejemplo 2 se radiomarcó con ¹⁸F usando ¹⁸F-FBA del Ejemplo 3, luego se purificó usando una columna MCX + SPE, sin la radioestabilización en proceso de la presente invención, dando el Compuesto 3 con un RCP del 79%.

Ejemplo 5: Impurezas radioquímicas en el Compuesto 3 de bajo RCP

El RCP del Compuesto 3 preparado según el Ejemplo 3 se estudió en función del tiempo. El RCP no cayó más con el tiempo (hasta 8 horas), lo que demuestra que:

- 10 (i) El compuesto 3 es relativamente radioestable en las condiciones RAC existentes al final del proceso SPE;
- (ii) el RCP ya debe haber sido bajo al final del proceso SPE.

15 El análisis del Compuesto 3 del Ejemplo 4, es decir, sin usar la metodología de radioestabilización de la presente invención y exhibiendo un bajo RCP (79%), encontró que dos productos de radiolisis son los principales contribuyentes al bajo RCP. Estos fueron identificados por el tiempo de retención en la HPLC analítica, y la comparación con el tiempo de retención de muestras auténticas de los análogos no radiactivos. Estos dos productos de radiolisis son [¹⁸F] 4-fluorobenzaldehído (FBA) y [¹⁸F] 4-fluorobenzonitrilo (FPhCN), que en conjunto representaron el 12% de la radiactividad presente en la preparación del Compuesto 3 de bajo RCP del Ejemplo 4.

20 Estas impurezas radioquímicas principales, que no aumentan significativamente con el tiempo, representan productos de radiodegradación del Compuesto 3 y, a su vez, radiólisis en proceso.

Ejemplo 6: Perfil de elución de SPE en la purificación del compuesto 3.

Se colocaron seis detectores de radiactividad a lo largo de un casete FASTlab, con el Detector N.º 6 colocado hacia el fondo de la columna SPE de una preparación de acuerdo con el Ejemplo 7. El movimiento de radioactividad durante las etapas de carga, lavado y elución del proceso de purificación SPE se siguió de esta manera.

25 Los resultados se muestran en la Figura 1. Se demostró que el producto bruto estaba atrapado en la parte superior del cartucho SPE. A medida que avanzaba la purificación, la radioactividad se desplazaba hacia abajo del cartucho y hacia el detector 6, aumentando la señal. Esto demostró que la radioactividad no se extendía por todo el cartucho, sino que se concentraba en una banda estrecha. Durante la purificación, toda la actividad se concentró en un volumen de menos de 1 ml, dando un RAC durante la purificación (hasta 20 minutos) de 45.000 MBq/ml, es decir 45 GBq/ml.

30

Ejemplo 7: Síntesis automatizada y purificación del compuesto 3

Se utilizó un sintetizador automatizado FASTlab (GE Healthcare Ltd) con casete. El cartucho tC18 se obtuvo de Waters Limited (dirección como arriba). El precursor 1 se hizo reaccionar con [¹⁸F]-fluoruro en el Fastlab de acuerdo con el Ejemplo 3 para dar [¹⁸F]-FBA. El [¹⁸F]-FBA se hizo reaccionar posteriormente en el FastLab con el Compuesto 2 (derivado de aminoxi del Péptido 1) para dar el Compuesto 3 bruto.

35

Purificación

La configuración del casete se da en la Figura 2. Se usan tres viales de disolventes externos en el casete para la purificación SPE:

Posición 17 = etanol anhidro;

40 Posición 18 = Solución de lavado de 5 mg/ml de Na-pABA EtOH al 2% en 79 g de PBS/16,5 g de MeCN;

Posición 20 = Tampón de formulación de 34 ml de PBS que contiene 80 mg de Na-pABA.

Otras posiciones de casete:

Posición 21: Tubo al cartucho tC18 en la Posición 22;

Posición 22: cartucho tC18;

45 Posición 23: filtro estéril.

Procedimiento de FASTlab

A continuación, P17, etc., se refiere a la posición 17 del casete. S2 y S3 se refieren a la jeringa 2 y la jeringa 3:

(i) la primera parte del proceso de purificación fue acondicionamiento con un llenado completo de S2 con etanol de P17, seguido de un llenado completo de S2 de solución MeCN/PBS de P18.

5 (ii) el Compuesto bruto 3 en la solución acuosa de etanol de la etapa de conjugación se diluyó 1:1 con el tampón de formulación de P20. Esto se realizó en dos porciones: la mitad del contenido del volumen bruto del recipiente de reacción se transfirió a S2, y luego se mezcló con el mismo volumen de tampón de formulación de P20. Esta mezcla fue atrapada lentamente en el cartucho tC18. Después de la primera captura, se repitió el mismo procedimiento con la mitad restante del bruto.

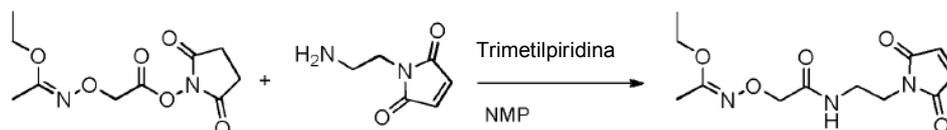
10 (iii) S2 se enjuagó con agua y después se llenó completamente de S2 con la solución de lavado MeCN de P18. El lavado con MeCN se empujó lentamente a través del cartucho tC18 y se desperdició. Esto se repitió 5 veces más, seis lavados en total (se obtuvieron resultados similares cuando el procedimiento tuvo solo tres lavados en total).

15 (iv) el MeCN en el cartucho tC18 se eliminó por intercambio de disolventes: primero 2x llenado completo de S2 con el tampón de formulación de P20 seguido por un llenado completo de S2 con agua de la bolsa de agua.

(v) el eluyente se preparó mezclando 3 ml de etanol de P17 y 3 ml de tampón de formulación de P20 en S2. El primer 1 ml del eluyente se pasó a través del tC18 y se desechó, los siguientes 4 ml de eluyente se pasaron a través del tC18 y el producto del Compuesto 3 purificado se recogió en S3. Después de la elución, el producto se transfirió del FASTlab al frasco de producto a través de P19.

20 La pureza radioquímica (RCP) en este caso fue del 92%.

Ejemplo 8: Síntesis del enlazador bifuncional (Compuesto 4)



Compuesto 4

25 La sal de TFA de N-(2-aminoetil)maleimida (Sigma-Aldrich; 151 mg) y Eei-AOAc-OSu (IRIS Biotech; 77 mg) se agitaron en NMP (2 ml) a temperatura ambiente. Se añadió trimetilpiridina (80 µl) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 70 minutos. La reacción se interrumpió mediante dilución con ácido acético al 0,1% (7 ml). El producto se purificó por HPLC preparativa como sigue:

Detección	UV a 214 nm y 254 nm
Tipo y tamaño de columna	Luna C-18 (2), 5 µm, 100Å, 20 x 250 mm de Phenomenex
Eluyente A	0,1% v/v de ácido acético en agua, 1 ml/l
Eluyente B	Acetonitrilo (Lichrosolv)
Gradiente	15-30% de B durante 40 min.
Caudal	10 ml/min durante la elución en gradiente

El Compuesto 4 purificado se liofilizó. Rendimiento 43 mg (75%), pureza:> 97% por área.

30 El producto puro se analizó mediante LC-MS analítica (gradiente: 10-40% de B durante 5 min donde A = H₂O/0,1% de TFA y B = ACN/0,1% de TFA, caudal: 0,6 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3µ C18 (2) 20 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 1,93 min), MH⁺ calculado: 284,1, MH⁺ encontrado: 284,1).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GE Healthcare Limited

5 <120> MÉTODO DE PURIFICACIÓN Y COMPOSICIONES

<130> PZ1392 PCT

<140> PCT/EP2014/078608

10 <141> 18-12-2014

<160> 5

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys

1 5

25 <210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <220>

<221> X

<222> (2)..(2)

<223> Asn o His o Tyr

35 <220>

<221> X

<222> (4)..(4)

<223> Gly o Ser o Thr o Asn

40 <220>

<221> X

<222> (8)..(8)

<223> Thr o Arg

45 <220>

<221> X

<222> (15)..(15)

<223> Ala o Asp o Glu o Gly o Ser

50 <220>

<221> X

<222> (16)..(16)

<223> Ser o Thr

55 <220>

<221> X

<222> (17)..(17)

<223> Asp o Glu

60 <400> 2

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

1 5 10 15

Xaa

ES 2 750 624 T3

<210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> X
 <222> (2)..(2)
 10 <223> Arg o Lys

 <220>
 <221> X
 <222> (15)..(15)
 15 <223> Ácido beta-hidroxiaspártico

 <400> 3
 Cys Xaa Gln Ser Cys Ser Phe Gly Pro Phe Thr Phe Val Cys Xaa Gly
 1 5 10 15

 Asn Thr Lys

 20 <210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 25 <400> 4
 Ala Gly Ser Cys Tyr Cys Ser Gly Pro Pro Arg Phe Glu Cys Trp Cys
 1 5 10 15

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

 <210> 5
 <211> 61
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 5
 Ala Glu Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
 1 5 10 15

 Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
 20 25 30
 35 Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
 35 40 45

 Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys
 50 55 60

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de un radiotrazador que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar un radiotrazador que comprende un resto de reconocimiento biológico funcionalizado con aminoxi marcado con ^{18}F ;

5 (b) añadir un radioprotector a dicho radiotrazador para dar una solución de radiotrazador que comprende dicho radiotrazador en uno o más disolventes orgánicos acuosos miscibles en agua con un contenido de disolvente orgánico del 5 al 25% v/v;

(c) hacer pasar la solución de radiotrazador de la etapa (b) a través de un cartucho SPE de fase inversa, en el que el radiotrazador se retiene en dicho cartucho SPE;

10 (d) lavar el cartucho SPE de la etapa (c) una o más veces con una solución de lavado que comprende una solución de disolvente(s) orgánico(s) acuoso(s) miscible(s) con agua de un radioprotector con un contenido de disolvente orgánico de 15 a 25% v/v;

(e) lavar el cartucho SPE de la etapa (d) una o más veces con agua o solución tampón acuosa;

15 (f) eluir el cartucho SPE lavado de la etapa (d) o (e) con un disolvente de elución que comprende un radioprotector en una solución acuosa de etanol que tiene un contenido de etanol de 35 a 80% v/v, en donde el eluyente comprende radiotrazador purificado en dicho disolvente de elución,

en donde cada radioprotector comprende independientemente uno o más de: ácido ascórbico; ácido *para*-aminobenzoico; y ácido gantísico, y sus sales con un catión biocompatible.

20 2. El método de la reivindicación 1, donde el disolvente orgánico miscible en agua de la solución de radiotrazador comprende acetonitrilo.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la solución de radiotrazador de la etapa (b) comprende de 0,5 a 5% v/v de etanol.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cartucho SPE es un cartucho SPE C18.

25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el disolvente de elución de la etapa (f) comprende de 35 a 70% v/v de etanol acuoso.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el radioprotector comprende ácido 4-aminobenzoico, o una sal del mismo con un catión biocompatible.

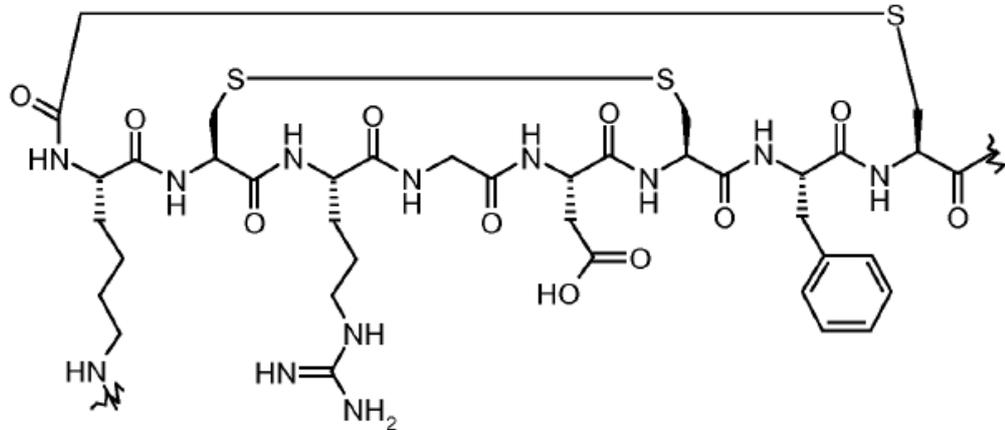
30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el BTM comprende un solo aminoácido, un péptido de 3-100 mer, un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático, un inhibidor enzimático o un compuesto de unión al receptor.

8. El método de la reivindicación 7, donde el BTM comprende un AffibodyTM.

9. El método de la reivindicación 7, donde el BTM comprende un péptido de 3-100 mer que se elige entre el péptido A, el péptido B, el péptido C y el péptido D como se define a continuación:

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

35 (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 de aminoácidos:



en donde X¹ es Asn, His o Tyr;

5 X² es Gly, Ser, Thr o Asn;

X³ es Thr o Arg;

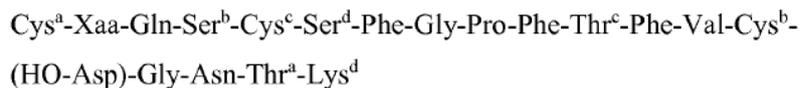
X⁴ es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X⁵ es Ser o Thr;

X⁶ es Asp o Glu;

10 y Cys^{a-d} son cada uno residuos de cisteína de manera que los residuos a y b, así como c y d, se ciclan para formar dos enlaces disulfuro separados;

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



en donde Xaa es Arg o Lys;

15 Cys^a-Thr^a, Ser^b-Cys^b and Cys^c-Thr^c están unidos covalentemente a través de enlaces tioéter;

Ser^d-Lys^d están unidos covalentemente a través de un enlace de lisinoalanina;

HO-Asp es ácido β-hidroxiaspártico.

10. Un método de preparación de una composición radiofarmacéutica, comprendiendo dicha composición:

(i) el radiotrazador como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 7-9;

20 (ii) al menos un radioprotector como se define en la reivindicación 1 o 6;

(iii) un vehículo biocompatible que comprende etanol acuoso que tiene un contenido de etanol de 0,1 a 10% v/v;

en una forma adecuada para la administración de mamíferos;

donde dicho método de preparación comprende:

25 • llevar a cabo el método de purificación de radiotrazador de las etapas (a)-(f) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;

(g) opcionalmente diluir el radiotrazador [¹⁸F] purificado de la etapa (f) con un vehículo biocompatible;

(h) filtrar de forma aséptica la solución opcionalmente diluida de la etapa (g) para dar dicha composición radiofarmacéutica de [¹⁸F].

11. El método de la reivindicación 10, en donde al menos una de las etapas (b)-(f) o (b)-(h) está automatizada y donde la automatización se lleva a cabo utilizando un aparato sintetizador automatizado.
- 5 12. El método de la reivindicación 11, donde dicho aparato sintetizador automatizado comprende un casete de un solo uso.
13. El método de la reivindicación 12, donde el casete de un solo uso comprende:
- (i) un recipiente que contiene la solución de radiotrazador [¹⁸F] a purificar;
 - (ii) uno o más cartuchos SPE de fase inversa;
 - 10 (iii) un suministro de la solución de lavado como se define en la reivindicación 1;
 - (iv) un suministro del disolvente de elución como se define en la reivindicación 1.
14. Un casete de un solo uso como se define en la reivindicación 12, para llevar a cabo el método automatizado de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que comprende:
- (i) un recipiente adecuado para contener la solución de radiotrazador [¹⁸F] a purificar;
 - 15 (ii) uno o más cartuchos SPE de fase inversa C8 o C18;
 - (iii) un suministro de la solución de lavado como se define en la reivindicación 1;
 - (iv) un suministro del disolvente de elución como se define en la reivindicación 1, donde dicho disolvente de elución comprende 40-60% v/v de etanol acuoso.
- 20 15. Uso del casete como se define en la reivindicación 14 ajustado a un aparato sintetizador automatizado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para llevar a cabo el método de purificación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o el método de preparación de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.

Figura 1: Perfil de elución radiactivo durante SPE

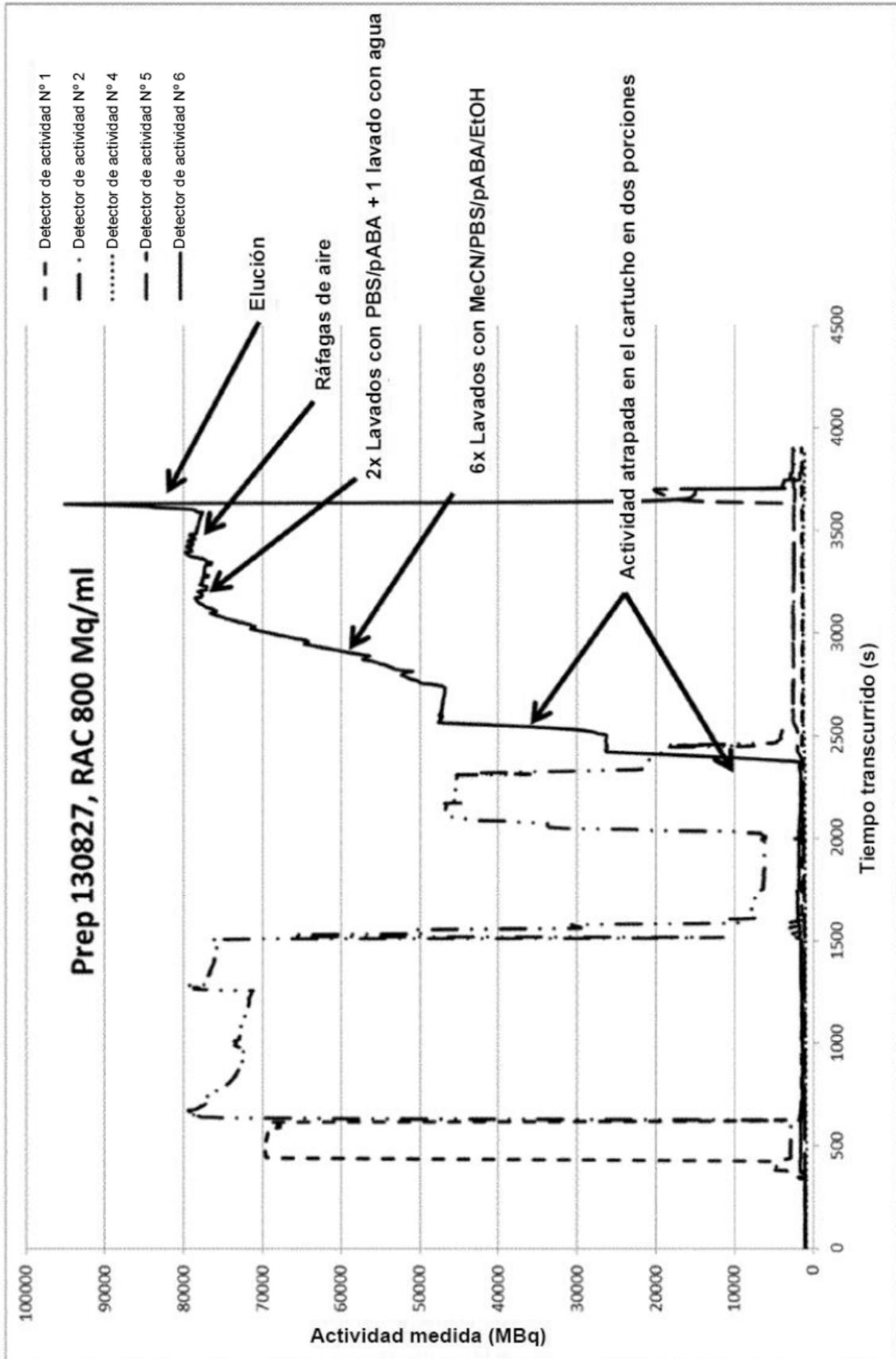


Figura 2: Configuración del casete

