

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 119**

51 Int. Cl.:

C07B 59/00 (2006.01)
C07K 1/13 (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
B01J 19/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2014** **PCT/EP2014/067775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015** **WO15024983**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2014** **E 14752896 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019** **EP 3036208**

54 Título: **Método de radiomarcaje**

30 Prioridad:

21.08.2013 GB 201314936

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

INDREVOLL, BARD y
SKJOLD, WILLY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 764 119 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 radiomarcaje

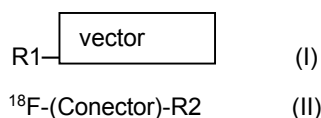
Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de compuestos radiofarmacéuticos para la formación de imágenes *in vivo*, en particular a un método de marcaje de una molécula de direccionamiento biológico con el radioisótopo ^{18}F . La invención proporciona un método de preparación de composiciones liofilizadas de biomoléculas funcionalizadas con aminooxi, además de métodos de radiomarcaje usando los materiales purificados.

La invención es particularmente adecuada para usar con un aparato sintetizador automatizado.

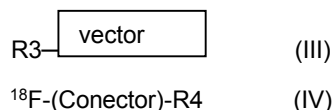
Antecedentes de la invención

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



o,

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



En donde:

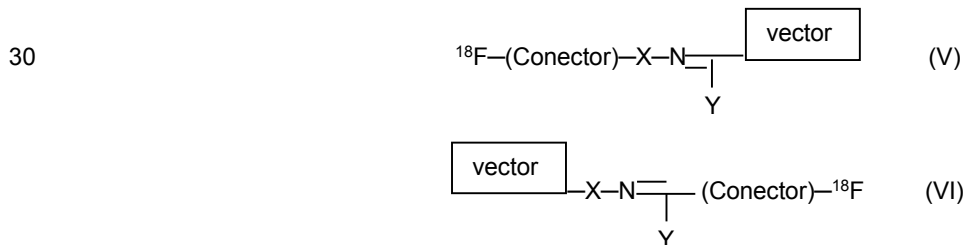
20 R1 es un resto aldehído, un resto cetona, un aldehído protegido tal como un acetal, una cetona protegida, tal como un cetal, o una funcionalidad, tal como diol o residuo de serina N-terminal, que puede oxidarse rápidamente y eficientemente a un aldehído o cetona usando un agente oxidante;

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

25 R3 es un grupo seleccionado de amina primaria, amina secundaria, hidroxilamina, hidrazina, hidrazida, aminooxi, fenilhidrazina, semicarbazida o tiosemicarbazida;

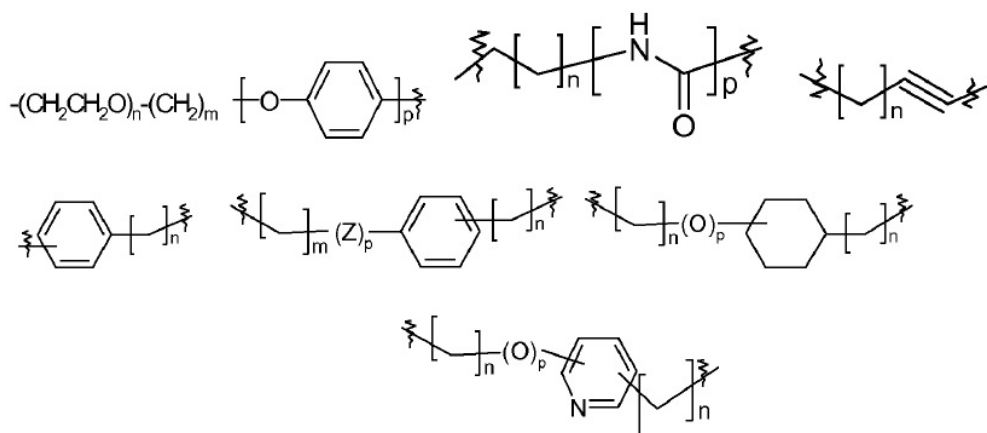
R4 es un resto aldehído, un resto cetona, un aldehído protegido tal como un acetal, una cetona protegida, tal como un cetal, o una funcionalidad, tal como diol o residuo de serina N-terminal, que puede oxidarse rápidamente y eficientemente a un aldehído o cetona usando un agente oxidante;

Para dar un conjugado de fórmula (V) o (VI) respectivamente:



35 En donde X es $-\text{CO}-\text{NH}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, $-\text{NHCONH}-$, o $-\text{NHCSNH}-$, y es preferiblemente $-\text{CO}-\text{NH}-$, $-\text{NH}-$ u $-\text{O}-$; Y es H, sustituyentes alquilo o arilo; y

El grupo conector en los compuestos de fórmulas (II), (IV), (V) y (VI) se selecciona de:



En donde:

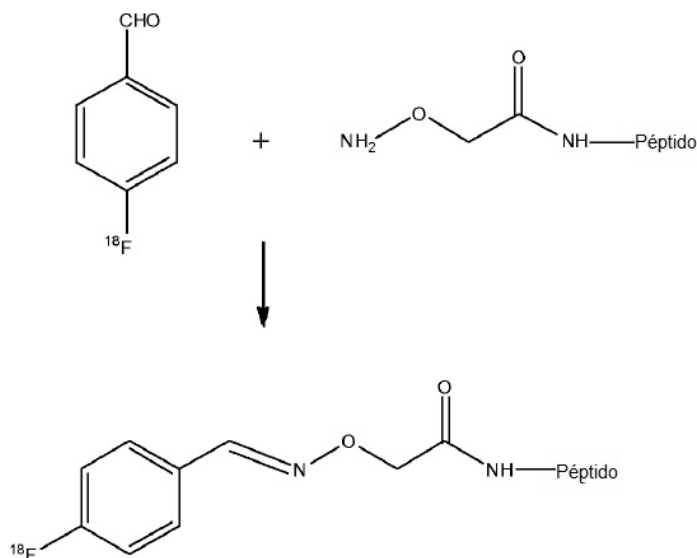
n es un número entero de 0 a 20;

5 m es un número entero de 1 a 10;

p es un número entero de 0 o 1;

Z es O u S.

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

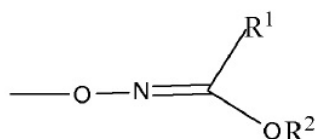


15 Schottelius et al [Bioconj. Chem., 19(6), 1256-1268 (2008)] desarrollaron más el método de Poethko et al. Schottelius et al usan un péptido funcionalizado con aminooxi en donde la amina del grupo aminooxi se protege con un grupo protector *N*-Boc (Boc = *tert*-butiloxycarbonilo). El péptido funcionalizado con aminooxi deseado se genera *in situ* en presencia de ^{18}F -fluorobenzaldehído por medio de la desprotección del grupo *N*-Boc a pH ácido (pH = 2) a 75°C. Schottelius et al usaron un exceso molar de 5 veces del precursor protegido con Boc, porque la desprotección no era cuantitativa bajo las condiciones de reacción.

20 Mezo et al [J. Pept. Sci., 17, 39-46 (2010)] describen algunos de los problemas asociados con la química de ligadura de oxima anterior de péptidos funcionalizados con aminooxi protegidos con Boc. Por consiguiente, se sabe que el reactivo Boc-aminooxi puede acilar el péptido con aminooxi protegido con Boc formado, llevando a sub-productos indeseables. Se sabe también que la reactividad del grupo aminooxi libre del péptido funcionalizado es alta hacia los

compuestos carbonilo. Consecuentemente, la condensación indeseada puede darse con cualquier aldehído o cetona adventicio presente o en la mezcla de reacción o en cualquier etapa de purificación posterior. Dichos aldehídos o cetonas podrían ser trazas de acetona presentes en los disolventes usados, o formaldehído (p.ej. de los plastificadores). Mezo et al están interesados en resolver este problema tanto para la conjugación de fármacos anticancerígenos y de [^{18}F]-fluorobenzaldehído a péptidos. Mezo et al resuelven el problema llevando a cabo la desprotección del péptido con Boc-aminoxí en presencia de un exceso molar de diez veces de ácido (aminooxi)acético (Aoa) libre como un “agente de captura de carbonilo”. El péptido con aminooxi desprotegido y el exceso de Aoa se liofiliza después y se almacena a 4°C. Inmediatamente antes de la reacción de ligado a 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 que el 4-fluorobenzaldehído no radioactivo (es decir, ^{19}F) se conjuga a un péptido de somatostatina funcionalizado con aminooxi usando esta técnica. Mezo et al no proporcionan ningún dato en ^{18}F -radiomarcaje.

El documento WO 2012/072736 describe el uso de la química de grupo protector alternativo para los grupos aminooxi de biomoléculas funcionalizadas. El grupo aminooxi protegido es de fórmula:



En donde R^1 y R^2 se eligen independientemente de alquilo C_{1-3} , fluoroalquilo C_{1-3} o arilo C_{4-6} .

El documento WO 2012/072736 enseña que se prefiere desproteger el grupo aminooxi protegido *in situ*, es decir, en presencia del aldehído radioactivo al que se va a conjugar sin aislamiento intermedio. El ejemplo 3 del documento WO 2012/072736, describe, sin embargo, la desprotección de un péptido funcionalizado con dicho grupo aminooxi protegido, y posterior liofilización directa para proporcionar un producto aislado. La composición liofilizada obtenida directamente se describió como pura. El documento WO 2012/072736 no reconoce, sin embargo, los problemas de reacciones secundarias con acetato que forman sub-productos como se enseña mediante la presente invención.

Por lo tanto hay aún una necesidad de métodos alternativos o mejorados de preparación y radiomarcaje de péptidos y otras moléculas de direccionamiento biológico.

La presente invención

La presente invención proporciona un método para preparar una composición liofilizada de una molécula de direccionamiento biológico (BTM) que tiene conjugada a ella un grupo funcional aminooxi.

El método de la invención proporciona BTMs funcionalizadas con aminooxi purificadas como composiciones liofilizadas de dichos materiales purificados, que pueden usarse posteriormente en radiomarcaje. La invención proporciona una etapa de desprotección más eficiente debido a la solubilización aumentada del precursor protegido. Cuando se da la desprotección en la fase móvil usada para la purificación cromatográfica, el proceso es más eficiente ya que no hay necesidad de aislar el derivado de aminooxi protegido purificado. Esto es particularmente importante ya que ahorra una etapa de liofilización, ya que el derivado aminooxi protegido se aísla típicamente mediante liofilización que es un proceso que consume tiempo. Además, el material liofilizado se disuelve más fácilmente cuando se usa para el radiomarcaje que es importante para el marcaje eficiente y la purificación de BTMs.

Descripción detallada de la invención

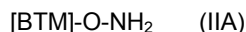
En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de una composición liofilizada de molécula de direccionamiento biológico funcionalizada con aminooxi que comprende:

(i) purificación cromatográfica en fase inversa de un compuesto protegido de la Fórmula (IA):



Usando una fase móvil, para dar el compuesto IA purificado en dicha fase móvil;

(ii) desprotección del compuesto IA purificado de la etapa (i), para dar una disolución de compuesto aminooxi de Fórmula (IIA):

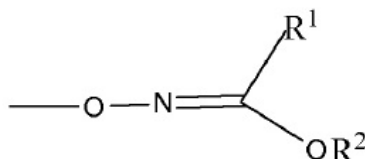


(iii) liofilización de la disolución de la etapa (ii), para dar una composición liofilizada de dicho compuesto aminooxi de Fórmula (IIA);

En donde:

[BTM] es una molécula de direccionamiento biológico;

X¹ es un grupo aminooxi protegido de fórmula:



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

- 5 Por el término “resto de direccionamiento biológico” (BTM) se entiende un compuesto que, después de la administración, se absorbe selectivamente o se localiza a un sitio particular del cuerpo del mamífero *in vivo*. Dichos sitios puede estar implicados por ejemplo en un estado de enfermedad particular o ser indicativos de cómo un órgano o proceso metabólico está funcionando.

- 10 El término “protegido” tiene su significado convencional en el campo de la química y/o radioquímica, y se refiere al uso de un grupo protector para proteger un grupo funcional de reacciones indeseadas. El término “desprotección” tiene su significado convencional en el campo de la química y/o radioquímica, es decir, la eliminación de un grupo protector. Por el término “grupo protector” o P^{GP} se entiende 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 bajo condiciones suficientemente suaves que no modifican el resto de la molécula. Después de la desprotección se obtiene el producto deseado. El uso de grupos protectores se describe en Protective Groups in Organic Synthesis, 4ª Edición, Theodor W. Greene y Peter G.M. Wuts, [Wiley Blackwell, (2006)].

El término “grupo aminooxi” tiene su significado convencional, y se refiere a un sustituyente de fórmula –O–NH₂, preferiblemente –CH₂–O–NH₂.

- 20 El término “purificación cromatográfica en fase inversa” tiene su significado convencional, y se refiere a cromatografía donde la fase estacionaria es lipófila y la fase móvil es hidrófila, que implica típicamente medio acuoso. Las técnicas cromatográficas adecuadas incluyen: HPLC, cromatografía líquida a presión media (MPLC) o extracción en fase sólida (SPE). Una técnica cromatográfica en fase inversa preferida es HPLC. Los materiales de columna de RP-HPLC adecuados están basados en sílice y por tanto deberían estar tapados en el extremo para evitar interacciones indeseadas con grupos silanol en la superficie de las partículas. El material de columna debería tener una alta cobertura de área superficial aceptando cargas preparativas moderadas a altas de la sustancia a purificar y empaquetadas fácilmente disponibles en varios formatos de columna y además disponibles en volumen para envasar en columnas preparativas mayores si se necesitan mayores cantidades. Dichas columnas HPLC preferidas incluyen: Luna C-18 (2) (10 µm, 100 Å) de Phenomenex; u otros materiales C-18 basados en sílice tal como Kromasil de Eka u ODS AQ de YMC. La columna HPLC es lo más preferiblemente una columna Luna C-18 (2) (10 µm, 100 Å).

- 30 La etapa de desprotección (ii) se realiza de forma adecuada como se conoce en la técnica [Dulery et al Tetrahedron, 63, 11952-11958 (2007); y Foillard et al [J. Org. Chem., 73, 983-991 (2008)].

Los aldehídos y las cetonas deberían también estar adecuadamente excluidas de las etapas (i)-(iii), ya que incluso en cantidades traza o en el aire en la atmósfera del laboratorio, experimentarán reacciones secundarias indeseadas con el compuesto aminooxi de la Fórmula IIA.

- 35 El término “líoilizado” tiene el significado convencional, es decir, una composición seca por congelación, preferiblemente una que se prepara de una manera estéril.

Características preferidas

- 40 La fase móvil usada en la etapa (i) es preferiblemente ácida. Una fase móvil ácida tiene la ventaja de que, cuando la BTM comprende grupos básicos tales como los grupos amino de péptidos o proteínas, estos se protonan para conseguir la separación cromatográfica adecuada.

- 45 Preferiblemente el ácido usado en la fase móvil de la etapa (i) comprende ácido trifluoroacético (TFA), y más preferiblemente comprende TFA acuoso. Una concentración de TFA adecuada en la fase móvil de la etapa (i) está en el intervalo 0,01-5%, preferiblemente 0,05-1% más preferiblemente 0,1-0,3% en v/v. El TFA tiene la ventaja de que es volátil y más fácil de eliminar que el acetato de amonio cuando se preparan las composiciones liofilizadas del segundo aspecto.

Por consiguiente, el uso de TFA acuoso como fase móvil para la etapa (i), los presentes inventores han encontrado que la desprotección del compuesto IA no se da en un grado significativo durante la cromatografía de HPLC, ya que el tiempo de contacto con la fase móvil de TFA acuoso es corto (20-40 min) y ya que el compuesto IA está unido a la fase estacionaria, y por consiguiente no accesible a la desprotección. Durante el almacenaje en disolución en la fase

móvil de TFA acuoso, sin embargo, con un tiempo de contacto de pocos minutos se da la desprotección.

Cuando la fase móvil es ácida, la desprotección se alcanza preferiblemente o manteniendo el compuesto IA purificado, separado en la fase móvil ácida durante un periodo de tiempo a una temperatura de 5 a 60°C para permitir la reacción, y/o añadiendo más ácido a dicha disolución. Por consiguiente, p.ej., el almacenaje en TFA acuoso al 0,1% a temperatura ambiente en argón toda la noche mostró aproximadamente 0,8% restante protegido (Compuesto IA). La desprotección completa y/o tiempos de reacción más cortos necesita la adición de más TFA, p.ej., 0,13-0,15% de TFA.

Por tanto, la etapa (i) del primer aspecto se realiza preferiblemente sin el aislamiento del compuesto IA purificado, de manera que se usa en la etapa (ii) como la disolución en la fase móvil de la etapa (i). Esto tiene la ventaja de eficiencia mejorada, ya que los actuales inventores han encontrado que, si se aísla (p.ej. mediante liofilización), el compuesto IA purificado tiende a mostrar baja solubilidad en el medio de desprotección, que necesita su uso como una suspensión incluso cuando se diluye. Esto a su vez lleva a mayores volúmenes de disolvente para la liofilización en la etapa (iii), que extiende significativamente el tiempo de liofilización y reduce el tamaño de lote máximo que puede procesarse cada vez. La capacidad del secador por congelación en términos de volumen máximo a procesar normalmente dicta el tamaño de lote.

En el primer aspecto, R¹ y R² son preferiblemente ambos independientemente alquilo C₁₋₂. Más preferiblemente, R¹ y R² se eligen de metilo y etilo, lo más preferiblemente R¹ es metilo y R² es etilo, es decir, un grupo protector etoxietilidina ("Eei").

La BTM puede ser de origen sintético o natural, pero es preferiblemente sintética. El término "sintético" tiene su significado convencional, es decir, hecho por el hombre al contrario que aislarse de fuentes naturales p.ej. procedente del cuerpo de mamífero. Dichos compuestos tienen la ventaja de que su fabricación y perfil de impureza puede controlarse completamente. Los anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos de origen natural están por lo tanto fuera del alcance del término "sintético" como se usa en la presente memoria. El peso molecular de la BTM es preferiblemente hasta 30.000 Daltons. Más preferiblemente, el peso molecular está en el intervalo de 200 a 20.000 Daltons, lo más preferiblemente 300 a 18.000 Daltons, prefiriéndose especialmente de 400 a 16.000 Daltons. Cuando la BTM es un no péptido, el peso molecular de la BTM es preferiblemente hasta 3.000 Daltons, más preferiblemente 200 a 2.500 Daltons, lo más preferiblemente 300 a 2.000 Daltons, prefiriéndose especialmente 400 a 1.500 Daltons.

La BTM preferiblemente comprende: un péptido de 3-100 mer, análogo peptídico, peptido o mimético peptídico que puede ser un péptido lineal o cíclico o combinación de los mismos; un aminoácido sencillo; un sustrato enzimático, antagonista enzimático agonista enzimático (que incluye agonista parcial) o inhibidor enzimático; compuesto de unión al receptor (que incluye un sustrato de receptor, antagonista, agonista o sustrato); oligonucleótidos, o fragmentos de oligo-ADN u oligo-ARN. Más preferiblemente, la BTM comprende o bien un Affibody™ o un aminoácido sencillo, un péptido 3-100 mer, un sustrato enzimático, un antagonista enzimático un agonista enzimático, un inhibidor enzimático o un compuesto de unión al receptor.

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

Por el término "aminoácido" se entiende un L- o D-aminoácido, análogo de aminoácido (p.ej. naftilalanina) o mimético de aminoácido que puede darse de forma natural o de origen puramente sintético, y puede ser ópticamente puro, es decir un único enantiómero y por tanto quiral, o una mezcla de enantiómeros. Se usan en la presente memoria abreviaturas de 3 letras o letra única convencionales para los aminoácidos. Preferiblemente los aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros. Por el término "mimético de aminoácido" se entiende análogos sintéticos de aminoácidos que se dan de forma natural que son isómeros, es decir, se han diseñado para imitar la estructura estérica y electrónica del compuesto natural. Dichos isómeros se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen aunque no están limitados a depsipéptidos, péptidos retro-inversos, tioamidas, cicloalcanos o tetrazoles 1,5-disustituidos [véase M. Goodman, *Biopolymers*, 24, 137, (1985)]. Los aminoácidos radiomarcados tales como tirosina, histidina o prolina se conocen por ser agentes de formación de imágenes *in vivo* útiles.

Las moléculas Affibody™ están basadas en el dominio de 58 residuos de aminoácido derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A de estafilococo. Los affibodies pueden usarse en forma de monómero o dímero, 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 Affibodies permitiría la mejor penetración del tejido diana y aclaramiento de la sangre en comparación con anticuerpos que son 10 a 20 veces mayores (~150 kDa). Los Affibodies también tienen la ventaja de que son estables bajo un intervalo de condiciones de pH (pH 5,5 a 11). Un Affibody preferido de la invención se dirige a HER2. Un Affibody de direccionamiento a HER2 preferido comprende Affibody 1,

como se describe a continuación.

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

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

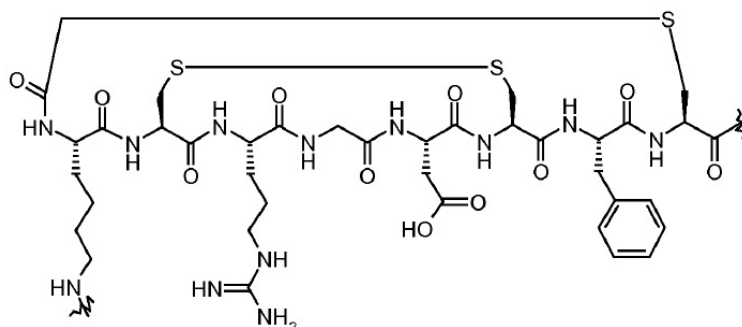
Cuando la BTM es un sustrato enzimático, antagonista enzimático, agonista enzimático o inhibidor enzimático, dichas moléculas de direccionamiento biológico preferidas de la presente invención son moléculas sintéticas pequeñas tipo fármaco, es decir, moléculas farmacéuticas. Los ligandos transportadores de dopamina preferidos tales como tropanos; ácidos grasos; ligandos de receptor D-2 de dopamina; benzamidas; anfetaminas; bencilguanidinas, iomazenil, benzofurano (IBF) o ácido hipúrico.

Cuando la BTM es un péptido, dichos péptidos preferidos incluyen Péptido A, Péptido B, Péptido C y Péptido D como se define a continuación, además de:

- Somatostatina, octreotida y análogos,
- Péptidos que se unen al receptor ST, donde ST se refiere a la toxina estable al calor producida por *E. coli* y otros micro-organismos;
- Bombesina;
- Péptido intestinal vasoactivo;
- Neurotensina;
- Fragmentos de laminina p.ej., YIGSR, PDSGR, IKVAV, LRE y KCQAGTFALRGDPQG,
- Péptidos N-formil-quimiotácticos para dirigirse a sitios de acumulación de leucocitos,
- Factor plaquetario 4 (PF4) y fragmentos del mismo,
- Fragmentos peptídicos de α_2 -antiplasmina, fibronectina o beta-caseína, fibrinógeno o trombospondina. Las secuencias de aminoácido de α_2 -antiplasmina, fibronectina, beta-caseína, fibrinógeno y trombospondina pueden encontrarse en las siguientes referencias: precursor de α_2 -antiplasmina [M. Tone et al., J. Biochem, 102, 1033, (1987)]; beta-caseína [L. Hansson et al., Gene, 139, 193, (1994)]; fibronectina [A. Gutman et al, FEBS Lett., 207, 145, (1996)]; precursor de trombospondina-1 [V. Dixit et al, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 83, 5449, (1986)]; R. F. Doolittle, Ann. Rev. Biochem., 53, 195, (1984);
- Péptidos que son sustratos o inhibidores de angiotensina, tal 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 del Péptido A, Péptido B, Péptido C y Péptido D como se define anteriormente:

- (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 aminoácido:

-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-

En 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 tales como residuos a y b además de c y d se ciclan para formar dos enlaces disulfuro separados;

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

Cys^a-Xaa-Gln-Ser^b-Cys^c-Ser^d-Phe-Gly-Pro-Phe-Thr^c-Phe-Val-Cys^b-(HO-Asp)-Gly-Asn-Thr^a-Lys^d

En donde Xaa es Arg o Lys;

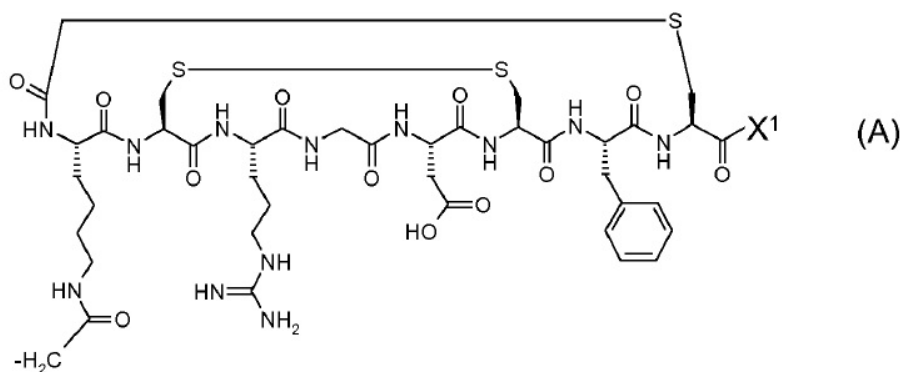
Cys^a-Thr^a, Ser^b-Cys^b y Cys^c-Thr^c se unen de forma covalente por medio de enlaces tioéter;

Ser^d-Lys^d se unen de forma covalente por medio de un enlace lisinoalanina;

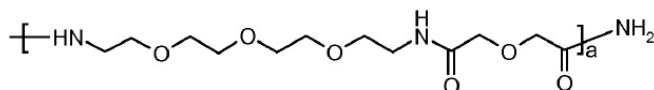
HO-Asp es ácido β-hidroxiaspártico.

Los péptidos BTM especialmente preferidos son Péptido B, Péptido C y Péptido D.

Un péptido Péptido B más preferido es de fórmula (A):



En donde X¹ es o -NH₂ o



En donde a es un número entero de 1 a 10.

En la Fórmula A, a es preferiblemente 1.

Un péptido cíclico de unión 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-Gly-Lys.

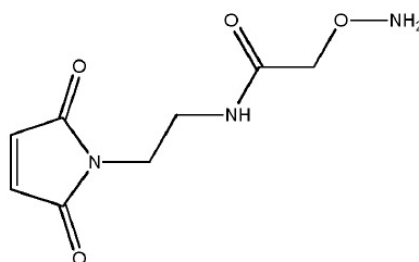
Cuando la BTM es un péptido, uno o ambos extremos del péptido, preferiblemente ambos, han conjugado a ellos un grupo que inhibe el metabolismo (M^{IG}). Tener ambos extremos peptídicos protegidos de esta forma es importante para las aplicaciones de formación de imágenes *in vivo*, ya que de otra forma se esperaría rápido metabolismo con pérdida consiguiente de afinidad de unión selectiva para el péptido BTM. Por el término "grupo de inhibición del metabolismo" (M^{IG}) se entiende un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo enzimático, especialmente peptidasa tal como carboxipeptidasa, del péptido BTM al extremo amino o al extremo carboxi. Dichos grupos son particularmente importantes para aplicaciones *in vivo*, y se conocen bien por los expertos en la técnica y se eligen de forma adecuada a partir de, para el extremo amino peptídico:

Grupos N-acilados -NH(C=O)R^G donde el grupo acilo -(C=O)R^G tiene R^G elegido de: grupos alquilo C₁₋₆, arilo C₃₋₁₀ o comprende un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG). Dichos grupos M^{IG} del extremo amino preferidos son acetilo, benciloxicarbonilo o trifluoroacetilo, lo más preferiblemente acetilo.

Los grupos inhibidores del metabolismo adecuados para el extremo carboxilo peptídico incluyen: carboxamida, éster de *terc*-butilo, éster bencílico, éster de ciclohexilo, aminoalcohol o un bloque de construcción de polietilenglicol (PEG). Un grupo M^{IG} adecuado para el residuo de aminoácido terminal carboxi del péptido BTM está donde la amina terminal

del residuo de aminoácido está N-alquilado con un grupo alquilo C₁₋₄, preferiblemente un grupo metilo. Dichos grupos M^{IG} preferidos son carboxiamida o PEG, lo más preferido dichos grupos son carboxamida.

En la Fórmula IA, el grupo X¹ se une de forma adecuada a un grupo funcional de la BTM como se describe a continuación. Por consiguiente, el N-hidroxisuccinimidéster de ácido N-(1-etoxietiliden)-2-aminoxiacético (Eei-AOAc-OSu) está disponible comercialmente de Iris Biotech GmbH (Waldershofer Str. 49-51, 95615 Marktredwitz, Alemania). Ese éster activo de aminooxi protegido con Eei puede conjugarse directamente a una BTM que contiene amina (p.ej. que tiene un residuo Lys), para dar un compuesto protegido de Fórmula IA. La maleimida funcionalizada con aminooxi Mal-AO se ha descrito por Padilla de Jesús et al. [US 7.902.332 y Mol. Imaging Biol., 10, 177-181 (2008)]:



Mal-AO

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

Más rutas a péptidos protegidos con Eei se describen por Dulery et al [Tetrahedron, 63, 11952-11958 (2007)] y Foillard et al [J. Org. Chem., 73, 983-991 (2008)]. Dulery y Foillard también describen condiciones adecuadas para la desprotección del grupo protector Eei.

El método del primer aspecto de la presente invención proporciona una composición liofilizada que comprende el compuesto aminooxi liofilizado de Fórmula IIA como se define en la etapa (iii) del primer aspecto.

La composición liofilizada excluye preferiblemente TFA residual, ya que el TFA residual puede reducir la estabilidad de algunos compuestos aminooxi de Fórmula IIA.

- 20 La composición liofilizada es importante porque, para la reacción adicional, en particular para el radiomarcage como se describe en el segundo aspecto, se necesita una forma mucho más concentrada. La composición liofilizada puede obtenerse también estéril – que es importante cuando las composiciones radiofarmacéuticas se van a preparar a partir de ellas. Esto se describe en el segundo aspecto (posterior). La composición liofilizada puede usarse ventajosamente en sintetizadores automatizados y casetes asociados, como se describe a continuación.

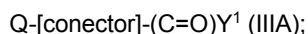
- 25 La composición liofilizada puede contener opcionalmente uno o más excipientes adicionales elegidos de: una carga para facilitar la liofilización o un solubilizador.

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

- 30 Por el término “solubilizador” se entiende un aditivo presente en la composición que aumenta la solubilidad del agente en el disolvente de reconstitución. Un disolvente dicho preferido es medio acuoso, y por tanto el solubilizador mejora preferiblemente la solubilidad en agua. Dichos solubilizadores adecuados incluyen: alcoholes C₁₋₄; glicerina; polietilenglicol (PEG); propilenglicol; monooleato de polioxietilensorbitano; monooleato de sorbitano; polisorbatos; copolímeros en bloque 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.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de radiomarcage de una molécula de direccionamiento biológico con ¹⁸F, que comprende:

- (a) Realizar el método del primer aspecto para dar una composición liofilizada que comprende el compuesto aminooxi liofilizado de Fórmula IIA como se define en la etapa (iii) del primer aspecto;
- 40 (b) Condensación de dicha composición liofilizada de la etapa (a) con un compuesto carbonilo de Fórmula IIIA en un disolvente adecuado:



Para dar un conjugado radiomarcado de Fórmula (IVA):



Donde:

Q es un grupo que comprende el radioisótopo ^{18}F ;

[BTM] es la molécula de direccionamiento biológico como se define en el primer aspecto;

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

[conector] es un grupo conector.

Las realizaciones preferidas del compuesto aminooxi de Fórmula IIA, BTM, Y^1 y [conector] en el segundo aspecto son como se describen en el primer aspecto (anteriormente). El término "grupo que comprende un radioisótopo" significa que o un grupo funcional comprende el radioisótopo, o el radioisótopo está unido como una especie adicional. Cuando un grupo funcional comprende el radioisótopo, esto significa que la estructura química ya contiene el elemento químico en cuestión, y el isótopo radioactivo de ese elemento presente a un nivel significativamente por encima del nivel de abundancia natural de dicho isótopo. Dichos 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 o al menos 50 veces el nivel de abundancia natural del isótopo en cuestión, o presente a un nivel donde el nivel de enriquecimiento del isótopo en cuestión es 90 a 100%. Los ejemplos de dichos grupos funcionales incluyen grupos fluoroalquilo con niveles elevados de ^{18}F , de manera que el átomo ^{18}F está dentro de la estructura química.

Por el término "grupo conector" se entiende un grupo bivalente de fórmula $-(\text{A})_m-$ en donde cada A es independientemente $-\text{CR}_2-$, $\text{CR}=\text{CR}-$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{CR}_2\text{CO}_2-$, $-\text{CO}_2\text{CR}_2-$, $-\text{NRCO}-$, $-\text{CONR}-$, $-\text{NR}(\text{C}=\text{O})\text{NR}-$, $-\text{NR}(\text{C}=\text{S})\text{NR}-$, $-\text{SO}_2\text{NR}-$, $-\text{NRSO}_2-$, $-\text{CR}_2\text{OCR}_2-$, $-\text{CR}_2\text{SCR}_2-$, $-\text{CR}_2\text{NRCR}_2-$, 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 donde 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} ; y m es un número entero de valor 1 a 20.

En el segundo aspecto, Y^1 es preferiblemente H es decir el compuesto carbonilo de Fórmula IIIA es un aldehído. Un compuesto carbonilo preferido de Fórmula IIIA es ^{18}F -4-fluorobenzaldehído.

La etapa de condensación (b) del segundo aspecto se realiza preferiblemente en presencia de anilina o una sal de la misma (p.ej. hidrocloreto de anilina). El uso de anilina en ligaduras oxima se ha mostrado que es efectivo en el aumento de la velocidad de reacción total y permite que dichas reacciones se den a valores de pH menos ácidos [Dirksen, et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 45, 7581-7584 (2006)]. Después de la etapa (b) del método del segundo aspecto, el producto conjugado de Fórmula IVA puede separarse preferiblemente y/o purificarse usando técnicas estándar tales como cromatografía.

El método de preparación del segundo aspecto se realiza preferiblemente de manera que la molécula de direccionamiento biológico marcada con ^{18}F se obtiene como una composición radiofarmacéutica que comprende dicha molécula de direccionamiento biológico marcada con ^{18}F , junto con un vehículo biocompatible en una forma adecuada para la administración al mamífero. El ^{18}F tiene la ventaja de que es adecuado para la formación de imágenes por Tomografía de emisión de positrones (PET).

Por la frase "en una forma adecuada para la administración al mamífero" se entiende una composición que es estéril, libre de pirógenos, carece de compuestos que producen efectos tóxicos o adversos, y se formula a un pH biocompatible (aproximadamente pH 4,0 a 10,5). Dichas composiciones carecen de partículas que podrían generar riesgo provocando embolia *in vivo*, y se formulan de manera que la precipitación no se de en contacto con fluidos biológicos (p.ej. sangre). Dichas composiciones también contienen solo excipientes biológicamente compatibles, y son preferiblemente isotónicos.

El "vehículo biocompatible" es un fluido, especialmente un líquido, en que el radioconjugado puede suspenderse o preferiblemente disolverse, de manera que la composición sea fisiológicamente tolerable, es decir, puede administrarse al cuerpo del mamífero sin toxicidad o malestar indebido. El vehículo biocompatible es adecuadamente un líquido de transporte inyectable tal como agua estéril, libre de pirógenos, para la inyección; una disolución acuosa tal como solución salina (que puede equilibrarse de forma ventajosa de manera que el producto final para la inyección sea isotónica); una disolución tampón acuosa que comprende un agente de tamponamiento biocompatible (p.ej. tampón fosfato); una disolución acuosa de una o más sustancias de ajuste de 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, propilenglicoles y similares). Preferiblemente el vehículo biocompatible es agua libre de pirógeno para la inyección, solución salina isotónica o tampón fosfato.

El conjugado radiomarcado y el vehículo biocompatible se suministran en un vial o recipiente adecuado que comprende un contenedor sellado que permite el mantenimiento de la integridad estéril y/o seguridad radioactiva, más opcionalmente un gas del espacio de cabeza inerte (p.ej. nitrógeno o argón), mientras permite la adición y retirada de disoluciones mediante una jeringa o cánula. Un contenedor tal preferido es un vial sellado con un septo, en donde el

cierre hermético se corruga con un sello (típicamente de aluminio). El cierre es adecuado para una o múltiples punciones con una aguja hipodérmica (p.ej. un cierre de sello de septo corrugado) mientras se mantiene la integridad estéril. Dichos contenedores tienen la ventaja adicional de que el cierre puede aguantar el vacío si se desea (p.ej. para cambiar el gas del espacio de cabeza o desgasificar disoluciones), y puede aguantar los cambios de presión tal como reducciones en la presión sin permitir el ingreso de gases atmosféricos externos, tal como oxígeno o vapor de agua.

Los contenedores de dosis múltiple preferidos comprenden un único vial volumétrico (p.ej. de 10 a 50 cm³ de volumen) que contiene múltiples dosis de paciente, por el cual dosis de paciente individuales puede por consiguiente sacarse en jeringa de grado clínico en diversos intervalos de tiempo durante el tiempo de vida viable de la preparación para adaptarse a la situación clínica. Las jeringas pre-llenas se diseñan para contener una única dosis humana, o “dosis unitaria” y por lo tanto son preferiblemente una jeringa desechable u otra jeringa adecuada para uso clínico.

La composición radiofarmacéutica puede contener excipientes opcionales adicionales tales como: un conservante antimicrobiano, agente de ajuste de pH, carga, radioprotector, solubilizante o agente de ajuste de la osmolalidad. Los términos “carga” y “solubilizante” son como se definen en el segundo aspecto (anterior). Por el término “radioprotector” se entiende un compuesto que inhibe las reacciones de degradación, tal 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 de forma adecuada a partir de: ácido ascórbico, ácido *para*-aminobenzoico (es decir, ácido 4-aminobenzoico), ácido genticónico (es decir, ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y sales de los mismos con un catión biocompatible. Por el término “catión biocompatible” (B^c) se entiende un contraión cargado de forma positiva que forma una sal con un grupo cargado de forma negativa, ionizado, donde dicho contraión cargado de forma positiva es además no tóxico y por tanto adecuado para la administración al cuerpo del mamífero, especialmente al cuerpo humano. Ejemplos de cationes biocompatibles adecuados incluyen: los metales alcalinos sodio o potasio; los metales alcalinotérreos calcio y magnesio; y el ion amonio. Los cationes biocompatibles preferidos son sodio y potasio, lo más preferiblemente sodio.

Por el término “conservante antimicrobiano” se entiende un agente que inhibe el crecimiento de micro-organismos potencialmente dañinos tales como bacterias, levaduras o mohos. El conservante antimicrobiano puede mostrar además 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 micro-organismos en la composición farmacéutica. El conservante antimicrobiano puede, sin embargo, usarse también opcionalmente para inhibir el crecimiento de micro-organismos 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 metil, etil, propil o butil-parabeno o mezclas de los mismos; alcohol bencílico; fenol; cresol; cetrímida y tiomersal. El (los) conservante(s) antimicrobiano(s) preferido(s) son los parabenos.

El término “agente de ajuste de 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 la administración de humanos o mamíferos. Dichos agentes de ajuste de pH adecuados incluyen tampones farmacéuticamente aceptables, tal como tricina, fosfato o TRIS [es decir, tris(hidroximetil)aminometano], y bases farmacéuticamente aceptables tal como carbonato sódico, bicarbonato sódico 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 contenedor separado, de manera que el usuario del kit pueda ajustar el pH como parte de un procedimiento multi-etapa.

Para obtener composiciones radiofarmacéuticas, el método del segundo aspecto puede realizarse de varias formas:

- a) Técnicas de fabricación asépticas en que las etapas se llevan a cabo en un ambiente de sala blanca;
- b) Esterilización terminal, en que las etapas (i)-(iii) del primer aspecto se llevan a cabo sin usar la fabricación aséptica, y después se esteriliza como la última etapa [p.ej. por irradiación gamma, calor seco en autoclave o tratamiento químico (p.ej. con óxido de etileno)];
- c) Metodología de kit en que una formulación de kit no radioactiva, estéril, que comprende la composición liofilizada que comprende el compuesto aminooxi de Fórmula IIA como se define en la etapa (iii) del primer aspecto, junto con excipientes opcionales se hace reaccionar con el compuesto radioactivo de Fórmula IIIA;
- d) Técnicas de fabricación asépticas en que las etapas se llevan a cabo usando un aparato sintetizador automatizado.

El método (d) se prefiere. Por consiguiente, el método del segundo aspecto se realiza preferiblemente usando un aparato sintetizador automatizado. Dichos sintetizadores automatizados se describen a continuación.

El compuesto carbonilo de Fórmula IIIA puede obtenerse como sigue. El aldehído ¹⁸F-fluorado puede ser ¹⁸F-fluorobenzaldehído o *p*-(di-*terc*-butil-¹⁸F-fluorosilil)benzaldehído (¹⁸F-SiFA-A). Los aldehídos alifáticos marcados con ¹⁸F de fórmula ¹⁸F(CH₂)₂O[CH₂CH₂O]_qCH₂CHO, donde q es 3, pueden obtenerse por el método de Glaser et al [Bioconj. Chem., 19(4), 951-957 (2008)]. El ¹⁸F-fluorobenzaldehído puede obtenerse por el método de Glaser et al [J. Lab. Comp. Radiopharm., 52, 327-330 (2009)]. El precursor de ¹⁸F-fluorobenzaldehído, es decir Me₃N⁺-C₆H₄-CHO. CF₃SO₃⁻, puede obtenerse por el método de Haka et al [J. Lab. Comp. Radiopharm., 27, 823-833 (1989)].

El compuesto carbonilo de Fórmula IIIA puede generarse opcionalmente *in situ* mediante desprotección de un derivado

protegido adecuado. El uso de grupos protectores carbonilo se describe en Protective Groups in Organic Synthesis, 4ª Edición, Theodor W. Greene y Peter G. M. Wuts, [Wiley Blackwell, (2006)].

El método de la presente invención puede realizarse en un aparato sintetizador automatizado.

Por el término "sintetizador automatizado" se entiende un módulo automatizado basado en el principio de operaciones unitarias como se describe en 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. Dichos sintetizadores automatizados se prefieren para el método de la presente invención especialmente cuando se desea una composición radiofarmacéutica. Están disponibles comercialmente a partir de una serie de suministradores [Satyamurthy et al, anterior], que incluyen: GE Healthcare; CTI Inc; Ion Beam Applications S.A. (Chemin du Cyclotron 3, B-1348 Louvain-La-Neuve, Bélgica); Raytest (Alemania) y Bioscan (EE.UU.).

Los sintetizadores automatizados comerciales también proporcionan contenedores adecuados para los residuos radioactivos líquidos generados como resultado de la preparación radiofarmacéutica. Los sintetizadores automatizados no se proporcionan típicamente con protección para la radiación, ya que están diseñados para emplearse en una célula de trabajo radioactiva configurada de forma adecuada. La célula de trabajo radioactiva proporciona protección a la radiación adecuada para proteger al operador de dosis de radiación potencial, además de ventilación para eliminar vapores químicos y/o radioactivos. El sintetizador automatizado comprende preferiblemente un casete.

Por el término "casete" se entiende una pieza unitaria de aparato diseñada de manera que la unidad completa se ajusta de forma separable e intercambiable en un aparato sintetizador automatizado (como se define anteriormente), de una forma que el movimiento mecánico de partes móviles del sintetizador controla la operación del casete desde fuera del casete, es decir, externamente. Los casetes adecuados comprenden una serie lineal de válvulas, cada una unida a un puerto donde los reactivos o viales pueden estar unidos, mediante o punción de aguja de un vial sellado por un septo invertido, o mediante juntas de unión, herméticas. Cada válvula tiene una junta macho-hembra que interactúa con un brazo móvil correspondiente del sintetizador automatizado. La rotación externa del brazo controla por consiguiente la apertura o cierre de la válvula cuando el casete está unido al sintetizador automatizado. Las partes móviles adicionales del sintetizador automatizado se diseñan para sujetarse en las puntas del émbolo de la jeringa, y por consiguiente subir o presionar el cilindro de la jeringa.

El casete es versátil, teniendo típicamente varias posiciones donde los reactivos pueden unirse, y varios adecuados para la unión de viales de jeringa de reactivos o cartuchos de cromatografía (p.ej. extracción en fase sólida o SPE). El casete siempre comprende un recipiente de reacción. Dichos recipientes de reacción son preferiblemente de 1 a 10 cm³, lo más preferiblemente de 2 a 5 cm³ en volumen y se configuran de manera que 3 o más puertos del casete se conectan al mismo, para permitir la transferencia de reactivos o disolventes desde varios puertos en el casete. Preferiblemente el casete tiene 15 a 40 válvulas en una disposición lineal, lo más preferiblemente 20 a 30 prefiriéndose especialmente 25. Las válvulas del casete son preferiblemente cada una idéntica, y lo más preferiblemente son válvulas de 3 vías. Los casetes se diseñan para ser adecuados para la fabricación radiofarmacéutica y se fabrican por lo tanto a partir de materiales que son de grado farmacéutico e idealmente también son resistentes a radiolisis.

Los sintetizadores automatizados preferidos de la presente invención comprenden un casete desechable o de uso único que comprende todos los reactivos, recipientes de reacción y aparato necesarios para llevar a cabo la preparación de un lote dado de compuesto radiofarmacéutico radiofluorado. El casete significa que el sintetizador automatizado tiene la flexibilidad para ser capaz de hacer una variedad de diferentes compuestos radiofarmacéuticos con mínimo riesgo de contaminación cruzada, cambiando simplemente el casete. El enfoque de casete también tiene las ventajas de: configuración simplificada por tanto riesgo reducido de error del operador; cumplimiento de GMP (Buena práctica de fabricación) mejorado; capacidad multi-trazadora; cambio rápido entre las líneas de producción; comprobación diagnóstica automatizada anterior al proceso del casete y los reactivos; comprobación cruzada automatizada del código de barras de los reactivos químicos frente a la síntesis a realizar; trazabilidad del reactivo; uso único y por tanto sin riesgo de contaminación cruzada, manipulación y resistencia al abuso.

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

Las realizaciones preferidas del compuesto de aminooxi purificado de Fórmula IIA y el método de purificación en el tercer aspecto son como se describen en el primer aspecto (anterior). Las realizaciones preferidas del método de radiomarcado en el quinto aspecto son como se describen en el segundo aspecto (anterior).

La invención se ilustra mediante los ejemplos no limitantes detallados a continuación:

El ejemplo 1 proporciona la síntesis de un péptido de direccionamiento a c-Met de la invención ("Péptido 1").

El ejemplo 2 proporciona la síntesis de un péptido 1 funcionalizado con aminooxi ("Compuesto 2"), en donde el grupo funcional aminooxi está protegido con un grupo protector (Eei).

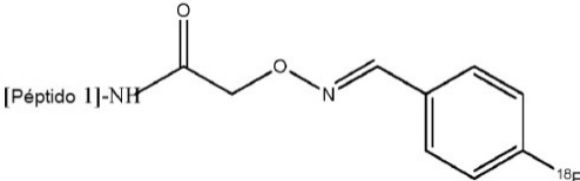
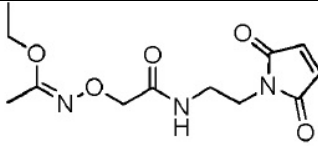
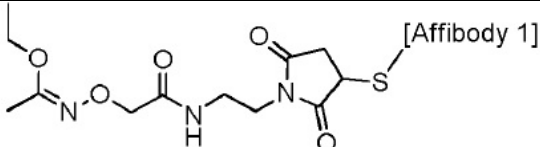
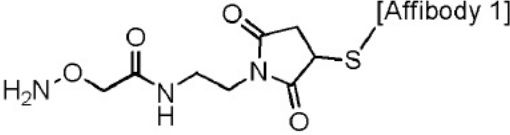
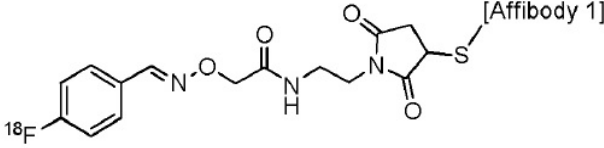
El ejemplo 3 proporciona la síntesis de un conector de aminooxi maleimida bifuncional (Compuesto 4).

El ejemplo 4 proporciona la síntesis, purificación y liofilización de un Affibody funcionalizado con aminooxi (Compuesto 6), por medio de la reacción de un Affibody con el compuesto 4.

5 El ejemplo 5 proporciona el marcaje con ^{18}F del compuesto 6, que muestra que el método de la presente invención proporciona precursores de radiomarcaje viables.

10 El ejemplo 6 muestra que el método de la presente invención (Método 2) proporciona el compuesto 2 de pureza mejorada en comparación con cuando se usó el método previo (Método 1). El método 2 también proporcionó material liofilizado que era más fácilmente soluble en los disolventes para el radiomarcaje. El impacto del último fue que el tiempo de purificación para el compuesto 3 se redujo en 31% (1287 segundos frente a 885 segundos usando un aparato radiosintetizador FastLabTM). El RCP del compuesto 3 obtenido cuando el precursor preparado por el método 2 era tan bueno como por el método 1, y las impurezas peptídicas no radioactivas (contenido peptídico total) en el compuesto 3 se disminuyeron en 26%.

Compuestos de la invención

Nombre	Estructura
Péptido 1	Puentes disulfuro a 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-Lys-NH ₂ o Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK-NH ₂
Compuesto 1	[Péptido 1]-NH(CO)-(CH ₂)-O-N=C(CH ₃)(OCH ₂ CH ₃)
Compuesto 2	[Péptido 1]-NH(CO)-(CH ₂)-O-NH ₂
Compuesto 3	
Compuesto 4	
Affibody 1	AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSELLSEAKKLNDQAPKVDC
Compuesto 5	
Compuesto 6	
Compuesto 7	

Donde:

Los compuestos 1, 2 y 3 están funcionalizados en el grupo amina épsilon de la Lys carboxi terminal del péptido 1;

El Affibody 1 es selectivo para HER2;

El átomo S de los compuestos 5, 6 y 7 es del residuo Cys terminal del Affibody 1.

5 Abreviaturas

Se usan abreviaturas de aminoácido de letra única o 3 letras convencionales.

Ac: acetilo

Acm: acetamidometilo

ACN: acetonitrilo

10 AcOH: ácido acético

Boc: *tert*-butiloxycarbonilo

tBu: butilo terciario

DCM: diclorometano

DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina

15 DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

Eei: etoxietilidina;

Eei-AOAc-OSu: *N*-hidroxisuccinimidiléster de ácido *N*-(1-etoxietiliden)-2-aminooxiacético;

Fmoc: 9-fluorenilmetoxycarbonilo;

20 HBTU: hexafluorofosfato de *O*-benzotriazol-1-il-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio;

HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento;

PM: peso molecular

NHS: *N*-hidroxi-succinimida;

NMM: *N*-metilmorfolina;

25 NMP: 1-metil-2-pirrolidinona;

Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo;

RP-HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa

SPE: extracción en fase sólida;

tBu: *tert*-butilo;

30 TFA: ácido trifluoroacético;

THF: tetrahidrofurano;

TIS: triisopropilsilano;

Trt: tritilo.

Ejemplo 1: Síntesis del péptido 1

35 Etapa (a): Síntesis de péptido lineal precursor protegido

El péptido lineal precursor tiene la estructura:

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

Gly-Gly-Lys-NH₂

La resina peptídica 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-Lys(Boc)-polímero se montó en un sintetizador peptídico 433A de Applied Biosystems usando química Fmoc comenzando con 0,1 mmol de resina Rink Amide Novagel. Se aplicó un exceso de 1 mmol de aminoácidos pre-activados (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 disolución de anhídrido acético (1 mmol) y NMM (1 mmol) disueltos en DCM (5 mL) durante 60 min. La disolución de anhídrido se eliminó por filtración y la resina se lavó con DCM y se secó en una corriente de nitrógeno.

La eliminación simultánea de los grupos protectores de cadenas laterales 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 min. La resina se eliminó por filtración, el TFA se eliminó *al vacío* y se añadió dietiléter al residuo. El precipitado formado se lavó con dietiléter y se secó al aire proporcionando 264 mg de péptido en bruto.

La purificación mediante HPLC preparativo (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 en bruto proporcionó 100 mg de precursor lineal de péptido 1 puro. El producto puro se analizó por HPLC analítico (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 de producto: 6,54 min). La caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas por electropulverización (MH₂²⁺ calculado: 1464,6, MH₂²⁺ encontrado: 1465,1).

Etapa (b): Formación de 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-NH₂.

El precursor lineal de la etapa (a) (100 mg) se disolvió en 5% de DMSO/agua (200 mL) y la disolución se ajustó a pH 6 usando amoníaco. La mezcla de reacción se agitó durante 5 días. La disolución se ajustó entonces 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 HPLC preparativa para la purificación del producto.

La purificación por HPLC preparativa (gradiente: 0% de B durante 10 min, después 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 de producto: 44 min) del residuo proporcionó 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 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 de producto: 5,37 min (P1); 5,61 min (P2); 6,05 min (P3)). La caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas por electropulverización (MH₂²⁺ calculado: 1463,6, MH₂²⁺ encontrado: 1464,1 (P1); 1464,4 (P2); 1464,3 (P3)).

Etapa (c): Formación de un segundo puente disulfuro Cys6-14 (péptido 1)

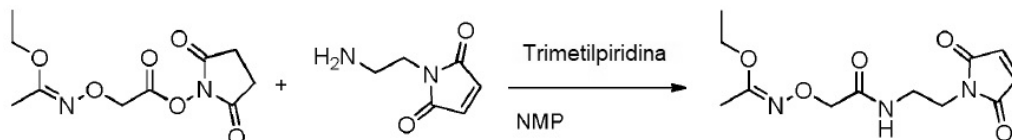
El precursor monocíclico de la etapa (b) (72 mg) se disolvió en 75% de AcOH/agua (72 mL) bajo una manta de nitrógeno. Se añadieron HCl 1M (7,2 mL) e I₂ 0,05 M en AcOH (4,8 mL) en ese orden y la mezcla se agitó durante 45 min. Se añadió ácido ascórbico 1 M (1 mL) dando una mezcla incolora. La mayoría de los disolventes se evaporaron *al vacío* y el residuo (18 mL) se diluyó con agua/0,1% de TFA (4 mL) y el producto se purificó usando HPLC preparativa. La purificación por HPLC preparativa (gradiente: 0% de B durante 10 min, después 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 de producto: 43-53 min) del residuo proporcionó 52 mg de péptido 1 puro. El producto puro se analizó por 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 de producto: 6,54 min). La caracterización de producto adicional se realizó usando espectrometría de masas por electropulverización (MH₂²⁺ calculado: 1391,5, MH₂²⁺ encontrado: 1392,5).

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

Se disolvieron péptido 1 (0,797 g) y Eei-AOAc-OSu (IRIS Biotech; 127 mg) en DMF (12 mL). Se añadió DIPEA (100 μ L) y la mezcla de reacción se agitó durante 26 min. Una segunda alícuota de DIPEA (80 μ L) se añadió y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó entonces 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 durante 40 min. Las fracciones que contienen productos puros (estos son una mezcla de compuesto 1 y compuesto 2) se acumularon en un matraz y el matraz se lavó con una descarga de argón. La disolución se agitó toda la noche para proporcionar la eliminación completa de los grupos de protección Eei. El producto desprotegido se liofilizó proporcionando 550 mg (69% de rendimiento) de compuesto 2.

El producto puro se analizó por LC-MS analítica (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 de producto: 3,00 min), MH₂²⁺ calculado: 1428,1, MH₂²⁺ encontrado: 1427,9).

Ejemplo 3: Síntesis de conector bifuncional (Compuesto 4).



Compuesto 4

5

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 μ L), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 70 min. La reacción se desactivó por dilución con 0,1% de ácido acético (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 μ m, 100 Å, 20 x 250 mm de Phenomenex
Eluyente A	0,1% en 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 el gradiente de elución

10

El compuesto 4 purificado se secó por congelación. Rendimiento 43 mg (75%), pureza: >97% en área.

El producto puro se analizó por 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 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 1,93 min), MH⁺ calculado: 284,1, MH⁺ encontrado: 284,1).

15 Ejemplo 4: Síntesis, purificación y liofilización del compuesto 6.

Etapla (a): Síntesis del compuesto 5

Se disolvieron Affibody 1 (Affibody AB; 1,00 g) y compuesto 4 (81 mg) en 30% de acetonitrilo acuoso. Se añadió acetato de amonio para ajustar el pH a 6. La mezcla se agitó entonces a temperatura ambiente durante 34 min, en cuyo momento la reacción se completó (monitoreización por LC-MS).

20 Etapa (b): Purificación del compuesto 5

La mezcla de reacción de la etapa (a) se diluyó con agua (20 mL). La mezcla diluida se purificó por HPLC preparativa como sigue:

Parámetro	Condiciones
Detección	UV a 214 nm y 254 nm
Columna	Luna C-18 (2), μ m, 100 Å, 50 x 250 mm Axia empaquetada de Phenomenex
Eluyente A	0,1% (volumen) de TFA en agua, 1 ml/l
Eluyente B	Acetonitrilo (Lichrosolv)
Equilibrado	15-20 min a 50 ml/min (no una parte del método de gradiente)
Gradiente	15-35% de B durante 50 min, 35-95% de B durante 2 min y 95% de B (lavado isocrático durante 8-15 min)
Caudal	50 ml/min durante gradiente de elución

El compuesto 5 se eluyó aplicando el gradiente deseado y mostró un tiempo de retención de alrededor de 35 minutos.

Etapa (c): Desprotección del compuesto 5 para dar compuesto 6

- 5 Las fracciones purificadas (alrededor de 0,5 L) de la etapa (b) se combinaron. Estas son una mezcla de compuesto 5 y compuesto 6. Se añadió TFA (5 mL), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en argón, monitorizando por HPLC. La desprotección se completó en 105 minutos.

Etapa (d): Liofilización del compuesto 6 purificado

- 10 La disolución de compuesto 6 desprotegido de la etapa (c) se congeló después mientras se lavaba el matraz con una descarga de una corriente suave de argón. La disolución de compuesto 6 congelado se secó por congelación después. Rendimiento: 1,01 g (98%), pureza: 89% de área de HPLC. El producto puro se analizó por HPLC 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 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm; detección: UV 214 nm, tiempo de retención de producto: 3,13 min) y por MS (MH₈⁺ calculado: 906,2, MH₈⁺ encontrado: 906,3).

Ejemplo 5: Radiosíntesis de compuesto 7

- 15 Etapa (a): Síntesis de [¹⁸F]-fluorobenzaldehído (¹⁸F-FBA).

- 20 El [¹⁸F]-fluoruro se produjo usando un ciclotrón GEMS PETtrace con una diana de plata por medio de la reacción nuclear [¹⁸O](p,n) [¹⁸F]. Se usaron volúmenes diana totales de 1,5 – 3,5 mL. El radiofluoruro se atrapó en un cartucho Water QMA (pre-acondicionado con carbonato), y el fluoruro se eluyó con una disolución de Kryptofix_{2.2.2} (4 mg, 10,7 μ M) y carbonato de potasio (0,56 mg, 4,1 μ M) en agua (80 μ L) y acetonitrilo (320 μ L). Se usó nitrógeno para sacar la disolución del cartucho QMA al recipiente de reacción. El [¹⁸F]-fluoruro se secó durante 9 minutos a 120°C bajo una corriente estacionaria de nitrógeno y vacío. Se añadió triflato de benzaldehído de trimetilamonio, [Haka et al, J. Lab. Comp. Radiopharm., 27, 823-833 (1989)] (3,3 mg, 10,5 μ M), en DMSO (1,1 mL) al [¹⁸F]-fluoruro seco, y la mezcla se calentó a 105°C durante 7 minutos para producir 4-[¹⁸F]-fluorobenzaldehído.

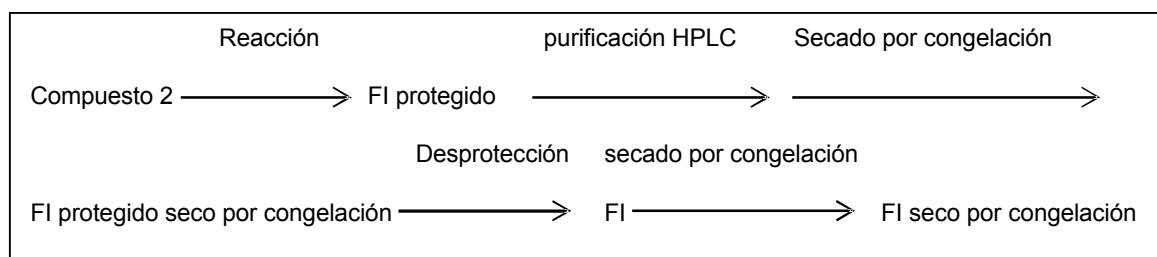
Etapa (b): Conjugación de ¹⁸F-FBA al compuesto 6

- 25 El compuesto 6 liofilizado del ejemplo 4(d) se radiomarcó con ¹⁸F usando ¹⁸F-FBA de la etapa (a) y un aparato radiosintetizador FastLab™ (GE Healthcare Ltd), dando el compuesto 7 en un rendimiento de 25% y RCP de 95%.

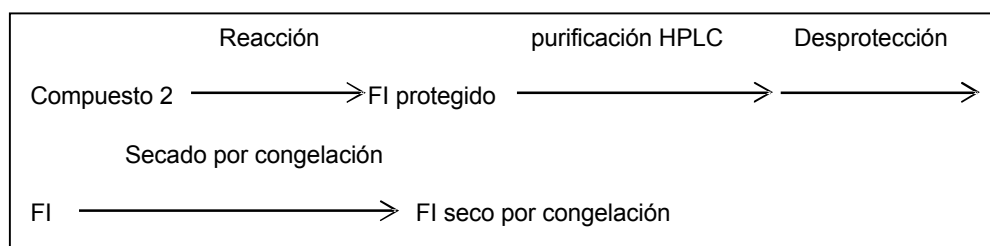
Ejemplo 6: Síntesis, liofilización y radiofluoración del compuesto 2 para dar compuesto 3 – Comparación del método actual con métodos anteriores.

- 30 Una composición liofilizada del compuesto 2 como un intermedio final ("FI") listo para la radiofluoración se preparó según un proceso anterior (esquema 1), y el método de la presente invención (esquema 2), y los resultados se compararon. Los dos métodos se resumen en los esquemas 1 y 2:

Esquema 1: Diagrama de flujo del método de proceso previo (método 1).



Esquema 2: Diagrama de flujo del presente método de invención (método 2).



En los esquemas 1 y 2, el "FI protegido" corresponde al compuesto 1, y "FI" corresponde al compuesto 2.

La pureza y el contenido de agua y TFA de los productos secos por congelación de los métodos 1 y 2 se midieron. Los materiales liofilizados del método 1 y el método 2 se usaron entonces por radiofluoración con ^{18}F -FBA según el método del ejemplo 5, y la pureza radioquímica del compuesto 3 se determinó. El contenido de péptido radioactivo del producto compuesto 3 se determinó también por HPLC analítica.

5 Los datos generados se resumen en la Tabla 1:

Tabla 1: Datos del método y del método 2

	Compuesto 2			Compuesto 3	
	Contenido de TFA	Contenido de agua	Pureza (por HPLC)	RCP	Contenido de impureza peptídica*
Método 1	12,7% en m/m	4,7% en m/m	91,9%	>90%	18,2 µg (promedio de 20 experimentos)
Método 2 (presente invención)	7,6% en m/m	4,6% en m/m	94,3%	>90%	13,4 µg (promedio de 10 experimentos)

* Esto es para el producto que eluye del FASTlab donde: m/m significa masa/masa.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una composición liofilizada de molécula de direccionamiento biológico funcionalizada con aminooxi que comprende:

(i) purificación cromatográfica en fase inversa de un compuesto protegido de Fórmula (IA):

5 [BTM]-X¹ (IA)

Usando una fase móvil, para dar compuesto IA purificado en dicha fase móvil;

(ii) desprotección del compuesto IA purificado de la etapa (i), para dar una disolución de compuesto aminooxi de Fórmula (IIA):

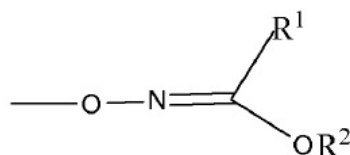
[BTM]-O-NH₂ (IIA)

10 (iii) liofilización de la disolución de la etapa (ii), para dar una composición liofilizada de dicho compuesto aminooxi de Fórmula (IIA);

En donde:

[BTM] es una molécula de direccionamiento biológico;

X¹ es un grupo aminooxi protegido de fórmula:



15

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

2. El método según la reivindicación 1, donde R¹ y R² son independientemente alquilo C₁₋₂.

3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la BTM comprende un único aminoácido, un péptido 3-100 mer, un sustrato enzimático, un antagonista enzimático, un agonista enzimático, un inhibidor enzimático o un compuesto de unión al receptor.

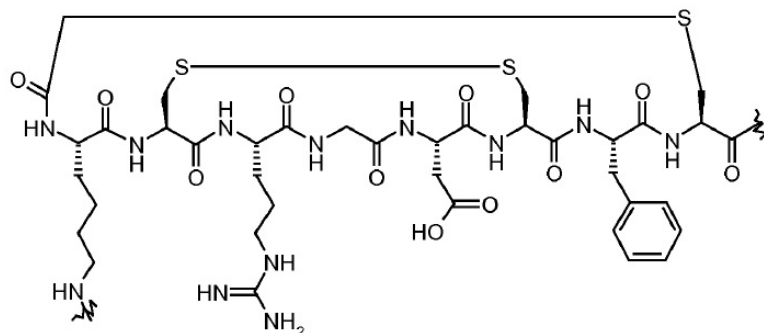
20

4. El método según la reivindicación 3, donde la BTM comprende un AffibodyTM.

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

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

25 (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:

-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-

En donde X¹ es Asn, His o Tyr;

30 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;

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

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

Cys^a-Xaa-Gln-Ser^b-Cys^c-Ser^d-Phe-Gly-Pro-Phe-Thr^c-Phe-Val-Cys^b-(HO-Asp)-Gly-Asn-Thr^a-Lys^d

En donde Xaa es Arg o Lys;

- 10 Cys^a-Thr^a, Ser^b-Cys^b y Cys^c-Thr^c están unidos de forma covalente por medio de enlaces tioéter;

Ser^d-Lys^d están unidos de forma covalente por medio de un enlace lisinoalanina;

HO-Asp es ácido β-hidroxiaspártico.

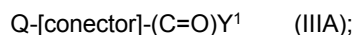
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la purificación cromatográfica en fase inversa de la etapa (i) comprende HPLC.

- 15 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la fase móvil comprende ácido trifluoroacético acuoso.

8. Un método de radiomarcaje de una molécula de direccionamiento biológico con ¹⁸F, que comprende:

(a) llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para dar la composición liofilizada de la reivindicación 8;

- 20 (b) condensación de dicha composición liofilizada de la etapa (a) con un compuesto carbonilo de Fórmula (IIIA) en un disolvente adecuado:



Para dar el conjugado radiomarcado de fórmula (IVA):



- 25 Donde:

Q es un grupo que comprende el radioisótopo ¹⁸F;

[BTM] es la molécula de direccionamiento biológico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;

Y¹ es H, alquilo C₁₋₆ o arilo C₄₋₁₀,

[conector] es un grupo conector.

- 30 9. El método de radiomarcaje según la reivindicación 8 en donde la molécula de direccionamiento biológico marcada con ¹⁸F se obtiene como una composición radiofarmacéutica que comprende dicha molécula de direccionamiento biológico marcada con ¹⁸F, junto con un vehículo biocompatible en una forma adecuada para la administración a mamíferos.

- 35 10. El método de radiomarcaje según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que se lleva a cabo usando un aparato sintetizador automatizado.

11. El uso de un aparato sintetizador automatizado para llevar a cabo el método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el método de radiomarcaje según la reivindicación 9.